

# WP2611: フィールド・フロー・フラクシオネーションと光散乱検出器 (FFF-MALS-DLS) によるナノ粒子製剤の解析—精密粒度分布、粒子形状測定—

Dan Some, Ph.D., and Christoph Johann, Ph.D., Wyatt Technology

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

## はじめに

粒子の性状解析を正確に行うことは、ナノスケールでの治療薬の効果的なデリバリー法の開発における主要な課題の一つです。動的光散乱 (DLS)、ナノ粒子トラッキング解析 (NTA)、および透過型電子顕微鏡 (TEM) のような標準的な方法はみな、簡便性、詳細性、サンプリング効率において、いずれかを犠牲にしています。例えば、DLS は操作が容易であり、膨大な数の粒子の集合を扱うことができますが、半定量的で低分解能の粒径分布しか得ることができません。他方、TEM は構造の詳細を明らかにしてくれますが、操作が複雑で試料の準備に手間がかかり、全体のうちのごく一部しか観察しないため、統計的に大きな誤差を生じかねません。

フィールドフローフラクシオネーション (FFF) は、粒子を大きさに基づいて分離する技術で、直径 1–1,000nm の広い範囲の高分子やナノ粒子を分離することができます。FFF に多角度光散乱検出器 (MALS) と DLS 検出器を接続することにより、試料全体について、詳細で定量的、かつ統計的な解析に耐え得る粒子径分布を測定でき、構造に関する情報も得ることができます。さらに、UV-VIS やその他検出器をオンラインで接続することにより、成分の情報なども得ることができます。FFF システムは標準的なクロマトグラフィーモジュールを使用しているため、測定は完全に自動化され、画分を単離することができ、各画分をさらにオフラインで解析することもできます。また FFF は、試料の前処理をそれほど必要としないという特徴もあります。というのは、分離操作自身が多くの不純物から目的物を分離し、実験の性質上、移動相の溶媒で透析したのと同じ意味をなすからです。

FFF-MALS-DLS システムのこれらの能力は、リポソームドラッグ調製法や他のナノ粒子デリバリーシステムに関する規制当局の要求を満たす道を与える<sup>1-4</sup>と共に、ISO TS 21362 や ASTM WK 68060 のような、ナノ粒子解析の国際的スタンダードの形成や NCI-NCL や EU-NCL により公表された手法<sup>5-6</sup>にも貢献してきました。図 1 に示すように、Wyatt Technology 社の FFF-MALS-DLS システムは、[Eclipse™ フロー制御装置](#)と分離チャンネル、[DAWN® MALS 検出器](#)、[WyattQELS™ DLS モジュール](#)、[Optilab® 示差屈折率検出器](#)および標準的な HPLC モジュールを備えています。半径 30 nm 以上の粒子のオンライン DLS 測定を正確に行うには、MALS 検出器にワイドボアフローセルが備えてある必要があります。またシステム全体の制御は、VISION™ ソフトウェアで行います。



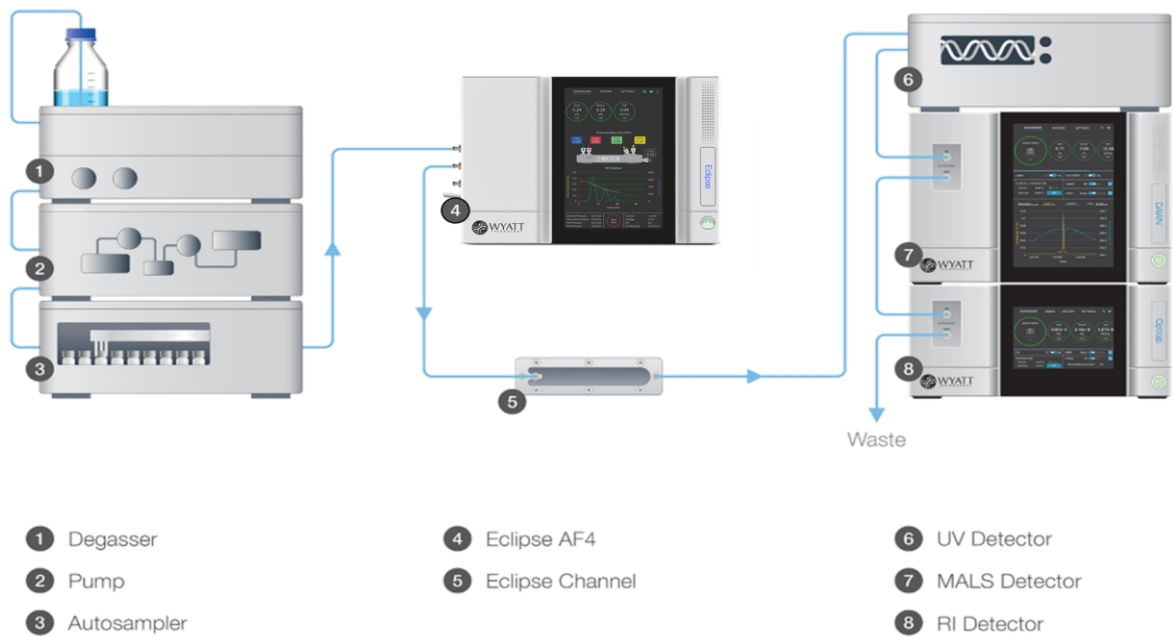


図1. FFF-MALS-DLS システムの部品と構成。DLS 検出器は MALS 検出器に内蔵されています。

## FFF によるナノ粒子の分離

フィールドフローフラクショネーションは 1966 年に Calvin Giddings によって発明されました<sup>7</sup>。しかし、市販の FFF 装置が便利で高性能になり、分析研究室で用いられるようになったのは、ここで紹介する非対称フロー FFF が世に出てからで、それまでに何十年かの時を要しました。また、ナノ粒子に基づく治療薬と遺伝子デリバリーフォーマットの出現が、このユニークな機能の需要を増大させました。

図2に示したフロー FFF の原理は、Giddings のレビューに記載されています<sup>8</sup>。簡単に述べると、分離は、2つの長く狭いブロックをスペーサーで挟んで固定してあるオープンチャンネル中で行われます。スペーサーは通常 200~500  $\mu\text{m}$  の厚さのポリマーの薄い膜を使用します。このリボン状のチャンネル中の流れは層状で、放物線状の流れを形成し、粒子の分離を促します。

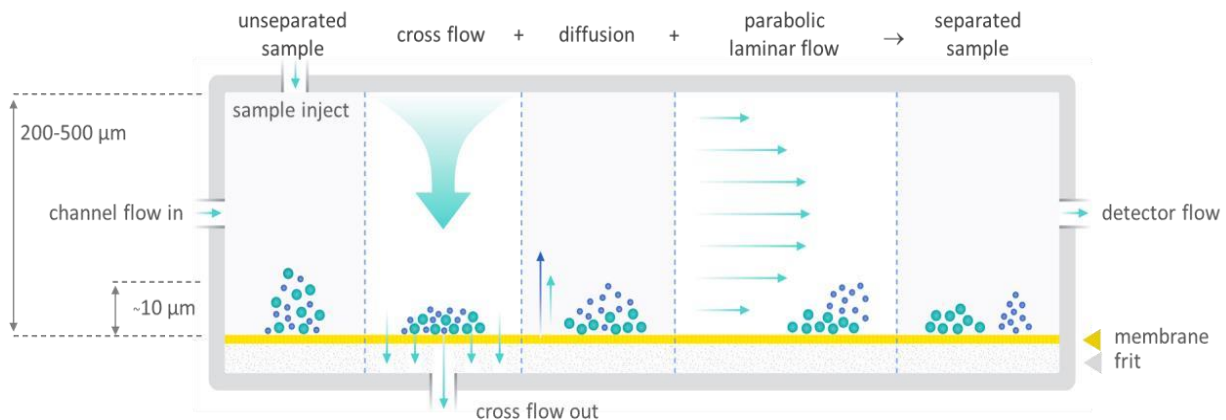


図2. FFF チャンネル内における分離の機構：FFF チャンネルは、半浸透のメンブレンと横方向の流れを制御する絞り弁で構成されており、一定量の溶媒はメンブレンを通過していきます。粒子の大きさに依存する拡散力と垂直方向の流れ（クロスフロー）のバランスによって、大きさの異なる粒子は、異なる高さに分布を形成します。その時、大きな粒子は、流速の遅いメンブレン付近に留まるため、そこから離れたところに位置する小さな粒子が先に移動します。

底のブロックは、フリットとメンブレンで構成されています。メンブレンは、溶媒を通過させ、分析対象物を通過させない適切なポアサイズのものを選択する必要があります。ポアサイズは、2kDa から 30kDa の範囲で分子量カットオフしたものを使用します。粒子を含むキャリアー液はメンブレンと平行に流れますが、チャンネル末端の絞り弁によって“クロスフロー場を生み出し”、溶液の一部がメンブレンを通過するように力を加え、メンブレンに向かって粒子濃度を上昇させます。拡散力は逆向きの力としてチャンネル内に働き、メンブレンの上に粒子の並進拡散係数、つまり流体力学的半径  $R_h$  とクロスフローの速度に依存する濃度分布を形成します<sup>9</sup>。分離は、層流プロファイル中で行われ、メンブレンから上方への高さに従って、移動相の流速が異なることによって行われます。

FFF において、粒子の保持時間  $t_R$  は、拡散係数  $D_t$ 、チャンネルの厚さ  $w$ 、クロスフローの流速  $F_c$ 。（精密なフロー制御装置によって制御される）、および検出器方向（平行）の流速  $F_{out}$  に依存します。流速が一定で保持が十分強い場合は、保持時間は式 1 で近似されます<sup>9</sup>：

$$t_R = \frac{w^2}{6D} \cdot \ln \left( 1 + \frac{F_c}{F_{out}} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

より複雑な流れのプロファイルの場合、チャンネル出口における、試料の保持時間、ゾーンブロードニングおよび希釈については、標準的な流体力学の計算によって求めることができます<sup>10</sup>。分離プロセスのコンピューターシミュレーションは、実際の実験法の改善に役立ち、測定した保持時間に基づいて拡散係数の計算を行う場合にも役立ちます<sup>11</sup>。FFF の高い分離能力を示す例を図 3 に示します。

FFF の分離チャンネルには分析用とセミ分取スケールのもがあります。最近開発された FFF には、メンブレンに対して垂直方向に電場をかけるものもあります。この方法を用いると、複数成分の  $\mu E$  を同時に決定することができ、電荷の分布を得ることができます<sup>12</sup>。

電荷を持った粒子はメンブレン上で高さがシフトし、その結果、保持時間が変化します。その変化は適用する電圧に依存するため、その変化から電気泳動の移動度  $\mu E$  とゼータ電位を計算することができます。

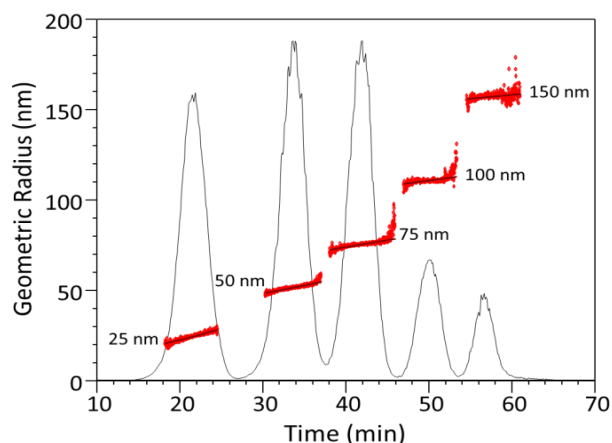


図3 半径 25 nm から 150 nm までの一連のラテックス標準粒子の分離。MALS により測定した保持時間ごとの粒子径を赤点で示しています。

## ナノ粒子のオンライン解析

ナノ粒子の分離は、粒子の性状解析の最初のステージになります。精製された単分散の分画を一つまたは複数の検出器で測定するという事は、各分子種を、物性および組成分析できることを意味します。

### 多角度光散乱検出器 (MALS)

MALS はナノ粒子の集合体によって散乱された光の時間平均の強度を、入射レーザービームの伝搬方向に対して相対的に定義された複数の散乱角度で測定します。MALS は通常、3 もしくは 8、18 個のフォトダイオードからの信号を取り入れ、ナノ粒子の応用では 18 個の検出器が最もよく用いられます。すべてのフォトダイオードは同一平面上に配置され、図 4 に示すように、レーザービームの偏光に対して垂直方向に配置されます。

分子量と大きさ (rms 半径、すなわち回転半径) を決定する MALS 解析の応用はよく知られています<sup>13</sup>。

十分希釈された溶液では、散乱強度 (還元レイリー比 R) と、散乱角度  $\theta$ 、試料の分子量 M、屈折率増分  $dn/dc$ 、濃度  $c$ 、rms 半径  $R_g$  の関係は式 2 と 3 のようになります。K は入射光の波長  $\lambda$ 、および移動相液の屈折率  $n_0$  に関わる光学定数です。

$$R(\theta) = K \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 M c P(\theta) \quad \text{Eq. 2}$$

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \sin^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) \langle R_g^2 \rangle + \dots \quad \text{Eq. 3}$$

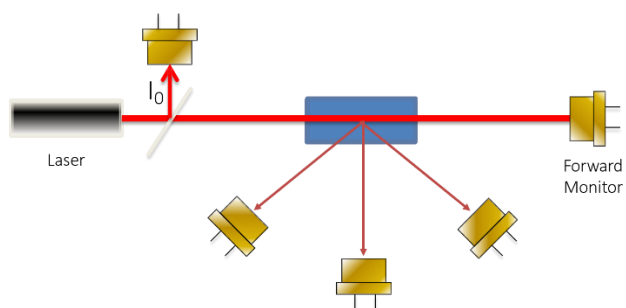


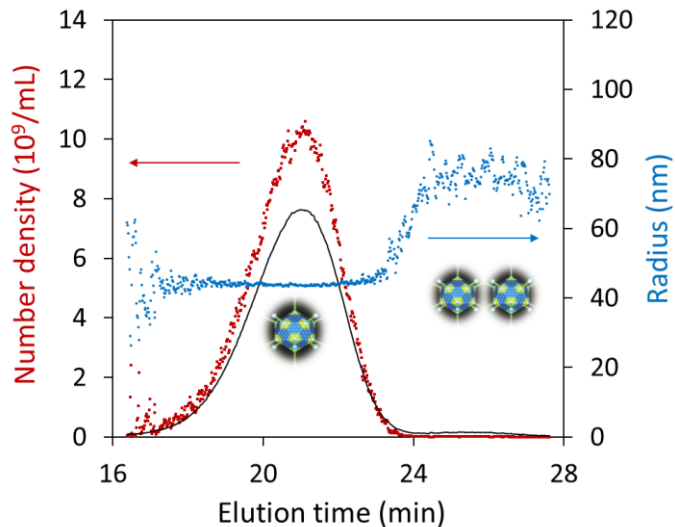
図 4. 基本的な多角度光散乱検出器の配置。複数の検出器が、入射光に対して複数の角度に配置されています。各検出器は光の偏光ベクトルに対して垂直です。その他、レーザー光の強度及びフローセルを通過した光をモニターする検出器も設置されています。

光の波長より  $R_g$  は短い極限において、また  $(n_p/n_0 - 1) \ll 1$  を仮定して、容積  $V$  中の  $N$  個の一般的な粒子と屈折率  $n_p$  を仮定すると、過剰レイリー比は 4 式<sup>12</sup>で与えられます。

$$R(\theta) = \frac{8\pi^2 N V^2}{\lambda^4} \left( \frac{n_p}{n_0} - 1 \right)^2 P(\theta) \quad \text{Eq. 4}$$

$P(\theta)$  の解析から RMS 半径  $R_g$  が得られます。 $R_g$  は粒子全体の構造と内部の質量の分布に関係しています。より特異的な、粒子の形すなわちコンホメーションに関しては、 $R_g$  は物理的な次元、例えば、細い棒の長さまたは球殻の半径と関係があり、従って容積  $V$  の容量が計算できます<sup>13</sup>。

$V$ 、 $n_p$ 、 $n_0$  が既知であれば、散乱体積中の粒子数  $N$  を導くことが出来ます。この解析は濃度に依存する TEM で決定される濃度に比べて格段に正確であることが知られています。図 5 にインフルエンザウイルスの例を示します<sup>15</sup>。



|                      | AFM/ TEM             | FFF-MALS             | %□ |
|----------------------|----------------------|----------------------|----|
| Total Particle Count | $2.9 \times 10^{10}$ | $2.8 \times 10^{10}$ | 2  |
| Average Radius       | 43.0                 | 45.0                 | 5  |

図 5. 上: FFF-MALS によるインフルエンザウイルスの大きさと個数濃度を LS クロマトグラムに重ね合わせて示しています。下: FFF-MALS による大きさとイメージングによって決定された粒子個数濃度 (文献 15 に基づく表データ)。

粒子が  $\lambda$  に比べて十分大きい場合には、 $P(\theta)$  を式 3 のさらに高次の拡張項を含む既知の角度関数にフィットすることによって、粒子の一般的な形 (球状、楕円体など) を決定することも可能かもしれません。この可能性は薄いディスク状および円筒状の単一の層状リポソームの性状解析に応用されました<sup>16</sup>。球状、棒状、楕円体、糸まり状に対する光散乱の角度依存性の式が存在します<sup>13,14,17</sup>。この解析は、図 6 のカーボンナノチューブに応用され、球状モデルではうまくフィットせず、棒状モデルではよくフィットすることが示されています。フィットが形状を予測するのに十分な精度であるためには、少なくとも試料 1 つの次元が波長の数分の一以上の長さを持たなければなりません。例えば、MALS の波長が 660 nm の場合には 100 nm です。

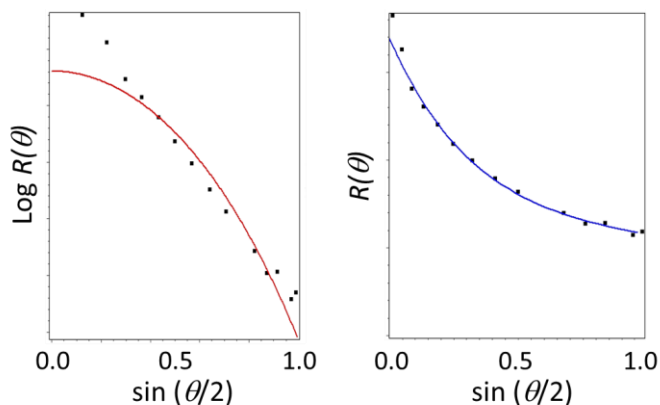


図6. 散乱角依存性関数からの形状の推定。試料は棒状のカーボンナノチューブ。球状モデルへのフィットは不良ですが(左)、棒状モデルによくフィットしています(右)。

粒子径と濃度に加えて、通常、FFF 分離を行うような希薄溶液条件下では、光散乱強度はMALS 検出器<sup>(13)</sup> を通過する高分子の分子量にも式 2 によって関係しています。濃度  $c$  は上流または下流に置かれた UV/VIS 検出器または示差屈折検出器によって測定されます。従って、同じ MALS 検出器を使って、FFF によって分離された複合試料中のナノ粒子と高分子の双方を測定することができます。ASTRA®解析ソフトウェアは、MALS 検出器により、FFF によって分画された試料の粒子径と球状粒子濃度や分子量を計算することができ、それによって詳細な粒子径分布を得ることが出来ます。MALS はまた、インラインでサイズ排除クロマトグラフィーと共に用いることができ、蛋白質や高分子の性状解析に用いられ、標準物質の溶出位置に依存しない絶対分子量と分子サイズを求めることができます。MALS 測定はサブ秒スケールで行うことが可能で、この技術を予備のプロセス分析やフルスケールの生産プロセスに用いることも検討されています。リアルタイム MALS 検出器 [ultraDAWN™](#) をプロセスのモニタリングや制御に用いることによって、平均 rms 半径は1分間に30回まで決定することができ、一様なナノ粒子の製造を確認し、廃物を最小限に抑え、高価な材料を無駄にしないように製造過程の初期に規格外の産物を同定することができます。リアルタイム MALS は治療薬モノクローン抗体の精製において分子量をモニターし、凝集体を検出することが出来ることが示されています<sup>18</sup>。

## 動的光散乱 (DLS)

動的光散乱は光子相関分光 (PCS) および準弾性光散乱 (QELS) としても知られています。DLS においては光散乱強度の時間平均強度の角度依存性を測定するのではなく、 $\mu$  秒やミリ秒スケールで生じる光散乱強度変化の揺らぎを解析することによって試料の大きさを決定します。この揺らぎは粒子のブラウン運動に由来しています。即ち、各粒子によって散乱される波は検出器において干渉に基づいて組み合わせられ、粒子が拡散されるに従って、合成波の相対的位相が変化し、検出器は速い強度の揺らぎを経験します。揺らぎの速さは粒子の並進拡散係数  $Dt$  に直接関係し、その結果はさらにストークス・アインシュタインの関係 (式 1) を介して変換され、ストークス半径、即ち流体力学的半径  $R_h$  として知られる大きさの測度となります。

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi D_t} \quad \text{Eq. 1}$$

球状粒子の場合、 $R_h$  は粒子の外縁の半径であり、内部の構造には依存しません。非球状粒子の場合、 $R_h$  は粒子全体として、おおよそ同じ体積の球と同等の半径となります。粒子の形状が球から離れるほど流体力学的体積  $V_h = 4\pi R_h^3 / 3$  に比べて実際の粒子の体積は小さくなります。例えば、回転楕円体の軸比が 3 : 1 とすると、回転楕円体の実際に測定した体積は、Tanford の古典的な教科書<sup>19</sup>中の記載から推定される  $V_h$  よりも大体 30%程度小さくなります。

標準的な DLS でバッチ測定を行うと、平均の  $R_h$  を容易に決定できますが、この技術で求めた粒子径分布は、用いる数学的な解析が不正確であるために精度が低く曖昧さが残ります。一方、測定の前に FFF によって試料をサイズ分離すると、DLS の測定は各分取画分が事実上単分散であるために、単純化され、測定精度が向上します。FFF はサイズのごく近いモノも分離するため、FFF-DLS によるサイズの分布はバッチ DLS に比べると万能で非常に定量的です。図7に見るように、リポソーム試料のバッチ DLS と FFF-DLS の違いは歴然としています。

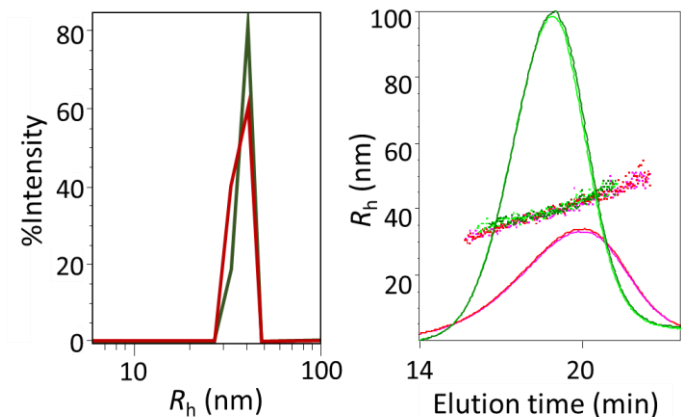


図7. リボソームのバッチ DLS と FFF-DLS による分析の比較。  
 左：バッチ DLS による中空および薬物が内包されたリボソーム。  
 右：両試料の FFF による分離と DLS 測定の重ね書き。

### 複数の検出器

MALS と DLS の組み合わせにさらに他の検出器をオンラインで接続すると、1回の FFF の測定で可能な解析が拡

表1. 代表的な形状因子の値

| Structure  | $R_g$   | $R_h$  | Shape factor   |
|--|---|--|--|
| Uniform sphere with radius $R$   | $R \sqrt{\frac{3}{5}}$  | $R$  | 0.77   |
| Hollow sphere with radius $R$  | $R$   | $R$  | 1  |
| Spherical shell,<br>$p$ = ratio of inner radius $r_i$ to<br>outer radius $R$ | $R \sqrt{\frac{3}{5} \frac{1-p^5}{1-p^3}}$ <sup>20</sup>        | $R$  | $p = 0.5 \rightarrow \rho = 0.82$<br>$p = 0.9 \rightarrow \rho = 0.95$ |
| Uniform rod,<br>$p$ = length / diameter = $L/d$                              | $\frac{L}{2} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{2p^2}}$ <sup>21</sup> | $\frac{L/2}{\ln(p) + 0.312 + \frac{0.565}{p} - \frac{0.1}{p^2}}$ <sup>21</sup> | $p = 2 \rightarrow \rho = 0.85$<br>$p = 10 \rightarrow \rho = 1.55$    |
| Uniform prolate ellipsoid,<br>$p$ = axial ratio $b:a$                        | $b \sqrt{\frac{1+2/p^2}{5}}$ <sup>22</sup>                      | $\frac{b \sqrt{1 - \frac{1}{p^2}}}{\ln(p + \sqrt{p^2 - 1})}$ <sup>23</sup>     | $p = 2 \rightarrow \rho = 0.83$<br>$p = 10 \rightarrow \rho = 1.36$    |

張されます。以下、ナノ DDS のための最も一般的で実用的な FFF で用いられる検出法について紹介します。

### 形状因子

形状因子  $\rho$  は MALS によって決定される  $R_g$  と DLS によって決定される  $R_h$  の比です。この値は、均一球や楕円体、中空の球殻、糸まり状、その他の単純な構造については計算されており、いくつかの例を図 8 に描かれた形状について表 1 に掲載しています。

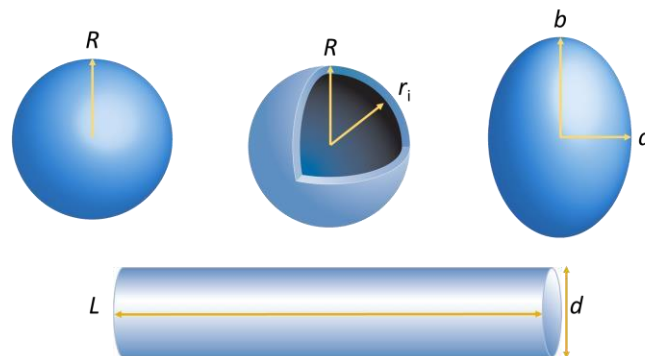


図8. 形状因子が計算されている、いくつかの単純な構造：均一球、球状の殻、楕円体、棒状。

ナンドラッグデリバリーの背景から、リポソームやVLPのような中空のデリバリー粒子は、殻内にドラッグや遺伝子が充填されることが期待されますが、この構造パラメーターを使用することで、空の粒子と内部が詰まった粒子とを区別することが出来ます。リポソームの脂質二重層は約4–5 nmの厚さがあるため、ふつうの50 nmの半径の空のリポソームは $\rho$ の値が約0.95であることが期待されます。実際、Vreelandらは測定により、単層リポソームでは0.93の値を見だしています<sup>24</sup>。

図9には図7で用いた中空リポソームと薬物が内包されたリポソームについてFFF-MALS-DLSによって測定した結果を示しています。FFFは流体力学的半径によって分離するため、試料が各溶出時間の画分において、それぞれの特異的サイズ分布は異なるにもかかわらず、同じ $R_h$ の値を示します(図7bでオンラインDLSによって測定)。一方、各溶出時間の画分において、 $R_g$ の値は異なり、薬物が内包されたリポソームが中空リポソームよりも小さな $R_g$ 値を示します。期待されたように、 $R_g:R_h$ から得られる形状因子(図9右)は大きく異なっています。

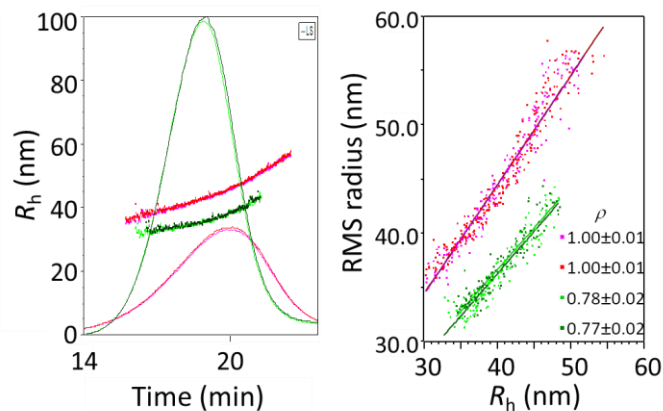


図9. FFF-MALS-DLSで解析した中空および薬物が内包されたリポソーム。a) フラクトグラムに $R_g$ 値を重ねてある。b) 形状因子解析。

もしリポソームが薬剤を含んでいることが分かっているにもかかわらず、一例えば、分光分析で形状因子によって内部が空であるように見える場合には、薬剤は親水性の内部ではなく、脂質の殻に取り込まれたと解釈することが出来ます。二種のヘテロな粒子で一方が球状で他方が棒状のばあいのFFF-MALS-DLS解析で、形状因子が $\sim 1.1$ より大きい長く伸びた粒子の例を図10に示しています。

## UV および蛍光

HPLC用のUVおよび蛍光検出器を加えることも可能です。これらは、以下の目的に用いられます：

- 適当な吸光物質または蛍光物質を含む試料濃度の決定
- 吸収または発光スペクトルによる試料の全または部分的試料組成の決定
- UV または蛍光とその他の検出器との組み合わせによる試料組成の決定。例えば、以下に述べるRI検出器との組み合わせによる“複合体解析”など

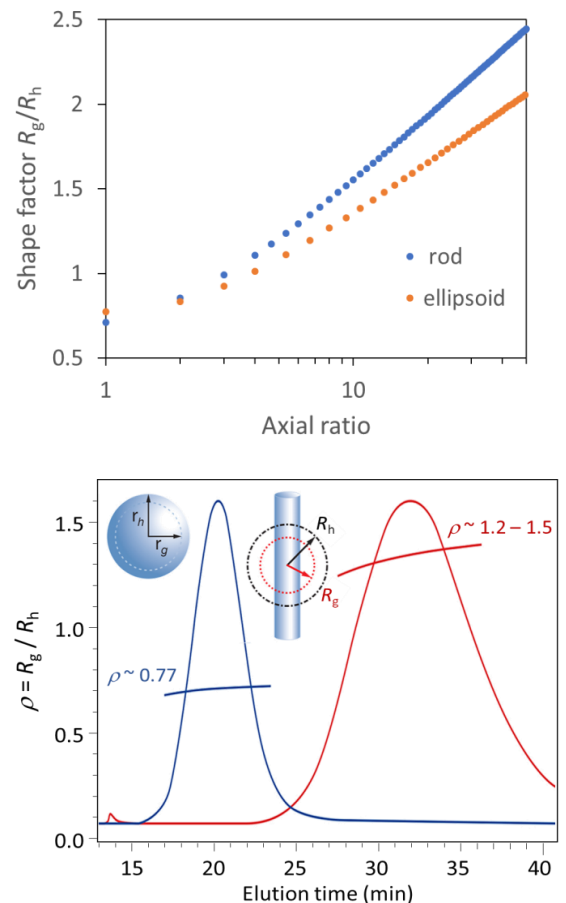


図10. 均一球および細長い粒子の形状因子解析。上図：理論上の形状因子値と表1に基づく、軸比(棒：長さとの比、楕円体：長径と短径の比)。下図：均一球と棒状粒子を含む二つのタイプの粒子のFFF-MALS-DLS解析。棒状粒子の長さ：直径は5:1から10:1であることを示している。

## 複合体解析

MALS 検出器と異なる試料の異なる性質を利用した濃度検出器の組み合わせ—例えば、UV 検出器と RI 検出器—は、全体の分子量だけでなく、複合試料の各成分の分子量を決定することができます<sup>25</sup>。この考え方は、ナノ薬剤リボソームやポリマーソームに DNA, RNA, 蛋白質, 低分子などが内包された治療薬中の各成分の組成比の決定に応用することができます。脂質、PLGA (ポリ乳酸-グリコール酸共重合体) のような高分子、核酸、蛋白質などの、UV スペクトルの応答量の違いを利用して、解析が可能となります。この技術は、治療剤を内包したリボソーム<sup>26</sup>、核酸を内包したウイルス様粒子<sup>27</sup>や蛋白質を内包したポリマーソーム<sup>28</sup>に応用されています。

## 薬剤の封入効率の解析

薬剤の封入効率と遊離の薬剤とナノキャリアーに結合した薬剤の比率の分析は、安全で効率の高いナノキャリアーの開発と確立に最も重要です。遊離の蛋白質または核酸は FFF-MALS で分離して定量化することが可能ですが<sup>28</sup>、低分子を定量化することはより困難です。低分子は膜を通して失われてしまうからです。しかし、この低分子は一般に疎水性で膜に吸着しやすく、Boyer が紹介した方法<sup>29</sup>では、低分子をクロスフローの出口で UV/VIS 検出器で検出し、もともと含まれていた量と比較しています。膜はあらかじめ同低分子を吸着させて結合面を飽和させておきます。さらに、キャリアー中に内包された薬剤は複合体解析によって直接定量化することも出来ます。この二つの方法がよい一致を示すことが図 11 に示されています<sup>29</sup>。

## 結論と展望

低分子や遺伝子ベクターなどの複雑な薬剤に引き起こされる課題を解決するには粒子の性状解析の高度なアプローチが必要です。FFF-MALS-DLS はこれらの多くの課題へのソリューションを与えるもので、ますますこの分野の R&D における重要な方法になりつつあります。

粒子径分布の特性評価に、FFF-光散乱法を使用することは、十分に確立されつつありますが、最近の研究により、医薬品ナノ製剤の開発と商業化の中心に

ある、より高度な分析への可能性を見出されています。今後、操作性や堅牢性、拡張性を強化することで、製薬業界における FFF-MALS-DLS の使用頻度が、更に高まっていくものと考えます

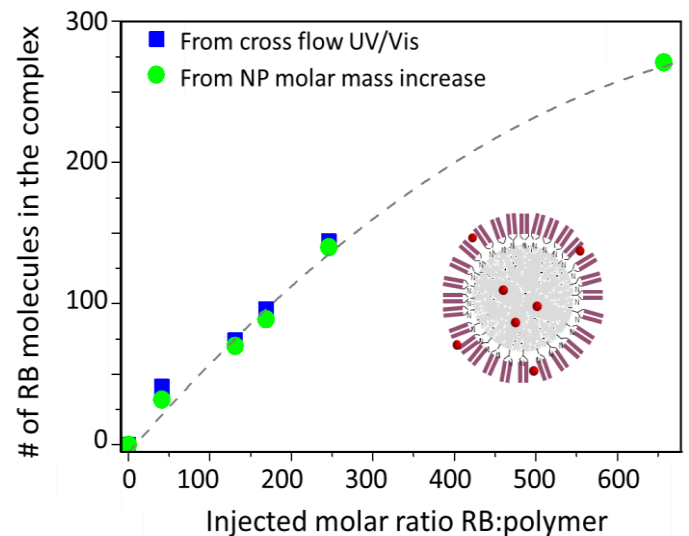


図 11. ポリマーソームに低分子治療薬を封入する効率を決定する 2 つの主要な方法の比較。青：メンブレンを通過した遊離の UV/VIS による低分子治療薬の定量化。緑：空のポリマーソームに対して、薬剤が内包されたナノ粒子の分子量測定による解析法。Albena Lederer の許可に基づいて転載。

## 文献

1. Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M. & Prina-Mello, A. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCINCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release* vol. 299 31–43 (2019).
2. Hu, Y., Crist, R. M. & Clogston, J. D. The utility of asymmetric flow field-flow fractionation for preclinical characterization of nanomedicines. *Anal. Bioanal. Chem.* (2019) doi:10.1007/s00216-019-02252-9.
3. Gioria, S. *et al.* Are existing standard methods suitable for the evaluation of nanomedicines: some case studies. *Nanomedicine* 13, 539–554 (2018).
4. Caputo, F. *et al.* Measuring Particle Size Distribution by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation: A Powerful Method for the Preclinical Characterization of Lipid-Based Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 16, 756–767 (2019).
5. Clogston, J. D. & Hu, Y. *NCL Method PCC-19: Asymmetric-Flow Field-Flow Fractionation.* [https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/NCL\\_Method\\_PCC19.pdf](https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/NCL_Method_PCC19.pdf) doi:10.17917/8S1D-BN17.



6. Mehn, D., Caputo, F. & Roesslein, M. *FFF-MALS method development and measurements of size and molecular weight Measurement of particle size distribution of protein binding, of mean molecular weight of polymeric NP components, study of batch to batch reproducibility, and study of release of f.* <http://www.euncl.eu/about-us/assaycascade/PDFs/PCC/EUNCL-PCC-022.pdf?m=1468937868> (2016).
7. Giddings, J. C. A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities. *Sep. Sci.* 1, 123–125 (1966).
8. Giddings, J. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science (80- )*. 260, 1456–1465 (1993).
9. Wahlund, K. G. & Giddings, J. C. Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall. *Anal. Chem.* 59, 1332–1339 (1987).
10. Litzen, A. & Wahlund, K. G. Zone broadening and dilution in rectangular and trapezoidal asymmetrical flow field-flow fractionation channels. *Anal. Chem.* 63, 1001–1007 (1991).
11. Elsenberg, S. & Johann, C. Field-Flow Fractionation: Virtual Optimization for Versatile Separation Methods | LCGC. *The Column* <http://www.chromatographyonline.com/field-flowfractionation-virtual-optimization-versatile-separationmethods-0> (2017).
12. Johann, C., Elsenberg, S., Schuch, H. & Rösch, U. Instrument and Method to Determine the Electrophoretic Mobility of Nanoparticles and Proteins by Combining Electrical and Flow Field-Flow Fractionation. *Anal. Chem.* 87, 4292–4298 (2015).
13. Wyatt, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* 272, (1993).
14. Van Holde, K. E. *Physical biochemistry*. (Prentice-Hall, 1971).
15. Wei, Z. *et al.* Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: Correlation of particle counts, size distribution and infectivity. *J. Virol. Methods* 144, 122–132 (2007).
16. Palmer, A. F., Wingert, P. & Nickels, J. Atomic force microscopy and light scattering of small unilamellar actincontaining liposomes. *Biophys. J.* 85, 1233–1247 (2003).
17. Hsieh, V. H. & Wyatt, P. J. Measuring proteins with greater speed and resolution while reducing sample size. *Sci. Rep.* 7, 10030 (2017).
18. Patel, B. A. *et al.* Multi-angle light scattering as a process analytical technology measuring real-time molecular weight for downstream process control. *MAbs* 10, 945–950 (2018).
19. Tanford, C. *Physical chemistry of macromolecules*. (John Wiley & Sons, 1961).
20. Tinker, D. O. Light scattering by phospholipid dispersions: Theory of light scattering by hollow spherical particles. *Chem. Phys. Lipids* 8, 230–257 (1972).
21. Ortega, A. & Garcia De La Torre, J. Hydrodynamic properties of rodlike and dislike particles in dilute solution. *J. Chem. Phys.* 119, 9914–9919 (2003).
22. Perrin, F. Brownian movement of an ellipsoid. II. Free rotation and depolarization of fluorescence. *J. Phys. Radium* 7, 1–11.
23. Santos, N. C. & Castanho, M. A. R. B. Teaching light scattering spectroscopy: The dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.* 71, 1641–1650 (1996).
24. Jahn, A., Vreeland, W. N., DeVoe, D. L., Locascio, L. E. & Gaitan, M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir* 23, 6289–93 (2007).
25. Wen, J., Arakawa, T. & Philo, J. S. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* 240, 155–166 (1996).
26. Hinna, A., Steiniger, F., Hupfeld, S., Brandl, M. & Kuntsche, J. Asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection for drug transfer studies: A feasibility study. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 7827–7839 (2014).
27. Citkovicz, A. *et al.* Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering. *Anal. Biochem.* 376, 163–172 (2008).
28. Gräfe, D., Gaitzsch, J., Appelhans, D. & Voit, B. Cross-linked polymersomes as nanoreactors for controlled and stabilized single and cascade enzymatic reactions. *Nanoscale* 6, 10752–10761 (2014).
29. Boye, S., Polikarpov, N., Appelhans, D. & Lederer, A. An alternative route to dye-polymer complexation study using asymmetrical flow field-flow fractionation. *J. Chromatogr. A* 1217, 4841–9 (2010).

本アプリケーションノートは、Wyatt Technology Corporation が全著作権所有しています。Wyatt Technology 社による書面での事前許可なく、電子的、機械的、コピー、記録、またはいかなる手段を問わず、本アプリケーションノートの一部を複製したり、検索システムに保存したり、変換することはできません。

