

1. PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

Lo strumento FFF offre il vantaggio di ottenere una separazione di soluzioni di proteine, polimeri e sospensioni di particelle colloidali in ambiente acquoso nel range di dimensioni compreso da alcuni nm fino a 1 μm .

Il meccanismo di separazione si basa sulle forze idrodinamiche che si generano in un canale di separazione.

Le particelle di più piccole dimensioni vengono trasportate più velocemente lungo il canale rispetto a quelle di dimensioni maggiori e perciò sono eluite più velocemente. Il campione viene quindi separato all'interno di questo canale a flusso, che svolge le funzioni di una colonna senza fase stazionaria o solida.

La Flow-FFF usa come forza di separazione un flusso di liquido perpendicolare al flusso del canale ed è la variante più utilizzata nella famiglia delle tecniche FFF: si ottiene una separazione ad alte risoluzione in un flusso molto sottile.

La diffusione, associata ai movimenti Browniani, a sua volta, crea un movimento opposto. Le particelle più piccole, dotate di velocità di diffusione più elevate, tendono a raggiungere una posizione di equilibrio più in alto nel canale, dove il flusso longitudinale è più elevato. Quindi il gradiente di velocità che si instaura nel canale separa le particelle di differenti dimensioni. Le particelle più piccole sono trasportate molto più velocemente lungo il canale rispetto a quelle più grandi, con il risultato che le particelle di dimensioni più piccole eluiscono prima di quelle più grandi, comportamento opposto a quello che si verifica nella cromatografia ad esclusione dimensionale o nella gel permeazione, in cui le particelle più grandi eluiscono per prime.

Nello specifico, il principio di separazione si basa sul fatto che, le particelle/polimeri che eluiscono in un canale lungo e sottile in seguito ad un determinato flusso (Tip flow), nel momento in cui sono sottoposte ad un flusso perpendicolare al loro percorso (Cross flow), verranno trasportate con velocità diverse lungo il canale in base alle loro dimensioni (Fig 1). Il cross flow infatti spinge le particelle contro la membrana di cellulosa (cut off 10000 Da) che delimita il canale; le particelle con dimensioni inferiori al cut off attraversano la membrana e vengono eliminate.

A inizio corsa viene attivato anche il focus flow che arriva dal centro del canale e risale contrastando il Tip flow allineando in questo modo tutte le particelle a inizio canale.

Finito il focusing step (da pochi secondi ad alcuni minuti), il sistema, attraverso il transition step, passa all'elution step: il Focus flow lentamente viene azzerato. Le particelle soggette a tali flussi usciranno dal canale in base alle loro dimensioni, generalmente prima le particelle più piccole e poi via via le più grandi.

All'uscita del canale l'eluato entra in serie in 2/3 detector (UV, eventualmente il fluorimetro, e Zeta sizer).

2. CONFIGURAZIONE DEL SISTEMA

Lo strumento è costituito da:

- Degasatore
- Focus pump
- Tip pump
- Kloehn pump (cross flow)
- Canale costituito da:
 - o bottom clamp
 - o channel bottom contenente il frit metallico (e non ceramico)
 - o la membrana con cut off 10000 Da
 - o spacer da 350 μm (sono disponibili anche da 190, 250 e 500 μm in base alle dimensioni delle particelle da eluire): lo spacer da 350 μm è il miglior compromesso per tutte le condizioni sperimentali testate nel collaudo e richieste dagli utilizzatori

- top block in plexiglass
- top clamp che porta le viti per assemblare il tutto.
- Rheodyne con Loop da 20 µl per l'iniezione del campione
- Tubo in pic marrone di connessione al detector (backpressure) del diametro di 0.005 pollici (invece che l'originario nero di 0.004 pollici) disponibile in 2 lunghezze a seconda del flusso che si vuole avere al detector (0,5 – consigliabile per lo Zetasizer - o 1.0 ml/min)
- Tubi in pic di varie dimensioni (comunque superiori a 0.01 pollici) di connessione con il detector UV
- Detector UV, dotato di lampada al deuterio (190-700 nm di range), con sensitivity regolabile: 0.001 (+ alta) per le nanoparticelle e soluzioni diluite di polimeri o proteine (<10mg/ml), 0.01 (+ bassa) per le soluzioni concentrate (>10mg/ml) di polimeri e proteine
- Cella per fluorimetro (trasportabile se necessario) con tubi di acciaio
- Tubo in teflon di connessione alla cella di flusso dello Zetasizer, del diametro di 0.01 pollici
- Cella a flusso per Zetasizer
- Detector Zetasizer nano
- Tubo di scarico in teflon del diametro di 0.03 pollici
- PC (in rete) di controllo ed acquisizione del segnale dell'FFF e di tutti i detector; sul PC è installato il software AF2000, che controlla le pompe e acquisisce il segnale UV e fluorimetrico e il software Zetasizer 7.11 che controlla e acquisisce il segnale dallo Zetasizer nano

NB: Alcune variazioni possono essere apportate alla configurazione del sistema, su richiesta di intervento di Postnova, e a totale carico economico dell'utilizzatore richiedente sia per l'installazione, che per le parti di ricambio:

- es. frit ceramico (+ delicato), attualmente non disponibile, da sostituire a quello metallico, per lavorare in condizioni metal-free
- es. altri detector, in particolare detector multi angle light scattering e viscosimetrici, attualmente presenti in open access di ateneo, e che consentono di risalire al peso molecolare assoluto

3. PRECAUZIONI E AVVERTENZE D'USO

- La configurazione del sistema non può essere cambiata senza consultare Postnova (Gerhard Heinzmann gerhard.heinzmann@postnova.com), nè dal punto di vista dell'assemblaggio dei componenti, nè dal punto di vista della configurazione software;
- tutti gli eluenti (anche se costituiti da acqua milliQ) vanno filtrati sotto vuoto con unità filtrante (appositamente acquisita) e filtri da 100 nm, allo scopo di evitare l'intasamento dei filtri di sicurezza in teflon presenti sulla focus e sulla tip pump.
Per tale operazione è a disposizione un sistema di filtraggio sottovuoto costituito da una beuta (2 l) con tappo codato e supporto per il filtro abbinato ad un recipiente ad imbuto da carico del volume di 500 ml; il tutto assemblato tramite pinza metallica;
- tutti i campioni in sospensione, ad esclusione degli standard di lattice, vanno filtrati su filtro (1.2-1.5 µm) prima dell'iniezione, allo scopo di allontanare le microparticelle e i loro aggregati che potrebbero intasare il tubo di backpressure; l'indagine della presenza di microparticelle all'interno dell'analita è da evitare, dal momento che esse sono escluse dal range dimensionale del sistema;
- il flusso al detector da utilizzarsi è di 0.5 ml/min, dal momento che esso deve essere compatibile con l'acquisizione da parte dello Zetasizer (ogni 3 secondi); qualora lo Zetasizer venga escluso dai detector, si può operare anche ad 1 ml/min, previa sostituzione del tubo di

- backpressure con uno più corto (già a disposizione): è da sottolineare però che l'analisi a 1 ml/min non porta vantaggi in termini di separazione rispetto a 0.5 ml/min;
- qualora la pressione dei filtri in teflon sulla tip e focus pump superasse il livello di allarme segnalato dal software, si rende necessaria la loro sostituzione da parte di personale adeguatamente formato;
 - qualora la separazione degli standard di lattice (90, 170, 300, 500 nm) non fosse efficiente, si rende necessaria la sostituzione della membrana da parte di personale adeguatamente formato;
 - per tutte le informazioni relative alla chimica e alla tecnologia del sistema bisogna contattare via mail la Postnova (Dr. Evelyn Moldenhauer Moldenhauer@postnova.com e Dr. Gerhard Heinzmann gerhard.heinzmann@postnova.com), mettendo in copia Alfatest (roberto.santoliquido@alfatest.it, andrea.denti@alfatest.it); per tutti gli ordini di consumabili bisogna far riferimento ad Alfatest (roberto.santoliquido@alfatest.it, andrea.denti@alfatest.it).

4. METODICHE OPERATIVE

Premessa: IMPOSSIBILITÀ DI SEPARARE PARTICELLE > 1000 NM, PERCHÈ ESCONO PRIMA PER EFFETTO STERICO

- Per i campioni in soluzione acquosa (proteine e polimeri) l'eluente da utilizzarsi è NaCl 0.9%;
- per i campioni in sospensione, l'eluente più comunemente utilizzabile è la miscela Novachem 0.05% + NaCl 0.05%; tale miscela è idonea per la rivelazione con detector Zetasizer (qualora il detector Zetasizer sia escluso, è possibile utilizzare anche il semplice Novachem 0.2%); tale eluente è ottimizzato per gli standard in lattice, testati nel collaudo: piccole variazioni della composizione dell'eluente possono essere apportate a seconda della natura chimica del campione in sospensione, previo accordo con gli esperti di Postnova, contattabili via mail (Dr. Evelyn Moldenhauer Moldenhauer@postnova.com e Dr. Gerhard Heinzmann gerhard.heinzmann@postnova.com);
- Per l'analisi di campioni contenenti sistemi liposomiali, l'eluente più comunemente usato è il PBS. L'eluente a base di Novachem non può essere utilizzato, in quanto contenente tensioattivi.
- Premesso che piccole variazioni della composizione dell'eluente possono essere necessarie a seconda della natura chimica dell'analita, i programmi per l'eluizione sono sostanzialmente 4:
 - metodo 1: per soluzioni acquose di proteine (>10000 Da)
 - metodo 2: per soluzioni acquose di polimeri (>50000 Da)
 - metodo 3: per sospensioni acquose di nanoparticelle o liposomi <100 nm
 - metodo 4: per sospensioni acquose di nanoparticelle o liposomi >100 nm: il limite di esclusione superiore è di 1 micron, ma al di sopra dei 500 nm non si ottiene una separazione netta dei picchi alla linea di base; al di sopra di 1 micron è sconsigliabile utilizzare lo strumento, sia per problemi di intasamento del tubo di backpressure, sia perché essi verrebbero eluiti in ordine inverso a causa dell'effetto sterico
 - metodo 5: per sospensioni acquose di nanoparticelle o liposomi < 200 nm

- sul detector UV possono essere regolate la lunghezza d'onda e la sensitivity; per quanto attiene la lunghezza d'onda essa è regolabile a seconda della natura del polimero o della proteina in soluzione, mentre, per quanto riguarda i campioni in sospensione, il detector rileva la torbidità, per cui la lunghezza d'onda di default (280 nm) può essere idonea per tutti i campioni; per quanto riguarda la sensitivity, essa può essere impostata a 0.001 per i campioni in soluzione diluiti (<10mg/ml) e a 0.01 per i campioni in soluzione concentrati (>10 mg/ml);
- il detector Zetasizer deve essere impostato per acquisire con cella di flusso (secondo appositi parametri) con un tempo di 3 secondi per ogni funzione di autocorrelazione: l'analisi di campioni in soluzione (polimeri e proteine) richiede concentrazioni relativamente alte (>10 mg/ml), mentre per le sospensioni, la concentrazione necessaria varia a seconda della dimensione. Pertanto, in questo caso occorre effettuare un'analisi DLS preliminare (vedi sotto) *in batch* in modo da definire la concentrazione idonea.
- l'eluizione di campioni monodispersi a dimensione nota attraverso il canale, anche se rivelata solo con detector UV, può servire da scala dimensionale per campioni incogniti della stessa natura chimica: pertanto è possibile calibrare lo strumento con degli standard noti; iniettare quindi un campione incognito, della stessa natura chimica, e far estrapolare dal software la sua dimensione teorica, anche solo con il segnale UV.
Il dato fornito dallo strumento è qualitativo e non quantitativo, in quanto l'intensità del segnale acquisito dai detector varia in base alle dimensioni; allo scopo di fare una analisi quantitativa su un campione incognito, bisogna disporre di standard monodispersi a dimensione nota (della stessa natura chimica dell'analita) da iniettare nel sistema senza cross-flow (quindi senza separazione), in modo tale da consentire al software di effettuare una calibrazione

5. UTILIZZO DEI SOFTWARE

5.1 CARICAMENTO DEI METODI

Software AF2000

- Aprire il software AF2000 dal desktop in modalità START PROGRAM (NO DEMO)
- Selezionare il metodo: File →Open →Run
- Selezionare la cartella Postnova information → fff → run → training→ scegliere il metodo adeguato al tipo di campione
- Compare una videata con Run e FFF Method
- In Run inserire la directory selezionando/creando la propria cartella di salvataggio dei dati, inserire il nome del proprio campione nella finestra "Name", inserire a destra la sample conc., ripetere il nome nella finestra "sample" e inserire propri commenti sul campione nella finestra a destra "sample description".
- Schiacciare "Save" presente nella parte sinistra.

Software Zetasizer

Nel caso di abbinamento con il detector Zetasizer, procedere con l'impostazione del Zetasizer software della Malvern:

- Aprire il software dal desktop
- Inserire "flow" nella casella presente sulla barra dei comandi scegliendo dal menù a tendina.
- Creare un novo file di misura: File →New→Measurement file salvandolo in una apposita cartella
- Selezionare un metodo: File →Open→SOP

- Selezionare la cartella Postnova information → dls → sop → training→ scegliere il metodo adeguato al tipo di campione
- Si apre una videata: nella parte destra si seleziona “sample” e si inserisce il nome del proprio campione a destra; si seleziona a sinistra “material” e si inserisce/sceglie nel menù a tendina il materiale del proprio campione (nel caso di un nuovo inserimento andranno inseriti anche il RI e il coefficiente di assorbimento: è presente nel cassetto DLS/ZETA un plico cartaceo su cui sono raccolti tali dati per alcuni materiali).
- File →Save as→selezionare/creare la propria cartella e salvare.
- Measure →Start SOP
- Multiview

5.2 AVVIO ANALISI ED INIEZIONE DEL CAMPIONE

Prima di procedere con l’iniezione del campione occorre effettuare due operazioni PRELIMINARI al DLS:

- 1) Stabilire, con una lettura *in batch* (cella statica), se la concentrazione del campione è idonea per il segnale DLS, in caso contrario occorrerà effettuare una diluizione del campione con eluente. Questo passaggio, tiene conto del fatto che il campione nel canale viene diluito approssimativamente di un fattore 1:100. Pertanto, si procede diluendo una piccola parte di campione 1:100 con eluente, si riempie quindi una cella di tipo statico e si effettua una lettura DLS preliminare *in batch*. La concentrazione del campione iniziale può essere considerata idonea, se la sua diluizione 1:100 presenta un numero di colpi compreso nel range $1000 < kcps < 10000$.
- 2) Verificare che la cella di quarzo (a flusso) all’interno dello Zetasizer sia pulita. A tale scopo, misurare il numero di colpi utilizzando il contapassi collocato sotto la voce TOOLS nel software dello Zetasizer, cliccare “Count Rate Meter” e Impostare i parametri seguenti:
 - a. current position (mm) 4.20, clicca SET
 - b. attenuator 11, clicca SET
 - c. scegliere il tipo di cella dal menu a tendina: ZEN0023 QUARTZ CELL.
È preferibile che i colpi non superino la soglia di 100 kcps. In caso contrario, procedere con la pulizia delle pareti esterne della cella, sfregando le pareti con carta assorbente pulita o, eventualmente imbevuta con metanolo e in seguito con acqua deionizzata.

Infine si ricorda che, prima di procedere con l’iniezione, occorre accertarsi di avere filtrato sia l’eluente (con filtro da 0.1 μm) che il campione (con filtro da 1.2-1.5 μm) onde evitare l’intasamento del sistema (vedi paragrafo 3).

Nel caso in cui, dopo un lungo periodo di inutilizzo, vi sia aria nel sistema è necessario mettere il sistema a:

cross flow: 1.5 ml/min
 focus flow: 1.0 ml/min
 tip flow: 1.0 ml/min

e lasciare tali condizioni finché la pressione al detector non raggiunge valori compresi tra 8 e 9 bar.

- quando il sistema è condizionato, selezionare “Preset Flow” sul software AF2000: il sistema in automatico avvierà i flussi come impostati da programma;
- caricare il campione filtrato nella siringa HPLC (almeno 50 µl);
- click su “Run” nella videata FFF Method;
- dopo avere verificato che il Rheodyne sia in posizione di carico (in alto), procedere con l’iniezione del campione ruotando il rheodyne verso il basso;
- contemporaneamente fare click su “Start” nel software Zetasizer (se si interrompe l’analisi dls prima della fine dell’analisi programmata, i dati registrati in grafico verranno persi).

Il software FFF fornisce un frattogramma del segnale UV rispetto al tempo; il DLS fornisce un frattogramma del contapassi rispetto al tempo e un diagramma a scalini della dimensione rilevata in corrispondenza di ogni picco del frattogramma.

Terminata l’analisi, i dati sono automaticamente salvati: per quanto riguarda il DLS nel measurement file già predisposto, per quanto riguarda l’FFF nella stessa cartella dove è stato salvato il run, come file dat.

5.3 RIELABORAZIONE DEI DATI (OPERAZIONI BASILARI)

Software AF2000

-aprire il file dat salvato: File →Open →Data

-non è possibile col software AF2000 integrare l’area sottesa ai picchi: per ricavare informazioni sulla concentrazione del campione iniettato, bisogna effettuare una calibrazione dalla maschera evaluation, conoscendo l’assorbività molare dell’analita; se essa è ignota bisogna disporre di standard monodispersi a dimensione nota (della stessa natura chimica dell’analita) da iniettare nel sistema senza cross-flow (quindi senza separazione), in modo tale da consentire al software di effettuare una calibrazione

-si possono sovrapporre i frattogrammi con quelli di standard noti acquisiti con lo stesso metodo: in tal caso aprire i diversi file dat e poi selezionare in alto Data→Show Overlay Window

Software Zetasizer

-aprire il Measurement file salvato

-Edit→Results: si apre una nuova maschera

-in alto a destra, cancellare i picchi evidenziati in automatico dal software con il tasto remove

-sul grafico evidenziare col mouse l’inizio e la fine del picco di interesse nel frattogramma contapassi/tempo: con tasto destro del mouse sul picco evidenziato selezionare DLS analysis, in tal modo a destra comparirà la dimensione media corrispondente al picco indicato

6. ESEMPI DI SEPARAZIONE DI STANDARD ANALITICI TRAMITE FFF EFFETTUATE DURANTE IL TRAINING DI BASE

➤ BSA (69000Da) e suo dimero

Metodo 1

Eluente NaCl 0.9%

Concentrazione 5 mg/ml

Metodo 1

Run FFF Method

General Settings:

Method Pool: C:\ Running

Method Name: Auto Name

Detector Flow Rate	Slot Flow Rate	Spacer [μm]	Run Time	Solvent [ml]
0,50	0,00	350	50,1	159,5

1. Focus Step:

Delay Time	Injection Flow	Injection Time [min]	Cross Flow	Focus Pump	Transition Time [min]
0	0,20	4	3,00	3,30	1

2. Elution Step:

	Time (min)	Cross Flow (ml/min)	Type	Exponent	
1	35,0	3,00	constant	0,00	
2	I D	5,0	3,00	linear	1,00
3	I D	5,0	0,00	constant	0,00
4	I D	0,0	0,00		0,00
5	I D	0,0	0,00		0,00

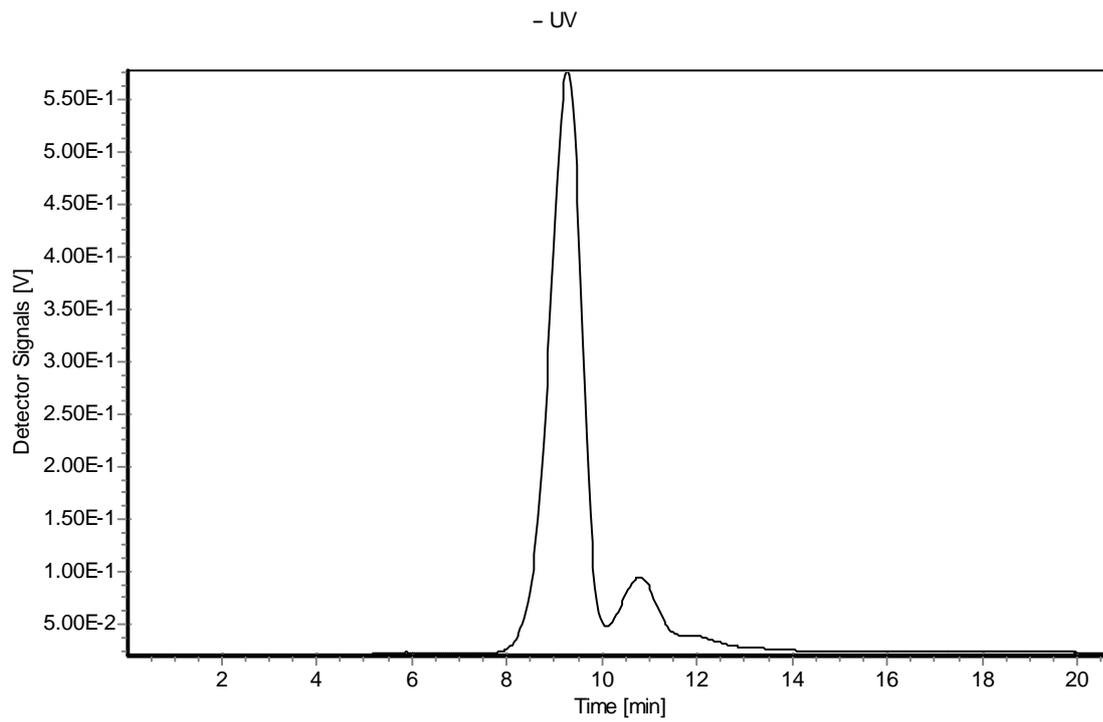
Run Time: 45 min

3. Rinse Step:

Rinse Step ON Purge Valve open

Tip Pump [ml/min]	SlotPump [ml/min]	Focus Pump [ml/min]	Time [min]
0,10	0,00	0,10	0,1

FrattoGRAMMA FFF – sensitivity 0.001 per UV



Il frattoGRAMMA DLS non è disponibile in quanto per avere un buon segnale al DLS si sarebbe dovuto iniettare un campione 25 mg/ml di BSA: tale campione con la sensitivity di 0.001 sarebbe andato fuori scala con il detector UV, si sarebbe pertanto dovuta usare una sensitivity di 0.01

➤ **Polistirene sulfonato (64000 Da)**

Metodo 2

Eluente NaCl 0.9%

Concentrazione 10 mg/ml

Metodo 2

Run FFF Method

General Settings:

Method Pool: C:\ Running

Method Name: Auto Name

Detector Flow Rate	Slot Flow Rate	Spacer [µm]	Run Time	Solvent [ml]
0,50	0,00	350	35,1	62,8

1. Focus Step:

Delay Time	Injection Flow	Injection Time [min]	Cross Flow	Focus Pump	Transition Time [min]	<input type="button" value="Preset Flows"/>
0	0,20	4	1,50	1,80	1	

2. Elution Step:

	Time (min)	Cross Flow (µl/min)	Type	Exponent
1	20,0	1,50	constant	0,00
2	I D 5,0	1,50	linear	1,00
3	I D 5,0	0,00	constant	0,00
4	I D 0,0	0,00		0,00
5	I D 0,0	0,00		0,00

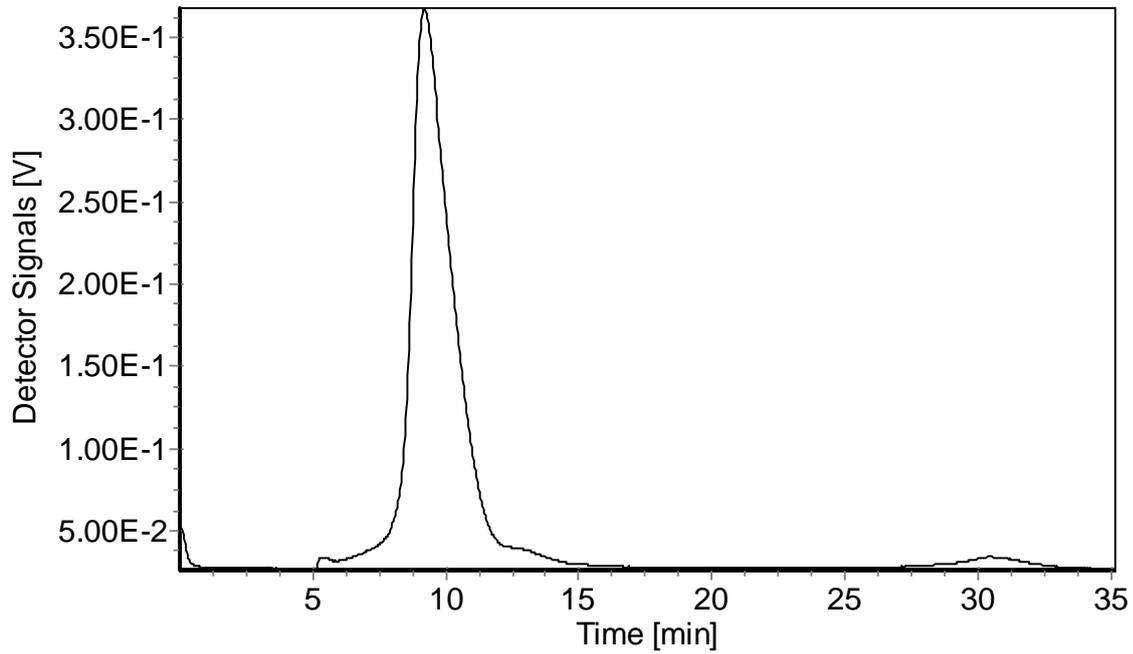
Run Time: 30 min

3. Rinse Step:

<input checked="" type="checkbox"/> Rinse Step ON	Tip Pump [ml/min]	Slot Pump [ml/min]
	0,10	0,00
<input type="checkbox"/> Purge Valve open	Focus Pump [ml/min]	Time [min]
	0,10	0,1

Frattoγραμμα FFF – sensitivity 0.001 per UV

- UV



Il frattoγραμμα DLS non è disponibile in quanto per avere un buon segnale al DLS si sarebbe dovuto iniettare un campione 50 mg/ml di polistirene sulfonato: tale campione con la sensitivity di 0.001 sarebbe andato fuori scala con il detector UV, si sarebbe pertanto dovuta usare una sensitivity di 0.01

Latex mix nanoparticelle 22-58-100 nm

Metodo 3

Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

Concentrazione 25-2.5-0.5 mg/ml

Metodo 3

Run FFF Method

General Settings:

Method Pool: C:\ Method Name: Latex Mix Auto Name Running

Detector Flow Rate: 0,50 Slot Flow Rate: 0,00 Spacer [µm]: 350 Run Time: 65,1 Solvent [ml]: 93,0

1. Focus Step:

Delay Time: 0 Injection Flow: 0,20 Injection Time [min]: 4 Cross Flow: 1,00 Focus Pump: 1,30 Transition Time [min]: 1

2. Elution Step:

	Time (min)	Cross Flow (ml/min)	Type	Exponent
1	50,0	1,00	constant	0,00
2	5,0	1,00	linear	1,00
3	5,0	0,00	constant	0,00
4	0,0	0,00		0,00
5	0,0	0,00		0,00

Run Time: 60 min

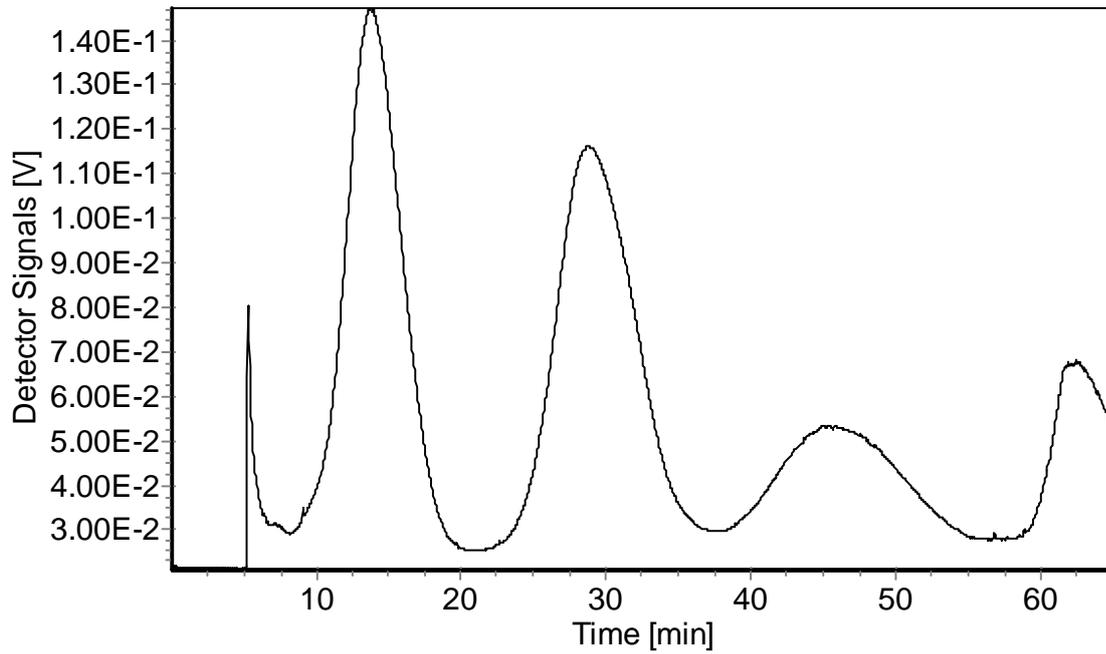
3. Rinse Step:

Rinse Step ON Tip Pump [ml/min]: 0,10 SlotPump [ml/min]: 0,00

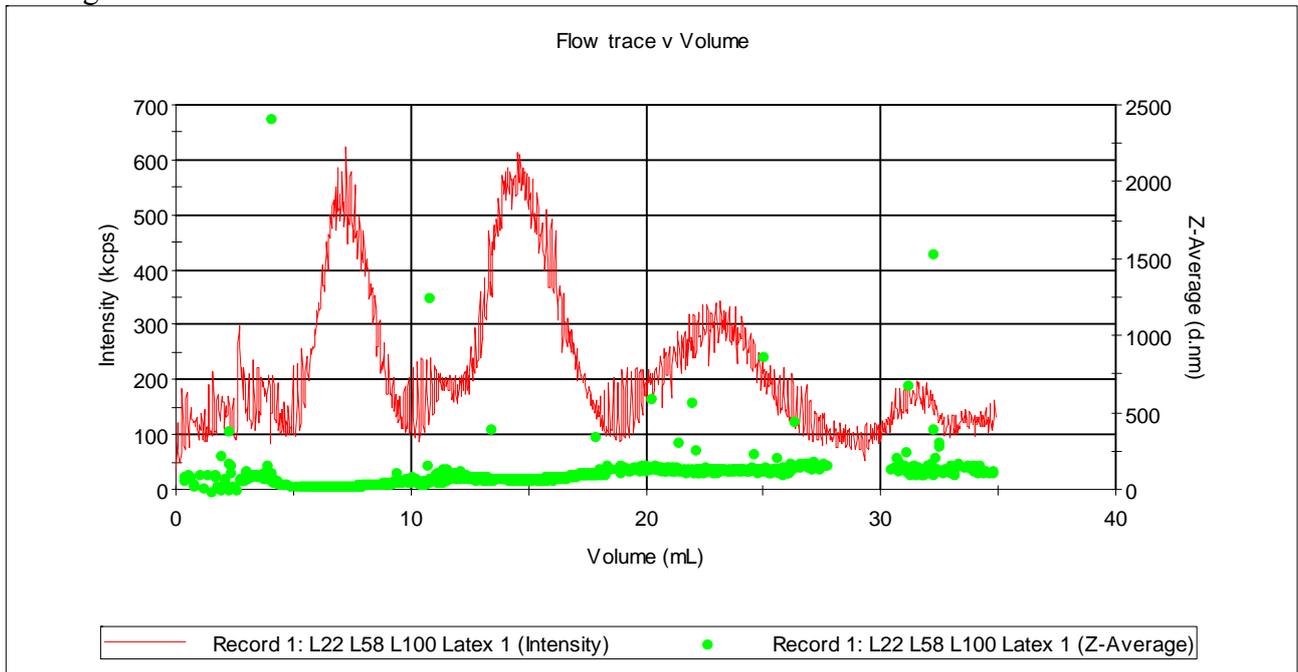
Purge Valve open Focus Pump [ml/min]: 0,10 Time [min]: 0,1

FrattoGRAMMA FFF – sensitivity 0.001 per UV

- UV



FrattoGRAMMA DLS



non considerare il pre-picco e il post-picco, che sono rinvenuti con il Novachem

Latex mix nanoparticelle 63-150-288 nm

Metodo 4

Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

Concentrazione 25-2.5-1.5 mg/ml

Metodo 4

Run FFF Method

General Settings:

Method Pool: C:\

Method Name:

Detector Flow Rate: 0,50

Slot Flow Rate: 0,00

Spacer [µm]: 350

Run Time: 73,4

Solvent [ml]: 56,1

Running

Auto Name Save Clipboard

1. Focus Step:

Delay Time: 0

Injection Flow: 0,20

Injection Time [min]: 3

Cross Flow: 1,00

Focus Pump: 1,30

Transition Time [min]: 0,2

Preset Flows

2. Elution Step:

	Time (min)	Cross Flow (ml/min)	Type	Exponent
1	0,2	1,00	constant	0,00
2	I D 40,0	1,00	Power	0,20
3	I D 30,0	0,10	constant	0,00
4	I D 0,0	0,00		0,00
5	I D 0,0	0,00		0,00

Run Time: 70 min

3. Rinse Step:

Rinse Step ON

Tip Pump [ml/min]: 0,60

SlotPump [ml/min]: 0,00

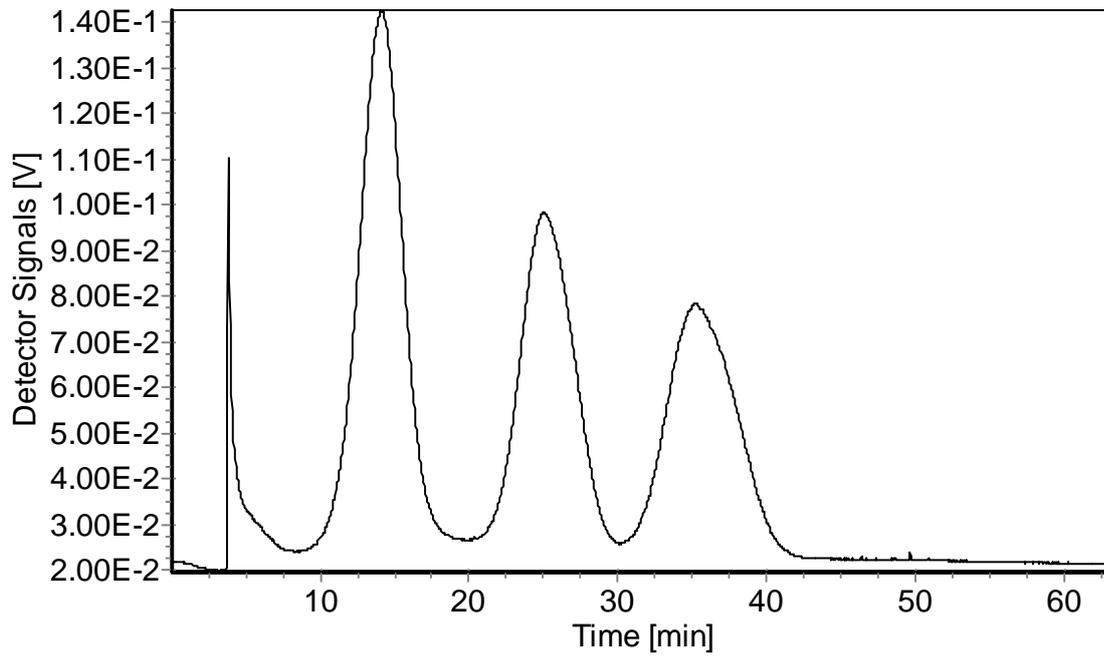
Purge Valve open

Focus Pump [ml/min]: 0,00

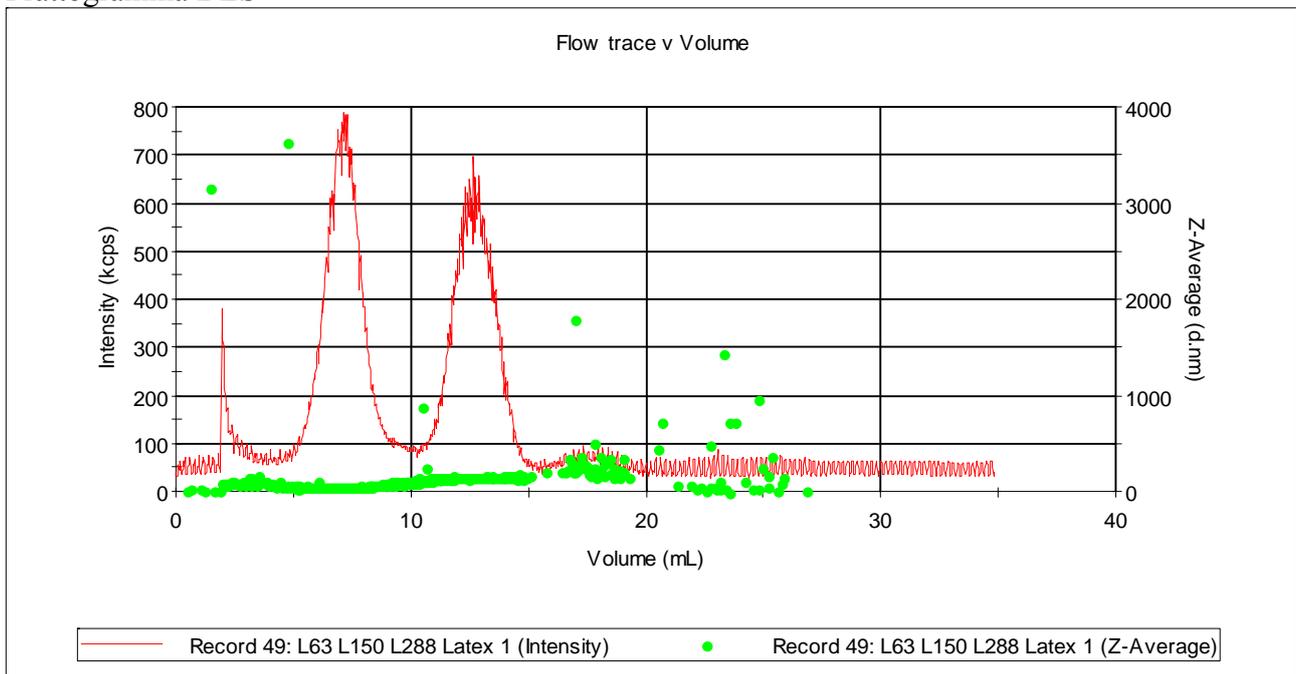
Time [min]: 0,0

Frattogramma FFF – sensitivity 0.001 per UV

- UV



Frattogramma DLS



non considerare il pre-picco, che è rinvenuto con il Novachem

Latex mix nanoparticelle 200-600 nm

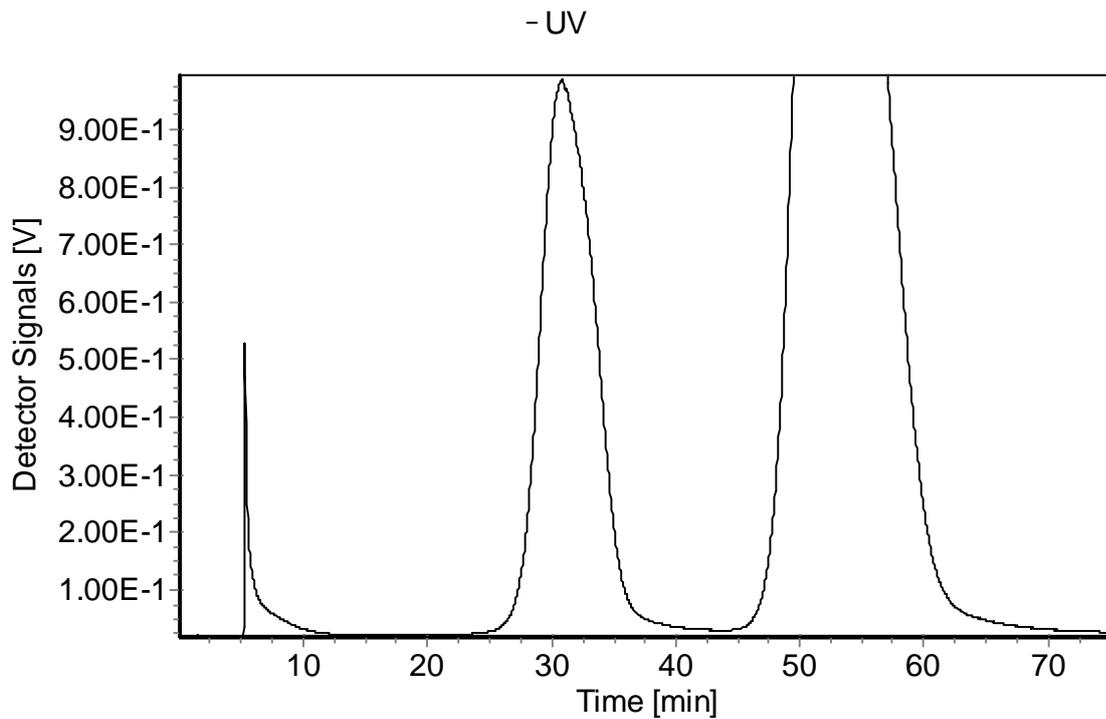
Metodo 4

Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

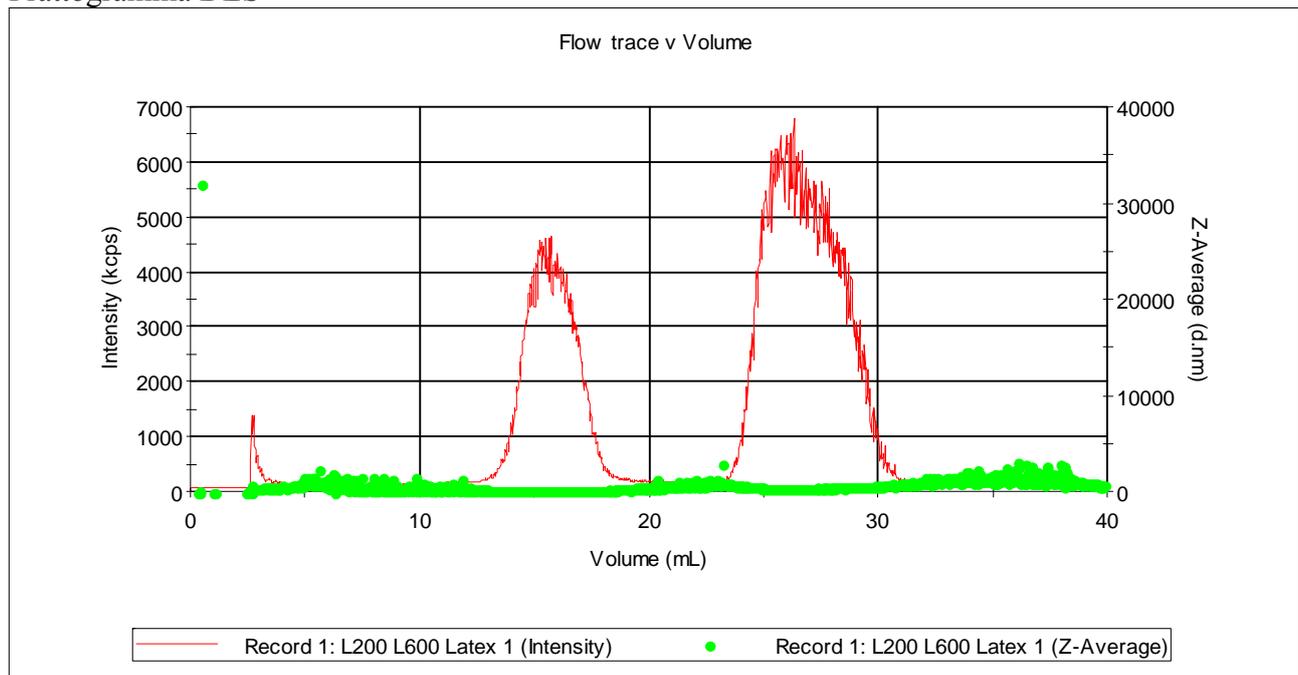
Concentrazione 32-160 mg/ml

Metodo 4 (vedi sopra)

Frattoграмма FFF – sensitivity 0.001 per UV



Frattoграмма DLS



non considerare il pre-picco, che è rinvenuto con il Novachem

Latex mix nanoparticelle 90-170-300-500 nm (standard Coulter)

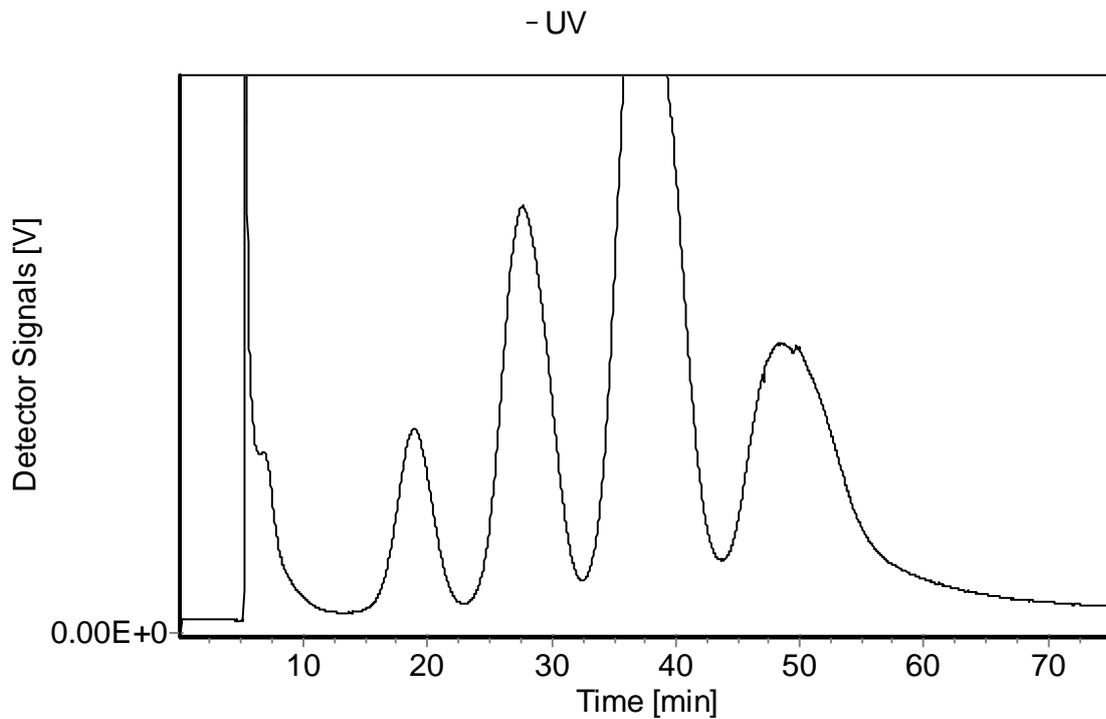
Metodo 4

Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

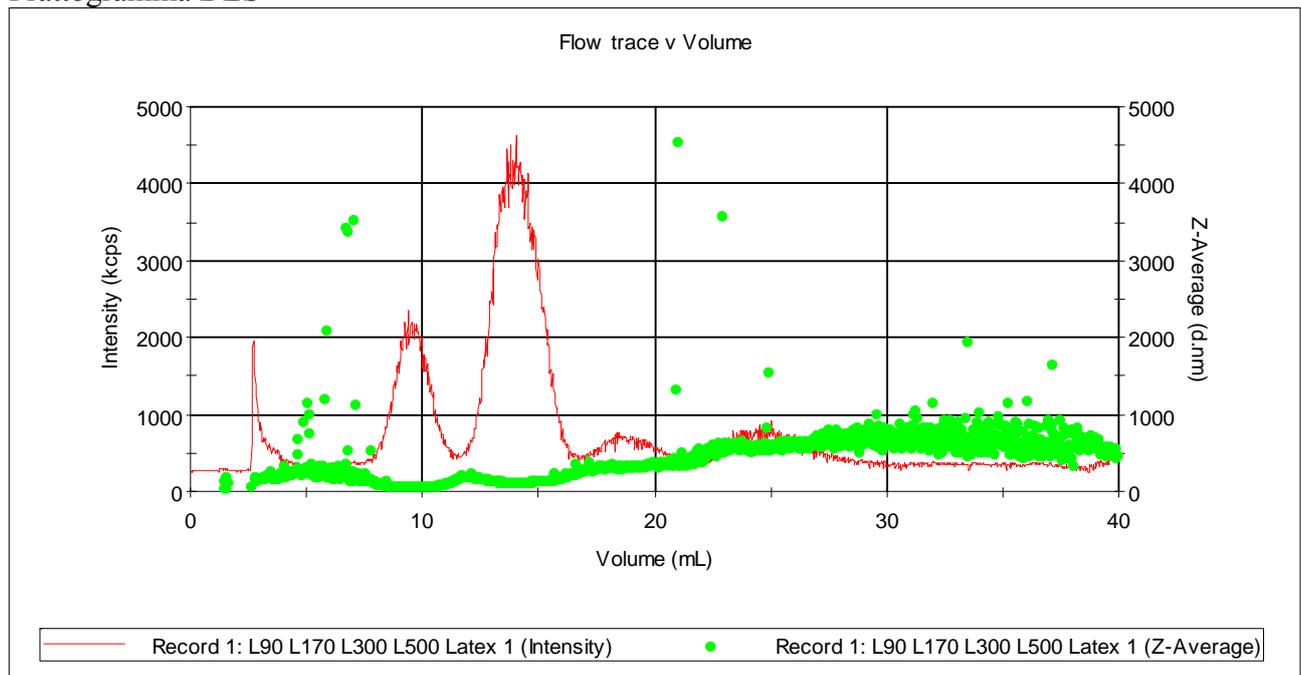
Concentrazione incognita

Metodo 4 (vedi sopra)

Frattogramma FFF – sensitivity 0.001 per UV



Frattogramma DLS



non considerare il pre-picco, che è rinvenuto con il Novachem

Latex mix nanoparticelle 200-600-1000 nm

Metodo 4

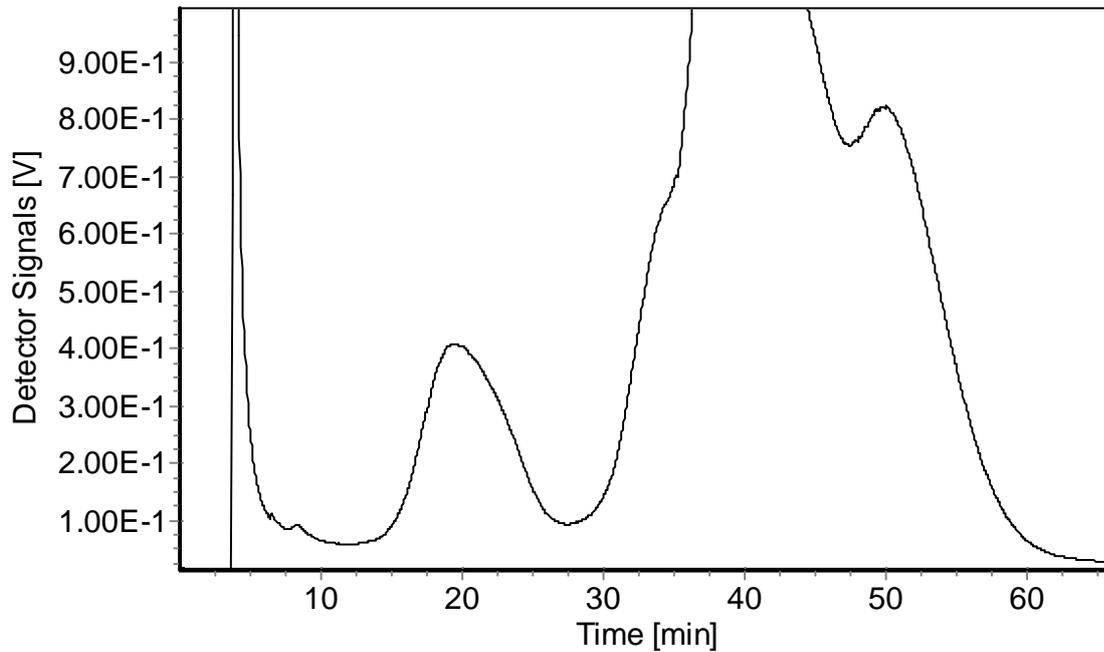
Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

Concentrazione 32-160 mg/ml-incognita

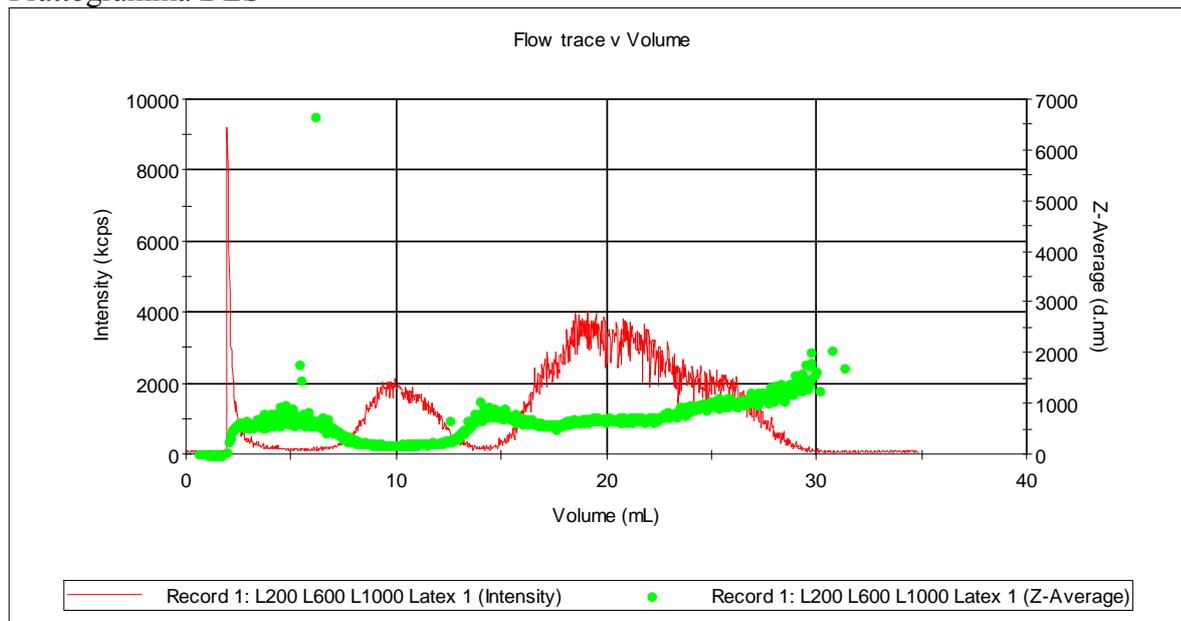
Metodo 4 (vedi sopra)

Frattogramma FFF – sensitivity 0.001 per UV

- UV



Frattogramma DLS



non considerare il pre-picco, che è rinvenuto con il Novachem

IMPOSSIBILITA' DI RISOLVERE ALLA LINEA DI BASE PICCHI SOPRA 500 NM

Latex mix nanoparticelle 170-500-5000 nm (standard Coulter)

Metodo 4

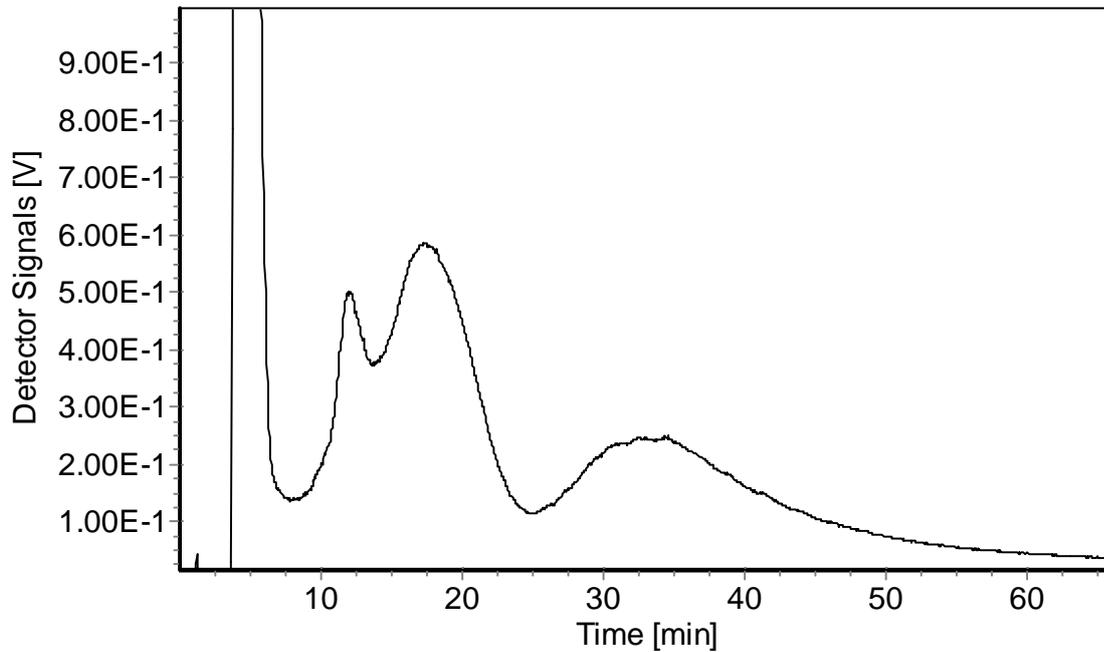
Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

Concentrazione incognita

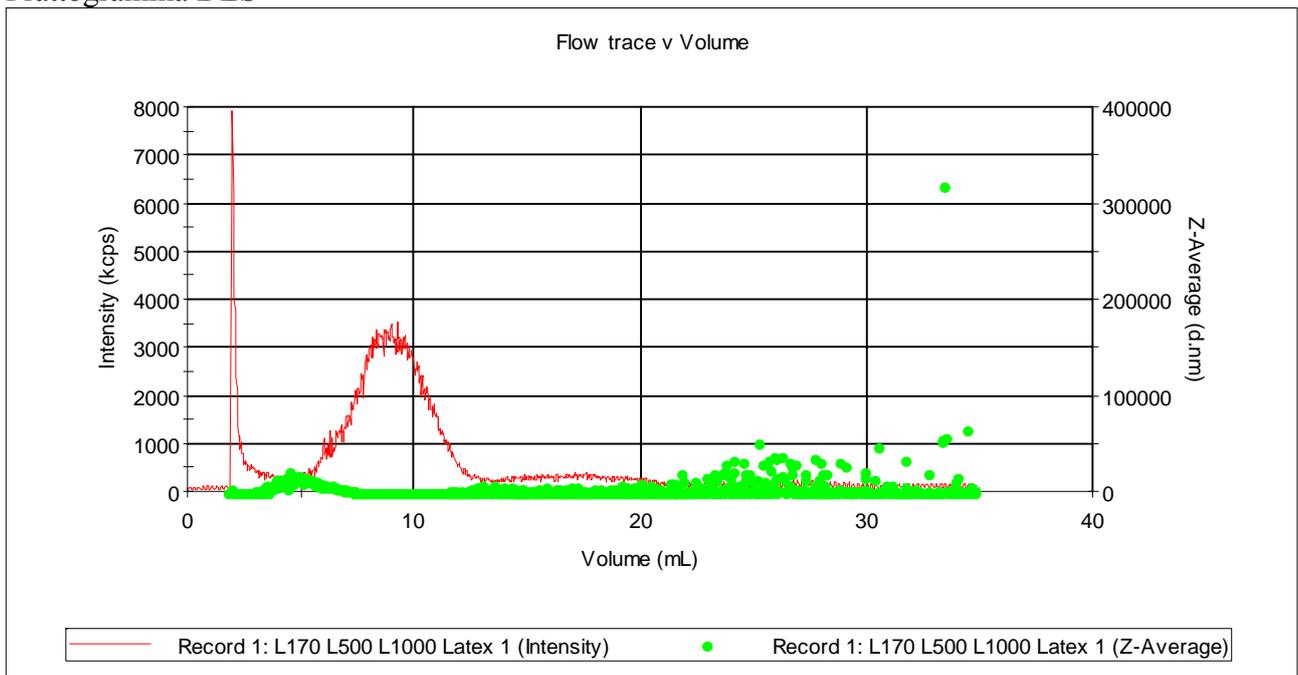
Metodo 4 (vedi sopra)

Frattogramma FFF – sensitivity 0.001 per UV

- UV



Frattogramma DLS



fare attenzione al pre-picco molto grande, dovuto probabilmente alle particelle di 5000 nm

Latex mix nanoparticelle Novachem 22-58.100 nm

Metodo 5

Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05%

Concentrazione: 25-2.5-0.5 mg/ml

Metodo 5

Run FFF Method

General Settings:

Method Pool: C:\

Method Name: New Method Auto Name Running

Detector Flow Rate: 0,50

Slot Flow Rate: 0,00

Spacer [μm]: 350

Run Time: 43,3

Solvent [ml]: 37,8

1. Focus Step:

Delay Time: 0

Injection Flow: 0,20

Injection Time [min]: 3

Cross Flow: 1,00

Focus Pump: 1,30

Transition Time [min]: 0,2

2. Elution Step:

	Time (min)	Cross Flow (ml/min)	Type	Exponent
1	20,0	1,00	linear	1,00
2	I D	0,00	constant	1,00
3	I D	0,00		0,00
4	I D	0,00		0,00
5	I D	0,00		0,00

Run Time: 40 min

3. Rinse Step:

Rinse Step ON

Tip Pump [ml/min]: 0,10

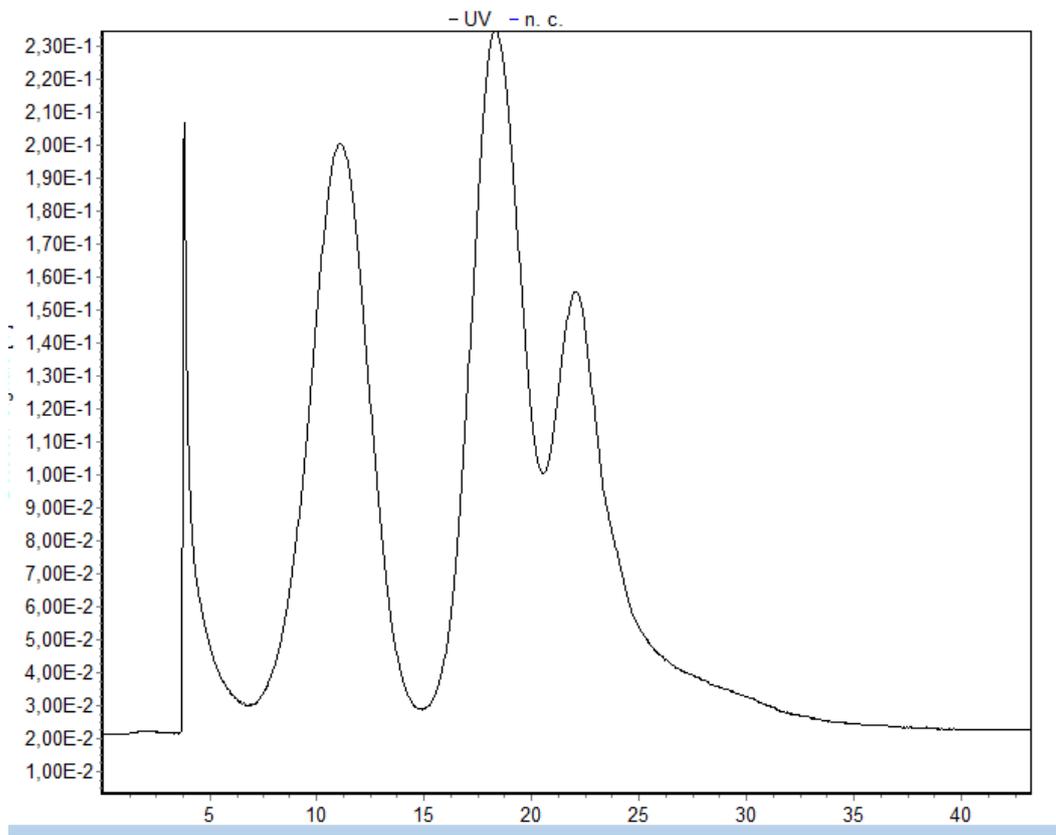
Slot Pump [ml/min]: 0,00

Purge Valve open

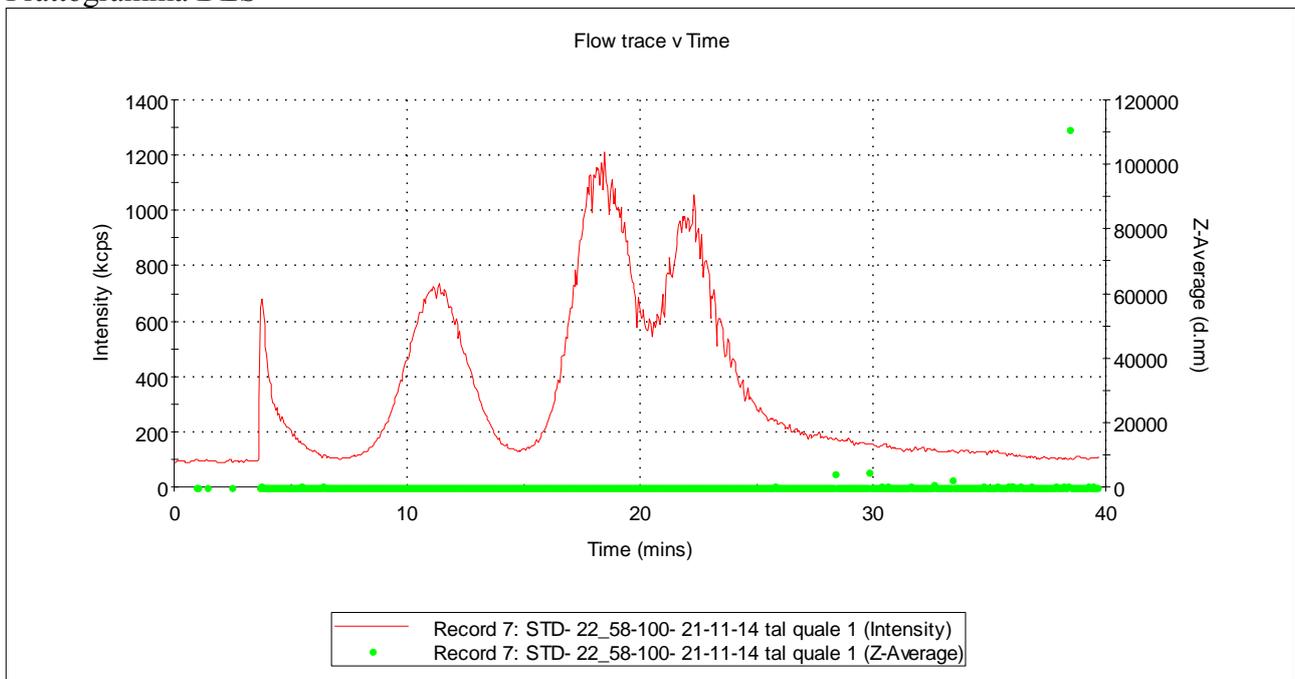
Focus Pump [ml/min]: 0,10

Time [min]: 0,1

Frattogramma FFF – sensitivity 0.001 per UV



Frattogramma DLS



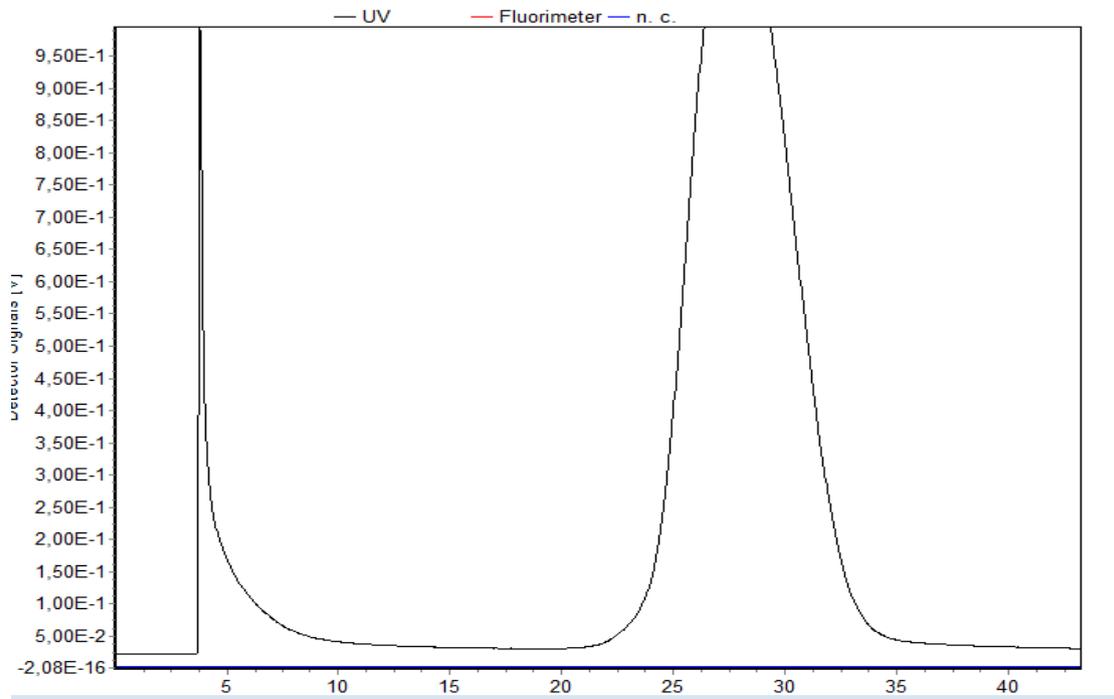
LIPOSOMI 220 nm

Metodo 5 (vedi sopra)

Eluente PBS

Concentrazione 10 mg/ml

Frattoграмма FFF – sensitivity 0.001 per UV



Frattoграмма DLS

