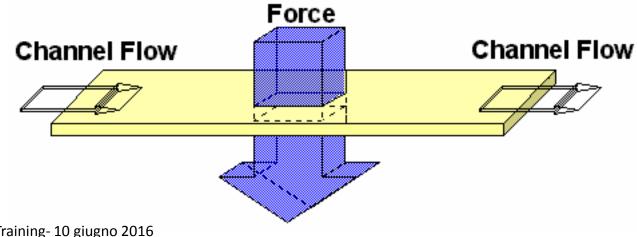
AF2000 MULTIFLOW FFF UNIVERSAL SEPARATOR



La tecnica di Frazionamento in Campo-Flusso (Field-Flow Fractionation, FFF) è stata sviluppata nella seconda metà degli anni '60 da Calvin Giddings, uno dei primi ricercatori ad essersi occupato anche di cromatografia liquida.

Il principio fondamentale della separazione FFF è l'applicazione di una forza normale (campo) alla direzione del flusso degli analiti che si intende separare, a sua volta confinato all'interno di un canale capillare a sezione rettangolare, in cui non è presente una fase stazionaria:



Training- 10 giugno 2016

Le tecniche di frazionamento in campo-flusso si distinguono in base alla natura del campo applicato dall'esterno. Le più diffuse sono: Flow-FFF; Thermal-FFF; gravitational-FFF; Sedimentation-FFF

Sviluppo e applicazione per separare e caratterizzare sospensioni di macromolecole, nanoparticelle e microparticelle di interesse biologico, ambientale, alimentare, ecc.. mantenendo le condizioni native e applicando condizioni soft ideali per campioni biologici.

VANTAGGI

- ✓ Assenza di fase stazionaria (canale vuoto) e di interazioni con il campione
 - ✓ Analisi del campione in condizioni native
 - ✓ Gentle separation adatta a campioni biologici
- ✓ Analisi di fenomeni di aggregazione di particelle/proteine

Analiti separabili in FFF

In generale gli analiti separabili in FFF devono avere dimensioni tali da risentire di campi come quello gravitazionale, piuttosto che di effetti diffusivi, che tenderebbero a renderne la concentrazione omogenea lungo la sezione del canale. Analiti tipici per separazioni FFF sono quindi:

Farmaceutica

Nanoparticelle organiche ed inorganiche liposomi, micelle, carrier supramolecolari, dispersioni colloidali, etc.

Bioanalitica/ Biotecnologie

peptidi, proteine, cromosomi, DNA, particelle subcellulari, lipoproteine, cellule, virus, lieviti, batteri, globuli rossi,polline,etc.

Chimica degli Alimenti

particelle di amido, emulsioni alimentari, lieviti, proteine, etc.

Scienza dei Materiali

nanoparticelle, nanotubi, metalli e ossidi metallici, catalizzatori, polimeri, pigmenti, etc.

CARATTERIZZAZIONE DI PROTEINE AD ALTO PESO MOLECOLARE E DI OLIGOMERI IN CONDIZIONI NON DENATURANTI

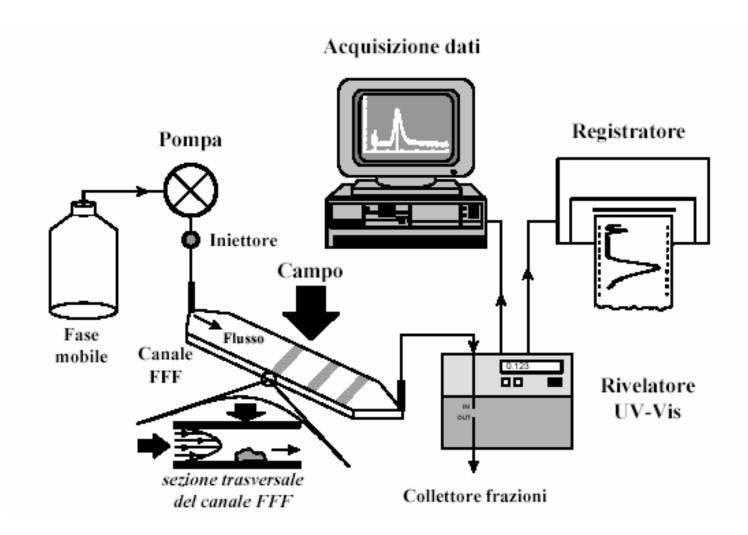
- ✓ Separare proteine ad alto peso molecolare e complessi proteici senza avere adsorbimento o interazioni con la fase stazionaria.
- ✓ Separare anticorpi monoclonali di loro aggregati oligomerici.
- ✓ Frazionare lipo-proteine a diversa densità: alta (HDL) bassa (LDL), molto bassa (VLDL).
- ✓ Non sono necessari modificatori organici o tamponi ad alta forza ionica come nel caso dell'HPLC in fase inversa o dell'elettroforesi capillare in cui, inoltre, l'alto voltaggio applicato può contribuire ad alterare la conformazione nativa delle proteine.
- ✓ Nel caso di proteine ad alto peso molecolare la selettività è più elevata che in cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC), con cui non è possibile analizzare aggregati proteici ad alto peso molecolare.
- ✓ La ritenzione è in linea di principio proporzionale al coefficiente di diffusione degli analiti e differenze nel tempo di ritenzione possono indicare non solo differenze nel peso molecolare, ma anche in conformazione (es. stato di aggregazione).

Strumentazione FFF simile a HPLC

- Pompa forza la fase mobile all'interno del canale FFF (channel flow)
- ➤ Una seconda pompa genera il flusso trasversale (cross flow)
- Una terza pompa genere il focus flow
- ➤ Campione introdotto mediante un iniettore posto fra la pompa e il canale
- > Rilevatore posto all'uscita del canale

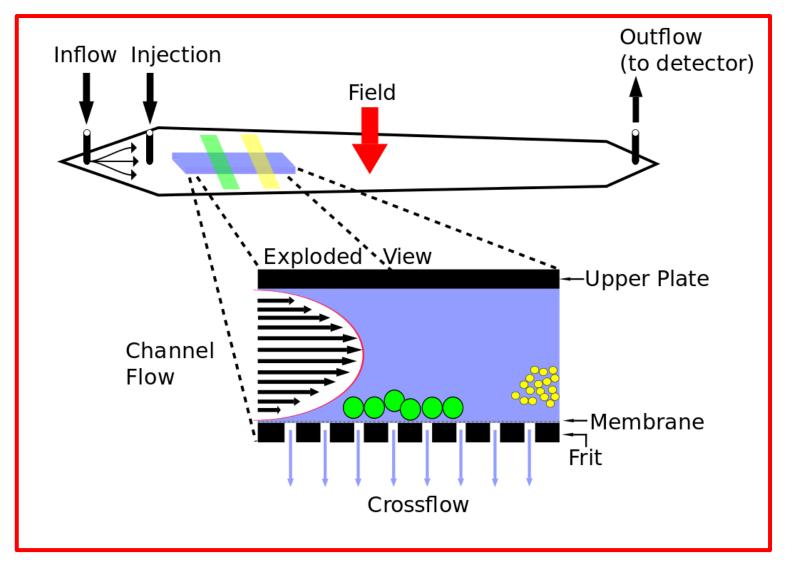


Accoppiamento con diversi tecniche di rivelazione quali UV, laser scattering (DLS o MALS), fluorimetria; chemiluminescenza (CL), spettrometria di massa (MS) etc.

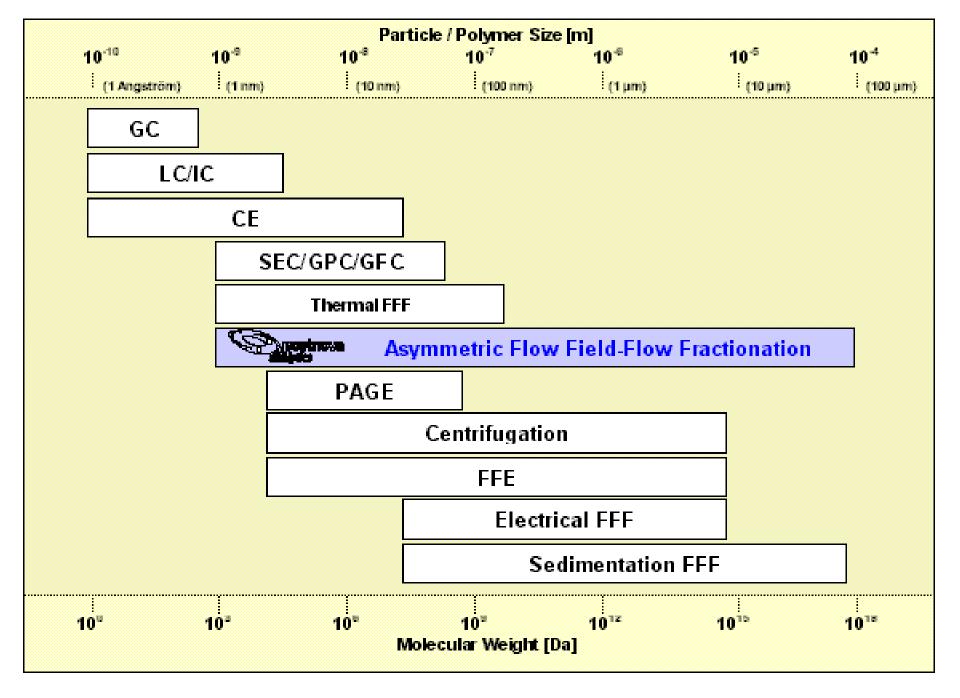


Flow-FFF asimmetrico

Si differenzia dal corrispondente simmetrico per il fatto che soltanto la parete inferiore è caratterizzata dalla presenza di un setto poroso (frit), posto sotto la membrana (cut off 10000 Da) destinata a trattenere il campione:



- ➤ All'interno del canale flusso idrodinamico (con profilo parabolico) della fase mobile.
- Ad esso si sovrappone l'azione del campo esterno applicato in direzione normale.
- In questo caso il flusso incrociato viene generato soltanto sulla parete inferiore del canale, di solito creando un'aspirazione dal basso del solvente.



Training- 10 giugno 2016

Flow-FFF accoppiato al DLS (Zetasizer-Malvern)

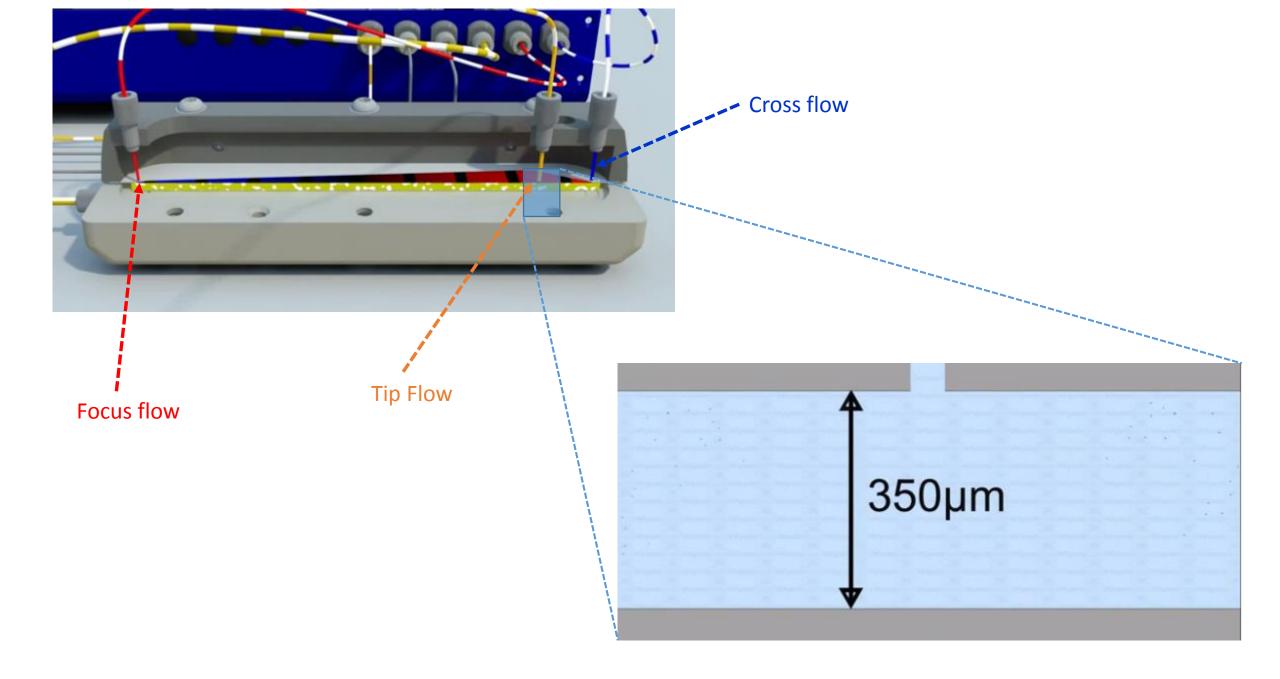
discriminare tutte le popolazioni, anche nel caso di particelle dimensioni vicine che la tecnica DLS non risolve. Un sistema Field Flow Fractionation FFF è in grado di separare per dimensione le nanoparticelle in un range che va da 1nm a 1 (10) micron: lo Zetasizer Nano viene equipaggiato con una cella a flusso e analizza on line il campione separato fornendo secondo dopo secondo l'esatta dimensione delle particelle separate.



E' inoltre possibile aggiungere altri detector per caratterizzare a 360° la dispersione di nanoparticelle: un detector UV fornirà la massa di particelle, eventualmente un detector di fluorescenza discriminerà eventuali particelle marcate.

Principali parametri operativi in FFF

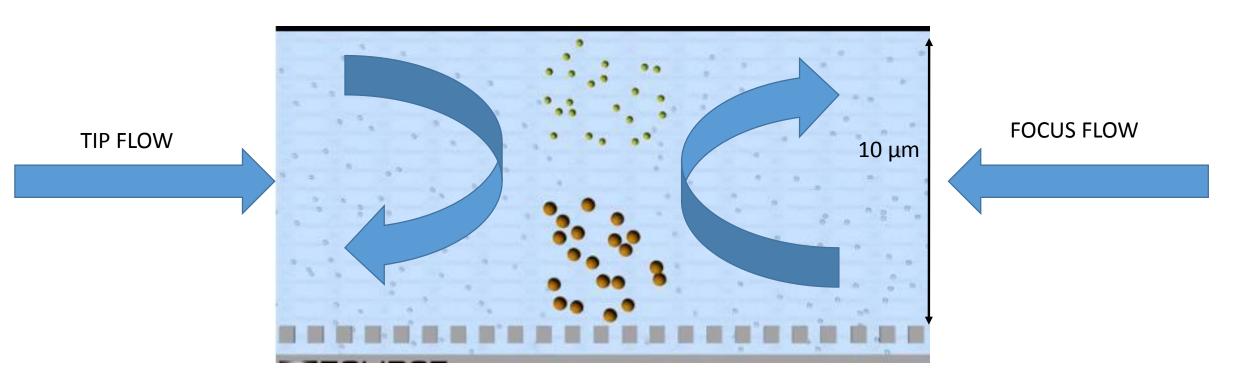
- ✓ Dimensioni tipiche del canale FFF: lunghezza da 30 a 100 cm, larghezza da 1 a 5 cm, spessore da 50 a 1000 μm.
- ✓ Quantità e volume di campione: le quantità iniettate variano da ng a mg, a seconda dei casi, mentre i volumi sono simili a quelli impiegati in HPLC, da 5 a 40 μL.
- ✓ Velocità di flusso: frazioni di mL/min
- ✓ Tempi di separazione: da 5 a 60 min



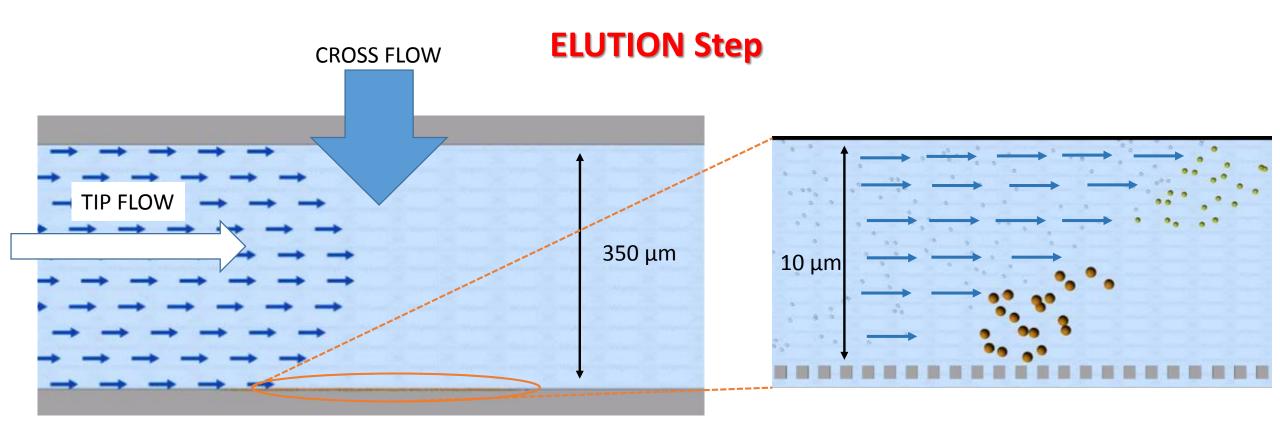
INJECTION Step La miscela delle particelle da separare viene introdotta nel canale tramite un reodyne. Vengono quindi attivati i due flussi in 350 μm controcorrente (tip e focus) e il flusso incrociato (cross). 10 µm

Training- 10 giugno 2016

FOCUSING Step (focalizzazione e rilassamento)



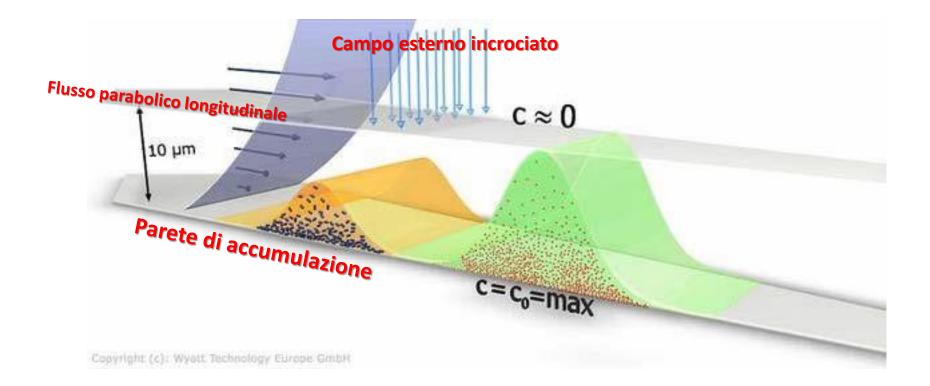
I flussi contrapposti (tip e focus) mantengono focalizzata la banda del campione nella quale i diversi analiti si portano all'elevazione di equilibrio sotto l'effetto del flusso incrociato e della diffusione.



Il flusso entrante dall'uscita del canale viene interrotto, per cui le particelle vengono spinte dal flusso laminare entrante. La separazione FFF di analiti di dimensioni supramolecolari, avviene sfruttando la differenza di velocità del liquido nel canale a seconda della distanza dalle pareti.

Il campo esterno incrociato (cross field) determina a quale quota uno degli analiti si troverà mediamente nel corso della separazione.

Le particelle più piccole tenderanno a stare ad una quota media superiore rispetto a quelle più grandi e dunque risentiranno di un flusso longitudinale maggiore, muovendosi più rapidamente delle altre.



Le particelle tenderanno a muoversi in prossimità di una delle due pareti del canale, detta pertanto parete di accumulazione.

Il tempo di eluizione delle particelle dall'interno del canale è tanto minore quanto maggiore è la loro quota o elevazione rispetto alla parete di accumulazione.

L'uscita delle particelle dal canale può essere monitorata con un rivelatore, ottenendo un responso detto frattogramma.

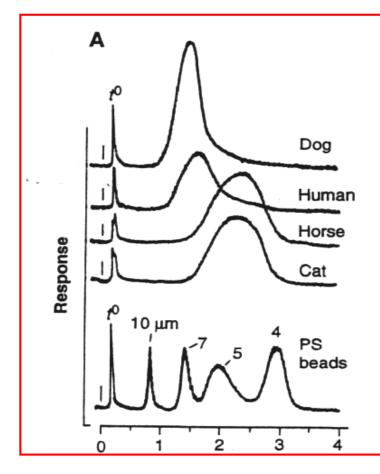
https://www.youtube.com/watch?v=nPA7AB7CecQ

https://www.youtube.com/watch?v=U8S6z-cvjko

Frazionamento in eluizione inversa

La tendenza delle particelle più grandi a sedimentare sul fondo del canale subisce un'inversione quando il loro diametro diventa superiore a 1 μm a causa di due fenomeni che tendono a farle sollevare dalla parete inferiore del canale, aumentandone così la velocità di eluizione. **Effetti sterici**: particelle di grandi dimensioni hanno un raggio tale (fino a 200 μm) che, di fatto, il loro centro non può avvicinarsi oltre un certo limite alla parete di accumulazione, restando così a quote alle quali il flusso longitudinale è relativamente elevato.

Effetti di galleggiamento: particelle di grandi dimensioni sono soggette ad una spinta diretta dal basso verso l'alto (per il principio di Archimede) che tende a portarle in strati posti a quote superiori (hyperlayers).

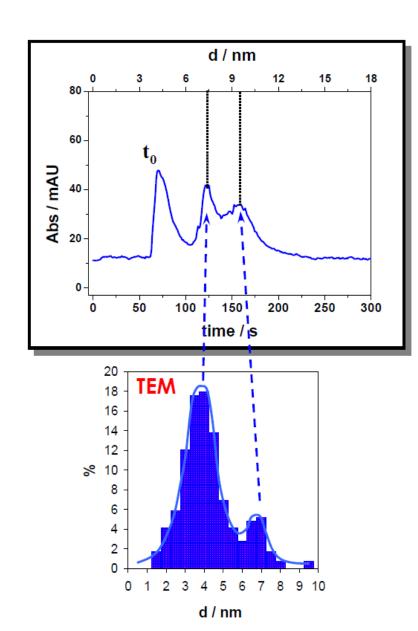


Esempio

Frazionamento di globuli rossi di specie diverse in modalità inversa.

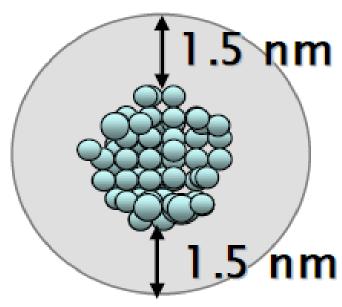
Un'idea approssimativa delle dimensioni delle cellule può essere ottenuta tarando il sistema mediante il frazionamento di sferette di polistirene (PS beads) di dimensioni note.

Frazionamento di nanoparticelle di tipo core-shell



La calibrazione del tempo di frazionamento in termini di dimensioni (diametro) consente di stabilire il diametro effettivo delle nanoparticelle.

La differenza di circa 3 nm osservata rispetto alle misure TEM indica che lo spessore dello strato esterno di tensioattivo delle nanoparticelle (trasparente al fascio elettronico del TEM) è di circa 1.5 nm.

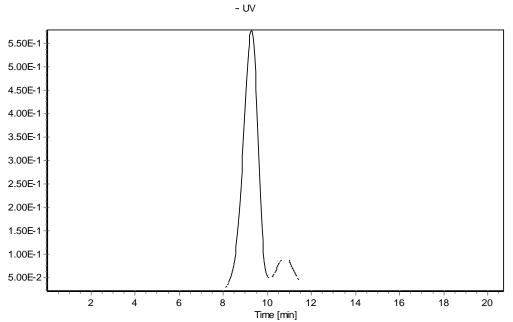


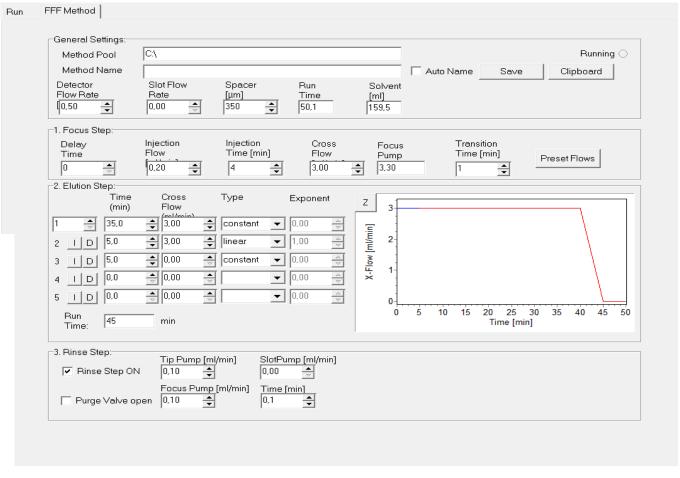
Training- 10 giugno 2016

METODO 1: separazione di proteine

> BSA (69000Da) e suo dimero

Metodo 1 Eluente NaCl 0.9% Concentrazione 5 mg/ml

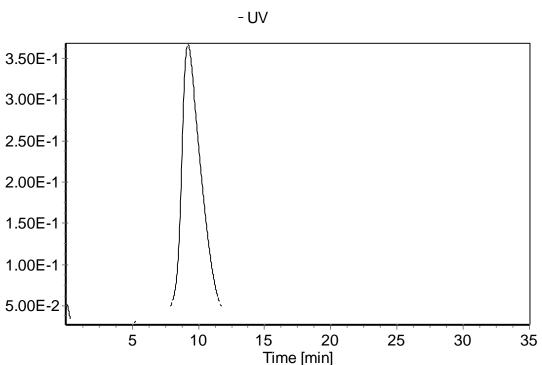


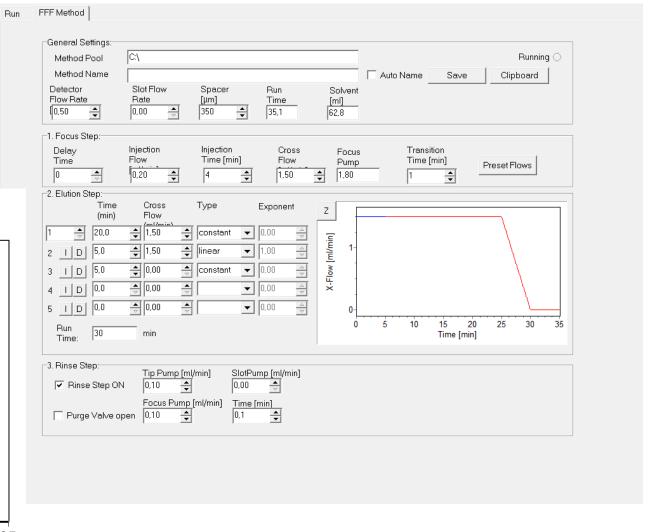


METODO 2: separazione di polimeri

> Polistirene sulfonato (64000 Da)

Metodo 2 Eluente NaCl 0.9% Concentrazione 10 mg/ml





METODO 3: separazione di nanoparticelle (< 100 nm)

FFF Method

General Settings

Method Pool

Method Name

C:\

Latex Mix

Running (

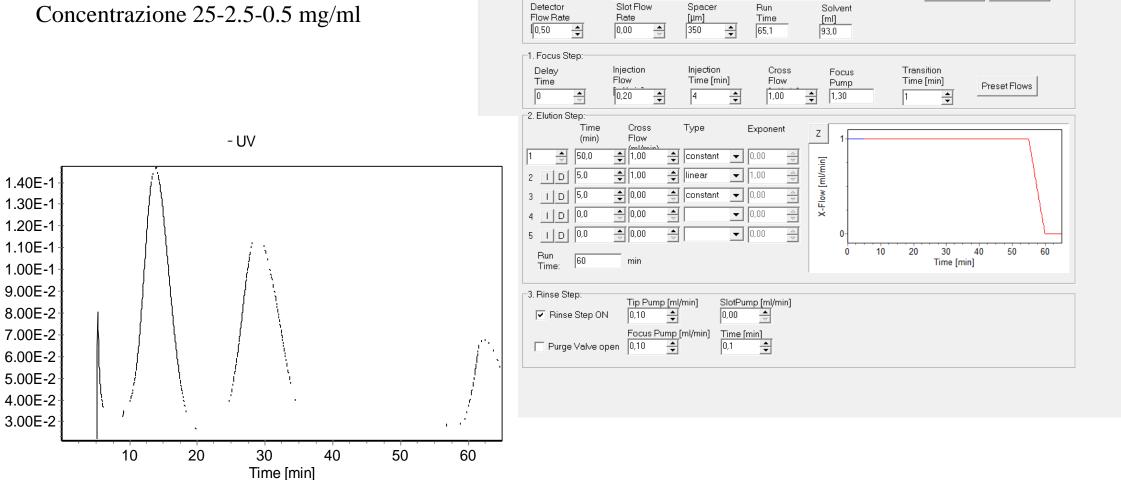
Clipboard

Auto Name

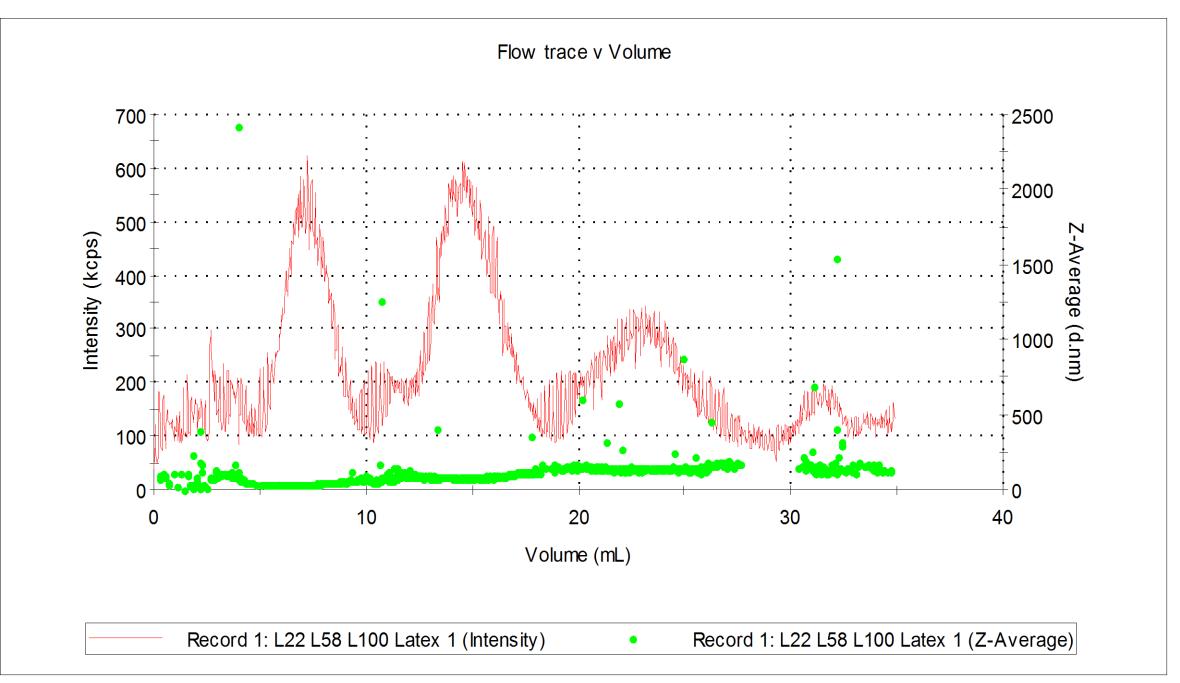
Save

➤ Latex mix nanoparticelle 22-58-100 nm

Metodo 3 Eluente Novachem 0.05% + NaCl 0.05% Concentrazione 25-2.5-0.5 mg/ml



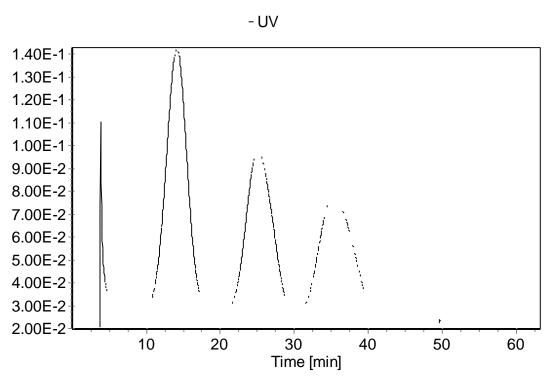
Training- 10 giugno 2016

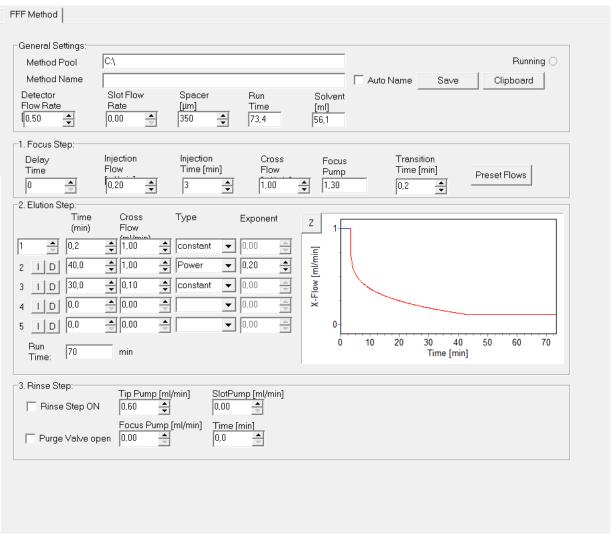


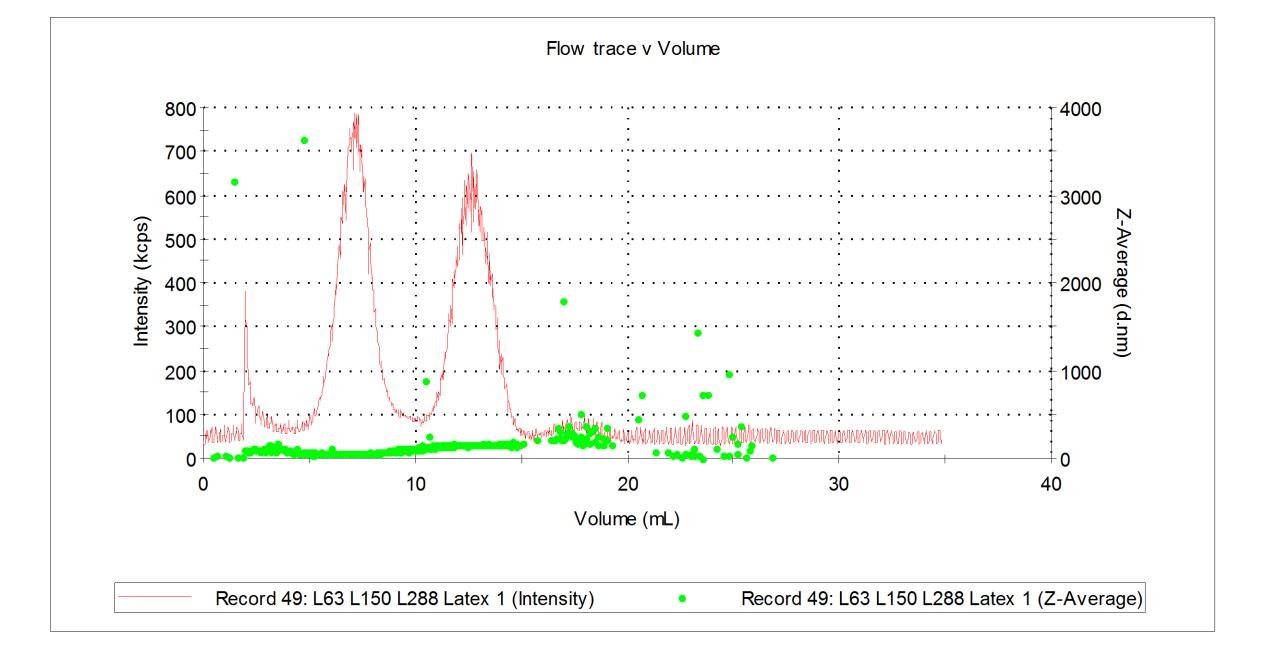
METODO 4: separazione di nanoparticelle (> 100 nm)

➤ 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 5: separazione di liposomi

➤ LIPOSOMI 220 nm

Metodo 5
Eluente PBS
Concentrazione 10 mg/ml

