

ESERCIZI – CROMATOGRAFIA SU COLONNA A BASSA PRESSIONE

A SPUNTI DI RIFLESSIONE

1. Spiegare che cosa si intende per **tailing** e **fronting** nel caso di bande cromatografiche su colonna, stabilendo un'analogia con quanto accade in TLC.

.....
.....
.....

2. Scegliere il tipo di eluente e prevedere, per quanto possibile, l'ordine di eluizione dei seguenti composti su colonna di allumina: *n*-ottano, butanolo, cloruro di isobutile, acido propionico.

.....
.....
.....

3. Su una colonna in fase inversa, costituita da un supporto in gel di silice chimicamente legato a catene C18, si sottopongono a separazione cromatografica, con un eluente polare, i seguenti composti: fenolo, *n*-decano, toluene, pentanolo. Prevedere la probabile sequenza di uscita, evidenziando i margini di incertezza e i motivi per cui non possono essere eliminati.

Quale eluente si potrebbe usare per questa separazione?

.....
.....
.....

4. Da un comune setaccio, escono per prime le particelle più piccole. Perché l'analogia fra i gel di esclusione e il setaccio (molecolare) non è valida?

.....
.....
.....

5. La selettività di un gel per SEC è pressoché indipendente dalle caratteristiche chimico-fisiche della fase mobile. Suggestire una spiegazione.

.....
.....
.....

6. Spesso, in SEC, accade che un dato componente della miscela abbia un volume di ritenzione maggiore del volume totale della fase mobile; in altri termini, il componente esce dopo la molecola più piccola del più piccolo poro di gel. Spiegare perché.

.....
.....
.....

7. L'efficienza delle colonne di Sephadex G-200 per SEC (100-200 mesh), nei confronti della sieralbumina, grosso modo si triplica al diminuire della velocità dell'eluente, passando da 75 a 25 mL/h. Suggestire una spiegazione del fenomeno.

.....
.....
.....

8. Da che cosa dipende la maggiore o minore affinità degli ioni nei confronti dei siti attivi (di carica opposta) di una resina a scambio ionico?

.....
.....
.....

9. Esiste una ben precisa relazione fra la bassa mobilità dello ione litio e la sua scarsa affinità verso i siti attivi di una colonna a scambio cationico; quale?

.....
.....
.....

10. Discutere il probabile ordine di uscita dei seguenti anioni dalla colonna di una resina a scambio anionico forte: HSO_3^- , HSO_4^- , F^- .

.....
.....
.....

11. Discutere il probabile ordine di uscita dei seguenti cationi dalla colonna di una resina a scambio cationico forte: Be^{2+} , Pb^{2+} , Na^+ .

.....
.....
.....

12. Discutere l'effetto del pH dell'eluente sulla forza con cui i siti attivi di una resina cationica forte e di una resina cationica debole attraggono gli ioni da separare.

.....
.....
.....

13. In che modo la programmazione del pH dell'eluente può essere sfruttata per separare una miscela di amminoacidi in IEC? Quale proprietà caratteristica di questi ultimi viene sfruttata per ottenere tale separazione e prevedere l'ordine di uscita?

.....
.....
.....

14. Perché le particelle di una classica resina per IEC non devono mai essere introdotte in colonna in forma disidratata?

.....
.....
.....

15. Lo ione Co^{2+} forma, con lo ione cloruro, complessi particolarmente stabili; ciò non accade invece per lo ione Ni^{2+} . È dunque possibile separare i due ioni usando indifferentemente resine cationiche o resine anioniche?

.....
.....
.....

B PROBLEMI NUMERICI

1. Una colonna riempita di gel per cromatografia di esclusione ha un limite di esclusione di 50 000, cui corrisponde un volume di ritenzione (V_0) di 18 mL. Il limite di permeazione è 15 000 e si riferisce a molecole che vengono eluite con un volume di ritenzione (V_R) di 107 mL.

Considerando quanto deve necessariamente valere, per molecole con $MM = 15\,000$, la relativa costante di distribuzione (K_0), calcolare il volume interno (V_i), ossia il volume dei pori nelle particelle di gel.

Sapendo inoltre che una determinata macromolecola è stata eluita con un volume di ritenzione di 85 mL, calcolare la relativa costante di distribuzione.

.....
.....
.....
.....

2. Quando si effettua una separazione di macromolecole (come ad esempio le proteine) in SEC, il blu destrano ($MM = 2 \cdot 10^6$) viene spesso usato per determinare il volume morto (V_0), mentre la riboflavina (di massa molare relativamente piccola) è usata per misurare il volume totale della fase mobile (V_t).

In un esperimento condotto con BioGel P-30 (BioRad) si sono misurati: $V_0 = 2$ mL e $V_t = 8,5$ mL. Calcolare il valore di K_0 per il citocromo C ($MM = 12\,400$), sapendo che ha dato $V_R = 4$ mL.

[Fonte: HA Rowe, «An inexpensive gel-filtration chromatography experiment», *J. Chem. Ed.*, **70**, 5 (maggio 1993)]

.....
.....
.....
.....

3. Calcolare la costante di distribuzione (K_g , riferita alla resina nella forma idratata) dello zinco su una resina a scambio ionico, sapendo che a questo scopo 100 mL di una soluzione contenente 1 g/L di $ZnSO_4$ in HCl 0,5 M sono stati posti in equilibrio con 1,9 g di una resina cationica forte ($d = 0,70$ g/mL). Successivamente 25 mL di soluzione hanno richiesto, per la titolazione, 14,10 mL di EDTA 0,00986 M. [MM(Zn) = 65,38 g/mol]

.....
.....
.....
.....

4. Un campione di 4,786 g contenente KNO_3 e altre sostanze non ioniche viene disciolto in 250 mL di acqua. Successivamente 25 mL di tale soluzione sono fatti passare attraverso una resina a scambio cationico in forma acida e l'effluente viene titolato con 12,30 mL di NaOH 0,2268 M. Calcolare la percentuale di KNO_3 nel campione.

.....
.....
.....
.....

