

Esercitazione 8: cromatografia di esclusione molecolare su colonna.

Scopo: separazione di molecole di diverso peso molecolare da una miscela

MATERIALE A DISPOSIZIONE

- Colonna cromatografica Biorad (diametro interno 0,7 cm e lunghezza 30 cm) con rubinetto e supporto. Contiene la resina Bio Gel P10 medium in tampone fosfato 0,05 M pH=7,4 degassata. Intervallo di separazione della resina: 1500 – 20000 MM, grandezza delle particelle di resine 90-180 μ m
- Tampone fosfato 0,2 M pH 7,4
- Acqua degassata e filtrata (H₂O df)
- siringa di plastica da 50 mL con supporto
- pipette tipo Gilson e Pasteur
- Miscela da separare: eppendorf con blu destrano (MM ~2000000k) 3 mg/mL, Citocromo C (MM 12500) 1,8 mg/mL, tartrazina (colorante alimentare) (MM 534,36) 0,4 mg/mL in tamp fosfato 50 mM, pH 7,4;
- prendete la vetreria adatta
- Detector: i vostri occhi!

PROTOCOLLO: SEPARAZIONE DI SOSTANZE COLORATE; DETERMINAZIONE DI V₀

1. In un cilindro, preparate 100 mL di tampone fosfato 50 mM pH 7,4 (Fase mobile) usando H₂O df
2. Aggiungete 50 mL di tampone fosfato nella siringa, tenete il rubinetto a tre vie chiuso e posizionate il tappo giallo della colonna all'interno della siringa stessa in modo da non perdere il solvente (*durante la separazione dovete sempre controllare che il livello della soluzione non si abbassi troppo, nel caso aggiungetene dell'altra*). Il rubinetto a tre vie serve per connettere la siringa alla colonna e allo stesso tempo a non fare entrare aria nella colonna. La levetta ha tre posizioni: in alto = rubinetto chiuso; a destra = aperto a 180°; in basso = aperto a 90°.
3. Assicuratevi che ci sia sufficiente soluzione sopra la resina in colonna.
4. Abbassate la siringa in modo che si trovi poco al di sopra della colonna. Collegate la siringa alla colonna utilizzando il tappo giallo. Posizionate la levetta del rubinetto a tre vie in basso: in questo modo uscirà l'aria. Quando esce la soluzione, girate la levetta a destra, e così la soluzione entrerà in colonna. Quando manovrate il rubinetto a tre vie, usate due mani: con una lo tenete fermo e con l'altra girate la levetta. A questo punto alzate la siringa sul supporto; aumenterà il flusso in colonna.
5. Posizionate un becker sotto la colonna e aprite il rubinetto alla base della colonna. (*Se la bottiglia e la colonna sono ben collegati dovreste vedere fuoriuscire il liquido dalla base della colonna e contemporaneamente gocciolare tampone all'interno della stessa*). Regolando l'altezza della siringa, potete regolare il flusso dell'eluente.
6. Fate fluire attraverso la resina un po' di soluzione tampone (per circa 10 min). Nel frattempo calcolate il letto della colonna (il letto della colonna è il volume occupato dalla resina e dal solvente che la bagna; **potete calcolarlo con i dati a vostra disposizione - DIAMETRO E LUNGHEZZA DEL LETTO DI RESINA CHE VA MISURATA**). (*Bisogna equilibrare la colonna facendo fluire un volume corrispondente a 2 letti di resina; questo è già stato fatto*).
7. Numerate una serie di eppendorf da 1 a 24 circa e tenetele da parte (siate pronti a numerarne di più in caso di necessità)
8. Nel frattempo calcolate il flusso della fase mobile in mL/min (*per fare questo prendete una provetta eppendorf 1,5 mL e raccogliete 1 mL misurando il tempo necessario. A questo punto potete calcolare la velocità con cui fluisce la soluzione tampone attraverso la colonna*). Prendete nota dell'altezza della siringa rispetto alla colonna, in modo da mantenere circa lo stesso flusso di eluente.

9. Chiudete il rubinetto alla base della colonna, posizionate la levetta del rubinetto superiore in alto e lentamente aprite il tappo superiore giallo. Appoggiate il tappo giallo sulla siringa.
10. Con una pipetta Pasteur prelevate DELICATAMENTE la soluzione sopra il letto di resina, SENZA disturbare, toccare o rimuovere la resina.
11. Aprite il rubinetto alla base della colonna e fate uscire il tampone finché il menisco raggiunge la superficie della resina (*fate attenzione a non mandare a secco la resina*).
12. Prelevate 200 μL di miscela da separare con una pipetta Pasteur o con una pipetta Gilson, e caricatela delicatamente sulla resina (*cercando di disturbare il meno possibile il letto della colonna*). **Da questo momento raccogliete il volume che esce dalla colonna allo scopo di calcolare V_0 .**
13. Aprite il rubinetto alla base della colonna e fate uscire la fase mobile in modo che tutto il campione caricato entri nella resina e richiudete subito il rubinetto alla base della colonna.
14. Aggiungete 200 μL di tampone fosfato, sempre lentamente e facendo scendere il tampone lungo la parete della colonna. Aprite il rubinetto alla base della colonna in modo da far entrare bene il tampone nella resina. Quando non c'è liquido sopra la resina chiudete il rubinetto.
15. Aggiungete, sempre lentamente, facendo scendere il tampone lungo la parete della colonna, alcuni mL di tampone sopra la resina
16. Collegate la colonna con la siringa in questo modo: abbassate la siringa sotto la posizione della colonna, in modo che non esca solvente, ponete il tappo superiore giallo sopra la colonna e quando premete il tappo sulla colonna, girate la levetta del rubinetto a tre vie in basso (aperto a 90°) in modo da far uscire l'aria.
17. Posizionate la levetta in alto, alzate la siringa alla stessa posizione di prima e posizionate la levetta in basso in modo da far uscire l'aria. Quando comincia ad uscire soluzione, girate il rubinetto per far entrare la soluzione in colonna.
18. Aprite il rubinetto alla base della colonna e raccogliete la soluzione in uscita nelle eppendorf (1 mL in ogni provetta. Poco prima che inizi ad uscire il blu destrano, raccogliete 0,5 mL in ogni eppendorf di soluzione in uscita dalla colonna. (Conviene segnare con un pennarello le tacche corrispondenti a 0,5 e 1 mL sulle eppendorf per renderle più visibili).
19. Osservate la separazione e raccogliete nelle provette l'eluato fino all'uscita dell'ultima sostanza
20. Confrontate le eppendorf che avete ottenuto. Dovreste aver separato i tre composti.
21. A questo punto, anche se i risultati non saranno molto precisi, calcolate:
 - V escluso (V_0) della vostra colonna e il tempo morto (t_M)
 - V di eluizione di ogni composto (in un cromatogramma dovreste prendere la sommità del picco, che corrisponde alla provetta con più campione; nel vostro caso corrisponde alla provetta con colorazione più intensa)
 - il tempo di ritenzione (t_R) e il tempo netto di ritenzione (t_S) per ogni composto