SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

OBJETIVOS Estudo de procedimentos de separação e recuperação de compostos por cromatografia de permeação em gel.

MATERIAIS

Colunas de vidro de 1 cm de diametro – determinar a altura de leito para calcular o volume total.

Amostra: mistura de blue dextran, cianocobalamina, riboflavina

Gel: sephadex G50 ( faixa separaçao: 1500- 30.000)

PROCEDIMENTO

1. Inicie o procedimento de ajuste da coluna de permeação em gel recebida no laboratório através da eliminação de quase todo o líquido visível acima do limite de gel.
2. Determine o volume do gel na coluna pela medição da altura do leito. O diametro interno da coluna é 1 cm.
3. Adicione cerca de 10 mL de eluente (tampão citrato de sódio pH 5,0) e determine o fluxo.
4. Quando o líquido acima do limite de gel for da ordem de 0,2 mL adicione 0,5 mL da amostra recebida e deixe eluir.
5. Imediatamente comece a coletar frações de 2 mL com o auxílio de pequenas provetas.
6. Quando o líquido acima do gel for da ordem de 0,2 mL. Adicione lentamente cerca de 10 mL de tampão e mantenha o nível de eluente sempre no topo da coluna.
7. Continue coletando frações de 2 mL. Cada fração coletada deve ser transferida para um tubo de de ensaio devidamente numerado.
8. Determinar o volume de eluição de cada amostra.
9. Determine quando é o momento de terminar a cromatografia ainda durante a realização do experimento.
10. Determinar o volume de eluição de cada amostra.