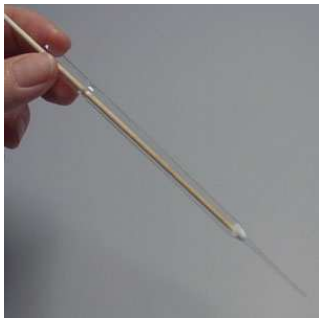
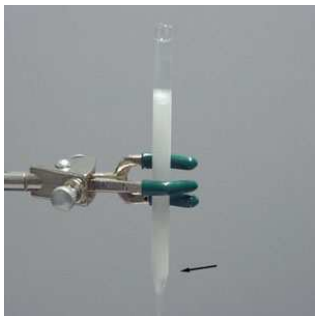
Separazione cromatografica su colonna di due coloranti

I coloranti da separare sono la fluoresceina ed il blu di metilene.



Preparare una colonna cromatografica inserendo un piccolo batuffolo di lana di vetro dentro una pipetta di vetro. La lana di vetro deve essere premuta cautamente verso il fondo della pipetta.

Aggiungere una certa quantità di gel di silice fino ad arrivare alla tacca superiore. Cercare di impaccare bene la fase stazionaria battendo leggermente la pipetta con una matita. Porre la pipetta sopra una provetta dopo averla previamente inserita dentro un tappo di gomma forato. La provetta andrà fissata mediante un morsetto ad un sostegno.



Condizionare la colonna con **l'eluente n° 1** (acqua/1-propanolo/acetone, 1:1:1).

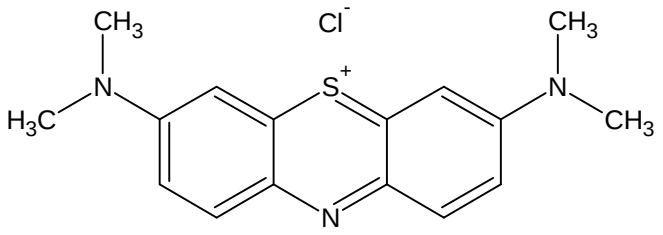
La miscela da separare contiene fluoresceina e blu di metilene in etanolo (1 mg di ogni colorante per mL di etanolo). Aggiungere due gocce della miscela alla testa della colonna, facendo attenzione a depositarle immediatamente sopra lo strato del gel.

Riempire la colonna fino alla sommità con l'eluente n° 1 e cominciare a raccogliere frazioni di circa 1 mL.

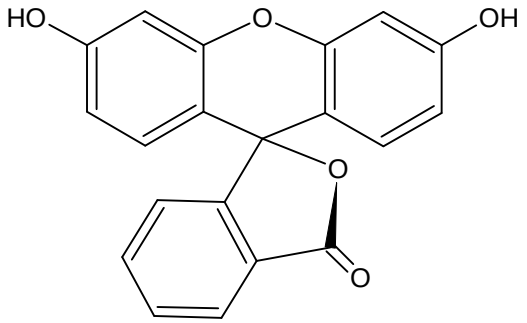
Il livello del solvente deve essere sempre mantenuto sopra quello della fase stazionaria, quindi bisogna continuamente rabboccarlo. I componenti della miscela si separeranno molto rapidamente. La prima sostanza ad essere eluita sarà la fluoresceina. Una volta eluita completamente sarà necessario cambiare eluente.

Preparare **l'eluente n° 2** (acqua/2-propanolo/acetone/acido acetico, 1:1:1) e caricare con esso la testa della colonna. Anche il blu di metilene comincerà a percolare attraverso la fase stazionaria. Al termine della separazione con colonna, sviluppare le varie frazioni su TLC per vedere se la separazione della miscela è stata efficace. Utilizzare delle lastrine di gel di silice ed un eluente costituito da 2-propanolo/acido acetico (15:2 v/v). Seminare anche i composti puri da utilizzare come riferimento per il calcolo dell'Rf.

Assegnare a ciascuna delle due formule il nome, dopo aver eseguito la prova.



_____



_____