
Opgave 1

Welke kolom zal een betere scheiding geven: een lange dunne of een korte brede met gelijke inhoud?

Hoe langer en dunner, des te meer contact hebben de moleculen met de wand.

Opgave 2

Waarom mag de kolom niet heel lang zijn?

In een langere kolom is er meer contact met de stationaire fase. De moleculen worden dus meer afgeremd. De meting kost dan ook meer tijd.

Opgave 3

Met welke van de besproken chromatografische scheidingen kan elk van de volgende verbindingstypen het best gescheiden worden?

We hebben als scheidingsprincipes:

verdeling door verschil in oplosbaarheid,

verschil in adsorptie,

aanhechting door ionlading,

verschillen in molecuulgrootte.

- | | |
|--------------------------------|---|
| a suikers | <i>suikers zijn polair (OH-groepen)</i> |
| b aminozuren | <i>aminozuren zijn polair en in water altijd ionen</i> |
| c alkanolen | <i>alkanolen zijn polair (OH-groepen)</i> |
| d vetzuren | <i>vetzuren zijn zwak polair, lange α-polaire staart</i> |
| e eiwitten | <i>macromoleculen die sterk verschillen in grootte maar ook in polariteit</i> |
| f zouten (zeewater) | <i>ionen</i> |
| g aromatische koolwaterstoffen | <i>apolaire stoffen</i> |
| h fenolen | <i>zwakke zuren, polair deel in het molecuul</i> |

verdeling: a, c, d, g, h

adsorptie: a, c, d, g, h

ionenwisseling: b, f

molecuulgrootte: e

Opgave 4

Welke componenten worden op silica met een zwak polair eluens het sterkst afgeremd:

Het meest polaire molecuul wordt het sterkst afgeremd.

- a fenol of hydrochinon (1,4-dihydroxybenzeen)
hydrochinon want heeft twee polaire groepen en fenol één
- b butanol of butanon
butanol is iets meer polair door de eindstandige OH-groep
- c octaan of octanon
octanon heeft een polaire groep, octaan niet
- d nitrobenzeen of 1,4-dinitrobenzeen?
1,4-dinitrobenzeen heeft twee polaire nitro-groepen, nitrobenzeen maar één

Opgave 5

Men gebruikt silicagel als adsorbens, hoe verandert de snelheid van de elutie als men de polariteit van het elutiemiddel verhoogt?

Dan gaat de elutie sneller.

- 1 Het eluens neemt de polaire component beter mee.*
- 2 Het eluens verdringt de component ook nog van de stationaire fase.*

Opgave 6

De verdelingscoëfficiënten van stoffen A, B en C zijn: $K_A = 0,50$; $K_B = 0,20$ en $K_C = 0,75$. In welke volgorde komen de stoffen uit de kolom?

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

Hoe groter K des te groter c_s (concentratie op stationaire fase) des te sterker de afremming. dus:

Minst afgeremd met $K = 0,2$: B dan met $K = 0,5$: A en als laatste met $K = 0,75$: C.

Opgave 7

We passen gelfiltratie toe op drie suikers: glucose ($C_6H_{12}O_6$), raffinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) en sucrose ($C_{11}H_{22}O_{11}$).

In welke volgorde worden zij geëlueerd?

Het kleinste molecuul wordt het sterkst geremd, dus:

1 grootste molecuul: raffinose, 2: sucrose, 3 kleinste molecuul: glucose

Opgave 8

Een mengsel van NaCl, CuCl₂ en AlCl₃ wordt over een kationenwisselaar (in zure vorm) geëluëerd. In welke volgorde komen de ionen uit de kolom?

De stationaire fase bestaat uit negatieve ionen met hierop H⁺ gebonden. Deze H⁺ kan loslaten, dan neemt een positief ion zijn plaats in. Hoe hoger de positieve lading van het ion des te sterker de aanhechting. Negatieve ionen worden eerder afgestoten dan vastgehouden. Dus:

1: Cl⁻ 2: Na⁺ 3: Cu²⁺ 4: Al³⁺

Opgave 9

Een mengsel van NaCl, Na₂SO₄ en Na₃PO₄ wordt over een anionenwisselaar (in basische vorm) geëluëerd. In welke volgorde komen de ionen uit de kolom?

Op een anionenwisselaar worden de anionen (min-ionen) vastgehouden. Hoe hoger de lading des te sterker de hechting. Dus:

1: Na⁺ 2: Cl⁻ 3: SO₄²⁻ 4: PO₄³⁻

Opgave 10

Een mengsel van arginine, histidine en lysine wordt bij pH = 7,0 over een **kationen**wisselaar geleid. In welke volgorde komen de aminozuren uit de kolom?

Op een kationenwisselaar worden de anionen (min-ionen) vastgehouden. Hoe hoger de lading des te sterker de hechting.

Een aminozuur is bij een pH lager dan het IEP gemiddeld positief, bij pH boven IEP negatief.

*arginine IEP: 11,2 dus bij pH = 7,0 **heel veel positief** geladen deeltjes: sterk afgeremd*

*histidine IEP: 7,5 dus bij pH = 7,0 **positief** geladen deeltjes: beetje afgeremd*

*lysine IEP: 9,6 dus bij pH = 7,0 **veel positief** geladen deeltjes: vrij sterk afgeremd*

Hoogste pluslading het sterkst geremd:

1: His, 2: Lys, 3: Arg

Opgave 11

Een mengsel van alanine, asparagine, histidine en glutaminezuur wordt bij pH = 8,0 over een **anionen**wisselaar geleid. In welke volgorde komen de aminozuren uit de kolom?

IEP Ala: 6,0; Asn: 5,4; His: 7,5; Glu: 3,2

Een aminozuur is bij een pH boven IEP negatief.

alanine veel negatieve deeltjes

asparagine heel veel negatieve deeltjes

histidine vooral negatieve deeltjes

glutaminezuur vrijwel alleen negatieve deeltjes

Met de meeste negatieve lading het sterkst geremd:

1: His, 2: Ala, 3: Asn 4: Glu

Opgave 12

Bepaal uit afbeelding 18.17:

- de netto retentietijden van componenten A, B, C, D en E
- de relatieve retenties van B, C, D, en E ten opzichte van A.
- de selectiviteitsfactor voor A en B, C en D, D en E.

netto retentietijd: $t'_R = t_R - t_M$

relatieve retentie: $r = \frac{t'_{R,3}}{t'_{R,1}}$

scheidingsfactor: $\alpha = \frac{t'_{R,B}}{t'_{R,A}}$

Afgelezen waarden uit de afbeelding zijn natuurlijk schattingen. Uitkomsten ongeveer:

	t_R (min)	t'_R (min)	r	α	$t_M = 1,25$ min
A	2,6	1,3			
B	3,8	2,6	2,0	2,0	
C	5,1	3,9	3,0		
D	5,7	4,5	3,4	1,2	
E	7,1	5,8	4,5	1,3	

Opgave 13

Hoe groot is de resolutiefactor voor de pieken in de bovenstaande afbeelding (18.18)?

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{(gem)}}$$

$$\Delta t_R \approx 4,31 - 3,5 = 0,81$$

$$W_{gem} \approx (0,42 + 0,64) / 2 = 0,53$$

$$R_s = 0,81 / 0,53 = 1,5$$

Opgave 14

- a Hoe groot is de resolutiefactor bij benadering voor de pieken 1 en 2 in afbeelding 18.19 voor A, B en C?

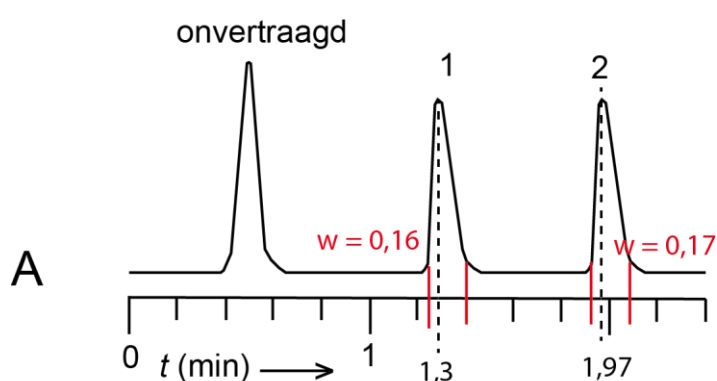
$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{(gem)}}$$

A

$$\Delta t_R \approx 1,97 - 1,3 = 0,67$$

$$W_{gem} \approx (0,16 + 0,17) / 2 = 0,165$$

$$R_s = 0,67 / 0,165 = 4,1 (\pm 0,2)$$

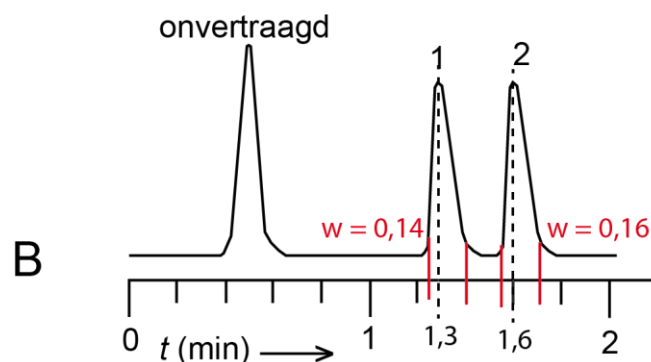


B

$$\Delta t_R \approx 1,6 - 1,3 = 0,3$$

$$W_{gem} \approx (0,16 + 0,14) / 2 = 0,15$$

$$R_s = 0,3 / 0,15 = 2,0 (\pm 0,2)$$

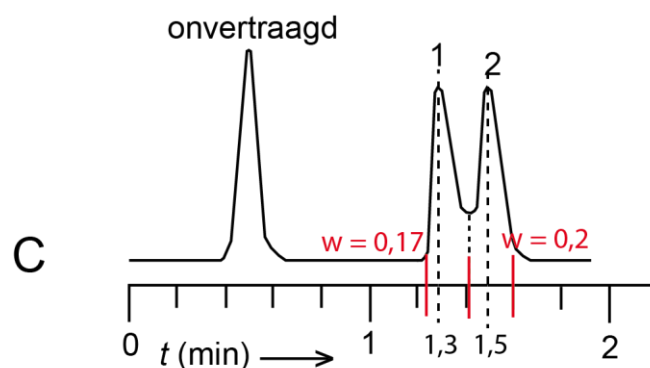


C

$$\Delta t_R \approx 1,5 - 1,3 = 0,2$$

$$W_{gem} \approx (0,2 + 0,17) / 2 = 0,19$$

$$R_s = 0,2 / 0,19 = 1,1 (\pm 0,2)$$

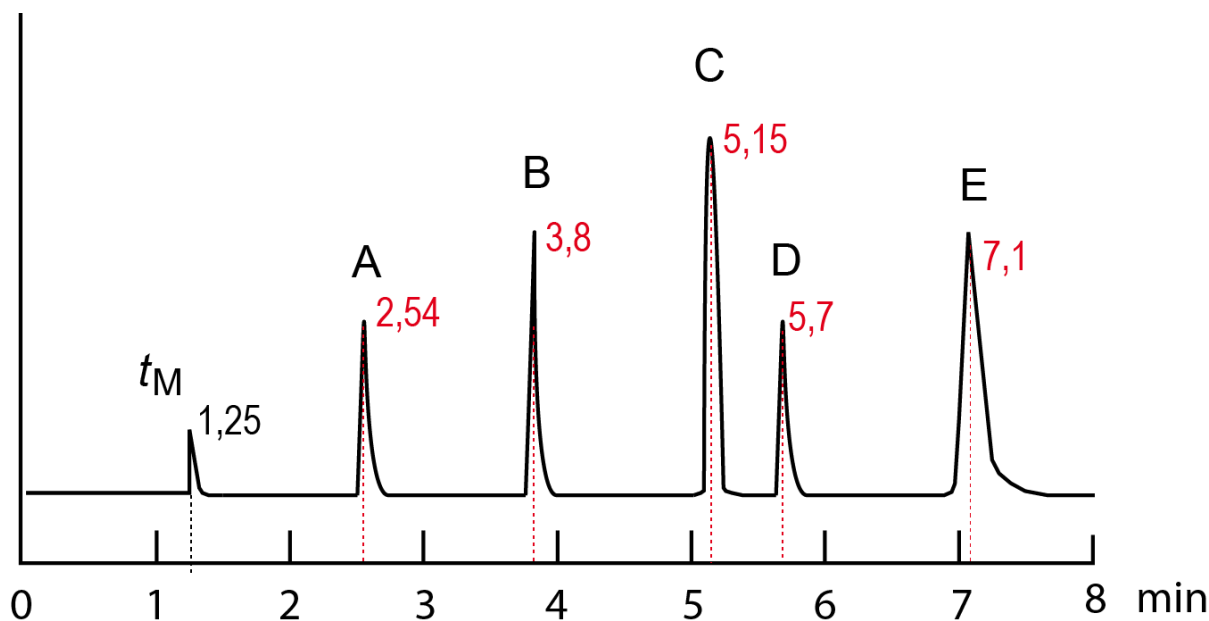


- b Wat zou een veilige minimale waarde zijn voor R_s ?

Bij C is er geen goede scheiding meer bij B nog juist wel dus een minimale waarde voor R_s is dan in de orde van 2.

Opgave 15

Bepaal uit onderstaande afbeelding (18.21) k' voor de componenten A, B, C, D en E.



$$k' = \frac{t'_R}{t_M}$$

A	$t'_R = 2,54 - 1,25 = 1,3 \text{ min}$	$k' = 1,3 / 1,25 = 1,0$
B	$t'_R = 3,8 - 1,25 = 2,6 \text{ min}$	$k' = 2,6 / 1,25 = 2,1$
C	$t'_R = 5,15 - 1,25 = 3,9 \text{ min}$	$k' = 3,9 / 1,25 = 3,1$
D	$t'_R = 5,7 - 1,25 = 4,45 \text{ min}$	$k' = 4,45 / 1,25 = 3,6$
E	$t'_R = 7,1 - 1,25 = 5,9 \text{ min}$	$k' = 5,9 / 1,25 = 4,7$

Opgave 16

Van een onvertraagde component wordt gemeten: $t_M = 2,5 \text{ min}$.

Van een component wordt gemeten: $t_R = 7,5 \text{ min}$.

a Bereken k' .

$$k' = \frac{t'_R}{t_M}$$

$$k' = (7,5 - 2,5) / 2,5 = 2,0$$

- b Welk deel van de totale analysetijd brengt de component door in de mobiele fase?

Elke component brengt dezelfde tijd in de mobiele fase door: t_M

Totale analysetijd: 7,5 min. $t_M = 2,5$ min

Dus het deel van de totale analysetijd: $2,5 / 7,5 = 1/3^e$ deel

- c Het volume van de mobiele fase is 20 maal zo groot als de die van de stationaire fase, bereken K .

$$k' = K \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad \blacktriangleright \quad 2,0 = K \times 1/20 \quad \blacktriangleright \quad K = 40$$

Opgave 17

- a Hoe groot is de retentiefactor voor een component die onvertraagd door de kolom gaat?

Onvertraagd dus $t_M = t_R$. En dus: $t'_R = t_R - t_M = 0$ en: $k' = t'_R / t_M = 0$

Onvertraagd: er is dus geen retentie (vertraging).

- b Hoe groot is de retentiefactor als de hoeveelheid stof in de mobiele fase even groot is als die in de stationaire fase?

De hoeveelheid stof die met de mobiele fase mee reist is even groot als de hoeveelheid die vertraagd wordt. De vertragingstijd is even groot als de reistijd dus $k' = t'_R / t_M = 1$.

$$\text{In formule: } k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{n_{\text{stationair}}}{n_{\text{mobiel}}} = \frac{c_s \cdot V_s}{c_m \cdot V_s}$$

$$n_{\text{stationair}} = n_{\text{mobiel}} \quad \text{dus } n_{\text{stationair}} / n_{\text{mobiel}} = 1$$

- c Hoe lang duurt de meting als $t_M = 20$ s en $k' = 5,0$?

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} \quad \blacktriangleright \quad 5,0 = t'_R / 20 \quad \blacktriangleright \quad t'_R = 100 \text{ s} \quad \blacktriangleright \quad t_R = 100 \text{ s} + 20 \text{ s} = 120 \text{ s}$$

Opgave 18

- a Hoe groot is bij benadering de retentiefactor (k') van de tweede piek bij A, B en C in afbeelding 18.22?

$$t_M = 0,5 \text{ min}$$

$$\text{A} \quad t_R = 0,9 \text{ min} \quad \blacktriangleright \quad k' = (t_R - t_M) / t_M \quad \blacktriangleright \quad k' = (0,9 - 0,5) / 0,5 = 0,8$$

$$\text{B} \quad t_R = 0,75 \text{ min} \quad \blacktriangleright \quad k' = (0,75 - 0,5) / 0,5 = 0,5$$

C $t_R = 0,65 \text{ min} \rightarrow k' = (0,65 - 0,5) / 0,5 = 0,3$

- b Wat zou een veilige minimale waarde voor k' zijn?

Zeker groter dan 0,5 maar liever groter dan 1.

Opgave 19

- a Waar in de curve ligt de optimale snelheid van de mobiele fase?

Bij het minimum in de curve, de snelheid waarbij HETP het kleinst is.

- b Stel we verhogen de temperatuur, welke term(en) veranderen dan?

Temperatuur verhogen:

A *verandert in principe niet, "Eddydiffusie" gaat over verschil in afgelegde weg als gevolg van de pakking of matrix, een deeltje kan nu eenmaal verschillende wegen afleggen in het materiaal waar het doorheen moet. Dat verandert niet met de temperatuur.*

A is alleen van belang bij een gepakte kolom. In een capillaire kolom is deze 0.

B *(gewone diffusie) neemt toe doordat de moleculen sneller bewegen.*

C *(evenwichtsinstelling) De evenwichtsinstelling van de moleculen van en naar de stationaire fase verloopt sneller bij hoge temperatuur. De bijdrage van C aan de piekverbreding wordt daardoor minder. C wordt kleiner.*

- c Stel we maken de kolom langer, welke term(en) veranderen dan?

We gaan dan vanuit dat de snelheid van de mobiele fase, de temperatuur, de pakking dus alle andere variabelen hetzelfde blijven.

Als de kolom langer gemaakt wordt dan is de verblijftijd van de moleculen langer. Dus elk van de factoren A, B en C krijgen meer tijd.

A wordt groter want totale weg langer, meer tijd om verschillende wegen te doorlopen.

B wordt groter want meer tijd om door willekeurige beweging (diffusie) te verbreden.

C als de evenwichtsinstelling onvolledig is dan ligt het ook voor de hand dat het slechter wordt het met een langere kolom (= meer tijd). Dus dan C ook groter. Als de evenwichtsinstelling wel volledig is dan zou het met een langere kolom vermoedelijk weinig uitmaken.

Opgave 20

Bij onderstaande afbeelding (18.27):

- a Hoe groot is de retentiefactor voor A en voor G?

$$A \quad k' = \frac{t'_R}{t_M} \quad \blacktriangleright \quad k' = (2,05 - 0,80) / 0,8 = \mathbf{1,6}$$

$$G \quad k' = (5,20 - 0,80) / 0,8 = \mathbf{5,5}$$

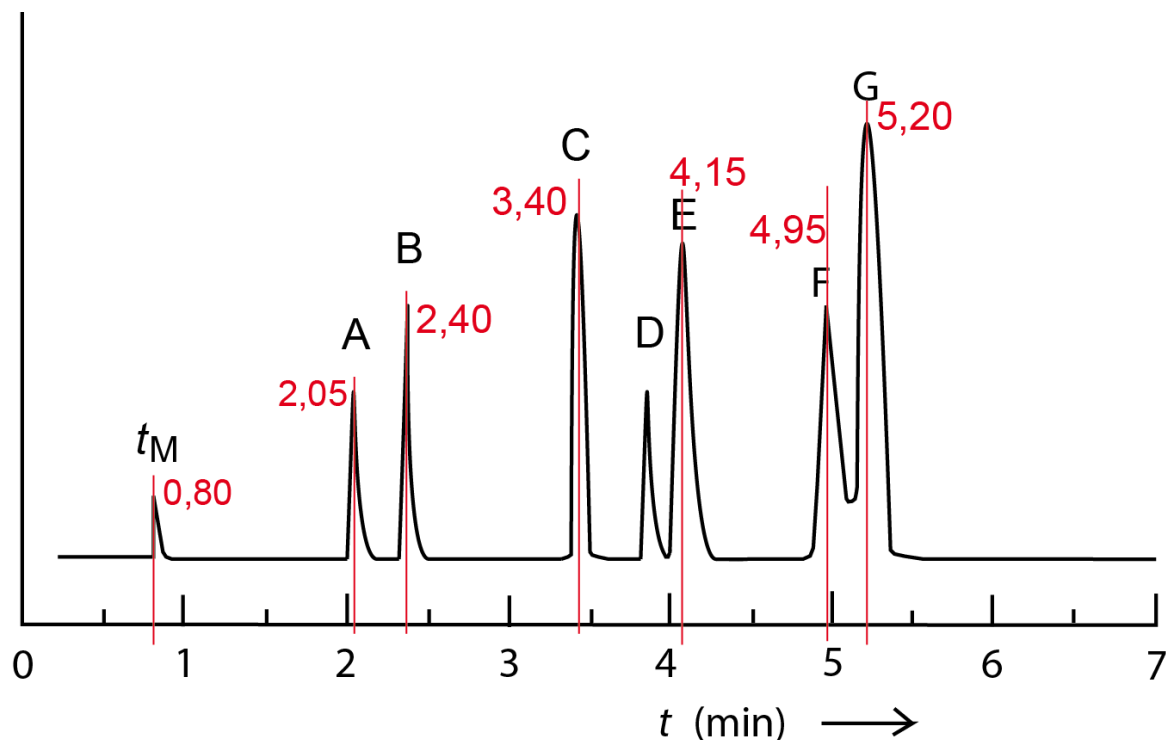
- b Hoe groot is de resolutiefactor voor A en B, B en C, F en G?

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{(gem)}}$$

$$A, B: \quad (2,40 - 2,05) / 0,2 = \mathbf{1,8}$$

$$BC: \quad (3,40 - 2,40) / 0,15 = \mathbf{6,7}$$

$$FG: \quad (5,20 - 4,95) / 0,25 = \mathbf{1,0}$$



- c Hoe groot is het aantal theoretische schotels voor C en voor E?

Hier kun je alleen een ruwe schatting van maken...

$$C \quad t_R = 3,4 \text{ min} \quad w_b \approx 0,1 \text{ min}$$

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \blacktriangleright \quad N \approx 16 \times (3,4/0,1)^2 \approx 18000$$

Maar met $w_b \approx 0,15 \text{ min}$ wat ook een redelijke schatting lijkt, is het resultaat: 8000

Reële schatting dus: $(1,3 \pm 0,5) \times 10^4$

$$E \quad t_R = 4,15 \text{ min} \quad w_b \approx 0,2 \text{ min}$$

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \blacktriangleright \quad N \approx 16 \times (4,15/0,2)^2 \approx 7000$$

$$\text{Met } w_b \approx 0,25 \text{ min: } N \approx 16 \times (4,15/0,25)^2 \approx 4400$$

Reële schatting dus: $(5,5 \pm 1,5) \times 10^3$

Opgave 21

Een kolom heeft een lengte van 50,0 cm. Voor twee componenten blijkt: $R_s = 1,3$.

Hoe lang moet de kolom worden gemaakt om $R_s = 1,5$ te maken?

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \cdot \sqrt{N}$$

$\sqrt{N}$ moet 1,5/1,3 maal zo groot worden, dat is 1,15 x zo groot.

N moet dan $(1,15)^2 = 1,33$ maal zo groot worden. De kolom dus 1,33 x zo lang:

$$1,33 \times 50,0 \text{ cm} = \mathbf{67 \text{ cm}}$$

Opgave 22

Gegeven de volgende meetwaarden:

component	retentietijd (min)	piekbreedte (basis) (min)
onvertraagd	2,1	
A	5,3	0,22
B	8,5	0,27
C	11,8	0,28
D	15,9	0,44

Bereken:

- de schotelhoogte voor elke piek;
- de retentiefactor voor elke component;
- de selectiefactor voor elke component;
- de resolutiefactor voor A en B, B en C, C en D.

Er ontbreken nog 2 gegevens: de lengte van de kolom en de elutietijd van de onvertraagde component. We gebruiken $L = 10,0 \text{ m}$ en $t_M = 1,5 \text{ min}$.

Gebruikte formules:

A schotelhoogte: $H = L / N$ met $N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$

B retentiefactor: $k' = \frac{t'_R}{t_M}$

C selectiviteitsfactor: $\alpha = \frac{t'_{R,B}}{t'_{R,A}}$

D resolutiefactor: $R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{(gem)}}$

	t_R (min)	w_b (min)	t'_R (min)	H (mm)	k'	α	R_s
A	5,3	0,22	3,8	1,1	2,5		
B	8,5	0,27	7,0	0,63	4,7	BA: 1,8	BA: 13
C	11,8	0,28	10,3	0,36	6,9	CB: 1,5	CB: 12
D	15,9	0,44	14,4	0,48	9,6	DC: 1,4	DC: 11

Opgave 23

Een gelfiltratiekolom is 30,0 cm lang. De diameter bedraagt 1,2 cm. Het volume buiten de gelkorrels (V_0) is 22,0 mL (experimenteel bepaald). Voor component A is het elutievolume: 29,6 mL.

a Bereken V_t

$$V_t = L \times \pi \times r^2 \rightarrow 30,0 \times 3,1415 \times 0,6^2 = \mathbf{33,9 \text{ cm}^3 \text{ (mL)}}$$

b Bereken K_{av}

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \rightarrow K_{av} = (29,6 - 22,0) / (33,9 - 22,0) = \mathbf{0,64}$$

Opgave 24

Een gelfiltratiekolom is 55,0 cm lang. De diameter bedraagt 2,4 cm. Het volume buiten de gelkorrels (V_0) is 152 mL (experimenteel bepaald).

Voor component B is het elutievolume: 189 mL.

a Bereken V_t

$$V_t = L \times \pi \times r^2 \rightarrow 55 \times 3,1415 \times 1,2^2 = \mathbf{249 \text{ cm}^3 \text{ (mL)}}$$

b Bereken K_{av}

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \blacktriangleright \quad K_{av} = (189 - 152) / (249 - 152) = \mathbf{0,38}$$

Opgave 25

Bij de bepaling van de molaire massa van een eiwit (X) worden de volgende metingen verricht: $V_0 = 45,0$ mL en $V_t = 78,1$ mL. Tevens worden de elutievolumes van een aantal eiwitten bepaald:

- Bereken voor elk eiwit de waarde van K_{av} .
- Bereken voor ieder eiwit $\log(M)$.
- Maak een ijkgrafiek met $\log(M)$ op de x-as en K_{av} op de y-as, bepaal de molaire massa van X.

eiwit	M $\times 10^3$ (g/mol)	V_e (mL)	K_{av}	$\log M$
A	18	64,8	0,598	4,26
B	35	61,2	0,489	4,54
C	75	56,9	0,360	4,88
D	110	55,0	0,302	5,04
E	135	52,3	0,221	5,13
X	?	58,5	0,408	?

Via een spreadsheet (zie onder) vinden we: $K_{av} = -0,4108 \times \log M + 2,354$

$M = 55 \times 10^3$ g/mol

En als je het heel netjes wilt doen, zie onderstaand excel-blad:

Met $K_{av} = 0,408$ van het onbekende eiwit, vinden we: $\log M = \mathbf{4,74 \pm 0,05}$

Voor M komen we dan op: $(5,5 \pm 0,6) \times 10^4$ g/mol

opgave AC 18-25

x = LOG [M]

y = K

x	y
4,26	0,598
4,54	0,489
4,88	0,36
5,04	0,302
5,13	0,221

m	-0,4108	2,35362	b
sm	0,02689	0,12855	sb
R2	0,98731	0,01953	sy

$$\begin{aligned}
 n &= 5 & B16 &= \text{AANTAL}(B4:B7) \\
 y_{\text{gem}} &= 0,394 & B17 &= \text{GEM}(C4:C8) \\
 \sum (x_i - x_{\text{gem}})^2 &= 0,5276 & B18 &= \text{DEVKWAD}(B4:B8)
 \end{aligned}$$

gemeten Y-waarde: **0,408** invullen
 aantal onafh metingen Y: **1** invullen
 van y afgeleide x-waarde: **4,735922** $B21 = (B19 - C11) / B11$
 $s_x =$ **-0,05212** $B22 = (C13 / B11) * \text{SQRT}((1 / B20) + (1 / B15) + ((B19 - B16)^2 / B11^2 * B17))$