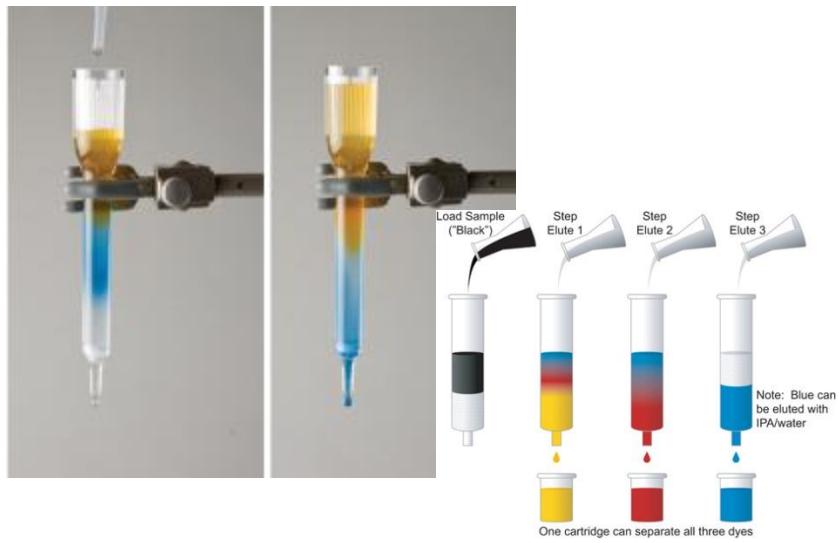


COLUMN CHROMATOGRAPHY



ENDRIKA WIDYASTUTI

**FOOD AND SCIENCE TECHNOLOGY
UNIVERSITY OF BRAWIJAYA**

2014

Introduction to Chromatography

Definition

Chromatography is a separation technique based on the different interactions of compounds with two phases, a **mobile phase** and a **stationary phase**, as the compounds travel through a supporting medium.

Components:

mobile phase: a solvent that flows through the supporting medium

stationary phase : a layer or coating on the supporting medium that interacts with the analytes

supporting medium : a solid surface on which the stationary phase is bound or coated

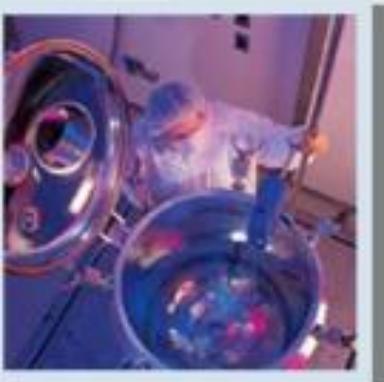
Applications of Chromatography



Forensics



Research



Pharmaceutical industry

- ✓ separating mixtures of compounds

- ✓ identifying unknown compounds

- ✓ establishing the purity or concentration of compounds
- monitoring product formation in the pharmaceutical and biotechnology industries



Paper



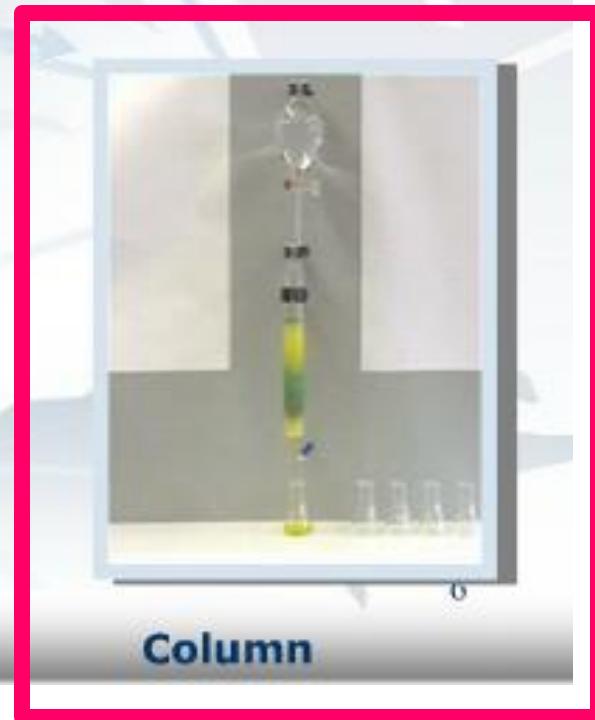
HPLC



Gas



Thin layer



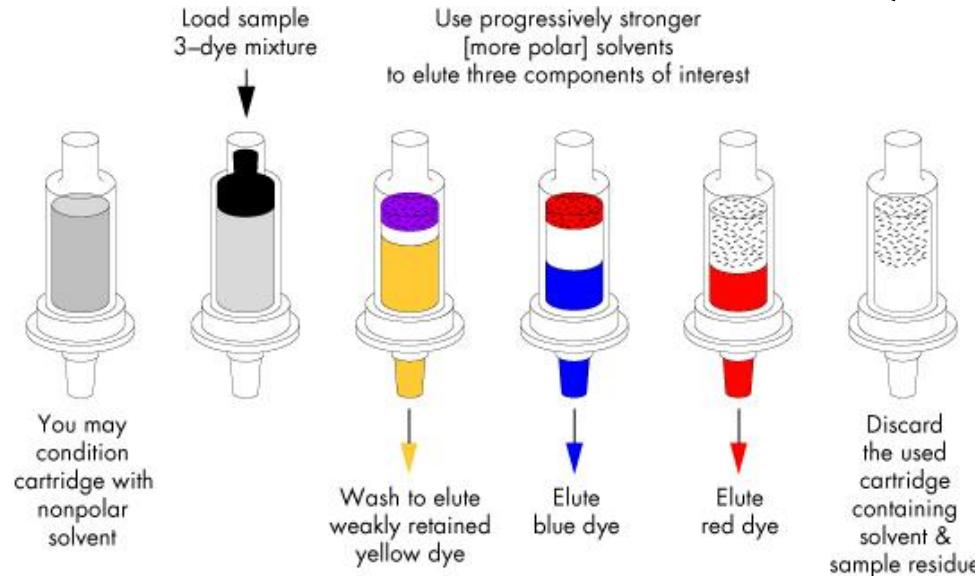
Column

JENIS KROMATOGRAFI

- **Kromatografi Lapis Tipis**
- **Kromatografi kolom :**
 - **Kromatografi adsorbsi**
 - **Kromatografi partisi cair-cair**
 - **Kromatografi pertukaran ion**
 - **Kromatografi filtrasi gel**
- **Kromatografi Gas Cairan**

ADSORBEN & PELARUT

- Dpt bersifat polar atau non polar
- Adsorben polar = silika & alumina, dpt mengadsorp solut yg bersifat polar.
- Adsorben non polar = arang (charcoal)



POLARITAS RELATIF BERBAGAI ZAT PELARUT

Konstanta dielektrik	Nama zat Pelarut
1,890	Petroleum eter, heksan, heptan
2,023	Sikloheksan
2,238	Karbon tetraklorida, Trikloroetilen, Toluen
2,284	Benzen, diklorometan,
4,806	Kloroform
4,340	Etil eter
6,020	Etil asetat
20,700	Asdeton, n-propanol
24,300	Etanol
33,620	Metanol
80,370	Air

ADSORBEN

- **SILIKA GEL**

- **bersifat asam dan berfungsi untuk memisahkan senyawa yang bersifat asam**
- **digunakan untuk kromatografi lapis tipis (KLT).**

- **ALUMINA**

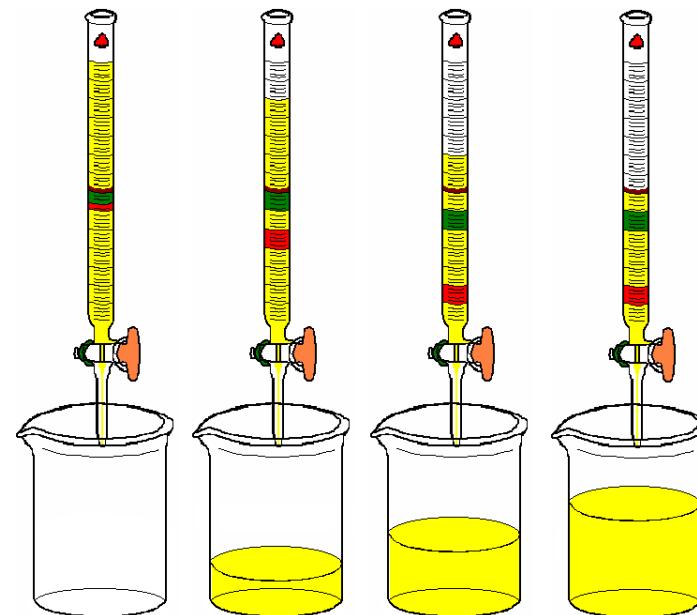
- **bersifat basa dan berfungsi untuk memisahkan senyawa yang bersifat basa.**
- **digunakan untuk kromatografi kolom**

JENIS KROMATOGRAFI KOLOM

- **Kromatografi Adsorbsi**, komponen yg dipisahkan scr selektif teradsorbsi pd permukaan adsorben yg dipakai u/bhn isian kolom.
- **Kromatografi Partisi**, komponen mnngalami partisi antara lapisan cairan tipis pd penyanga padat yg bertindak sbg fase stasioner & eluen yg bertindak sbg fase gerak (mobil).
- **Kromatografi Pertukaran Ion**, memisahkan komponen yg berbentuk ion yg terikat pd penukar ion sbg fase stasioner scr selektif akan terlepas/terelusioleh fase mobil.
- **Kromatografi Filtrasi Gel**, kolom diisi dg gel yg permeabel sbg fase stasioner, dan pemisahan berlangsung spt proses pengayakan yg didasarkan pd ukuran molekul dr komponen yg dipisahkan.

KROMATOGRAFI ADSORBSI

- Zat padat sbg adsorben / fase stasioner
 - ✓ Alumina & silika gel paling populer
 - ✓ Urutan dr kemampuan adsorbsi bsr ke kcl :
 - Alumina
 - Charcoal
 - Silika gel
 - Magnesium
 - Kalium karbonat
 - Sukrosa
 - Starch
 - Selulosa



ADSORBENTS:

interactions with solute molecules is due to OH groups present on their surface.

More polar molecules are adsorbed more strongly & thus, will elute more slowly

Strength of adsorption of polar groups (solute) on polar support is in the following order:

-C=C- < O-CH₃ < -COOR < >C = O < -CHO < -NH₂ < -OH < -COOH

Olefins < Ethers < Esters < Lactones < Aldehydes < Amines < Phenols < Acids.

Applications in separation of natural products

Alumina: sterols, dyestuffs, vitamins, esters, alkaloids & inorganic compounds.

Not used for compounds containing phenolic or carboxylic groups

Silica gel: sterols & amino acids.

Carbon: peptides, carbohydrates & amino acids.

Calcium carbonate: carotenoids & xanthophylls.

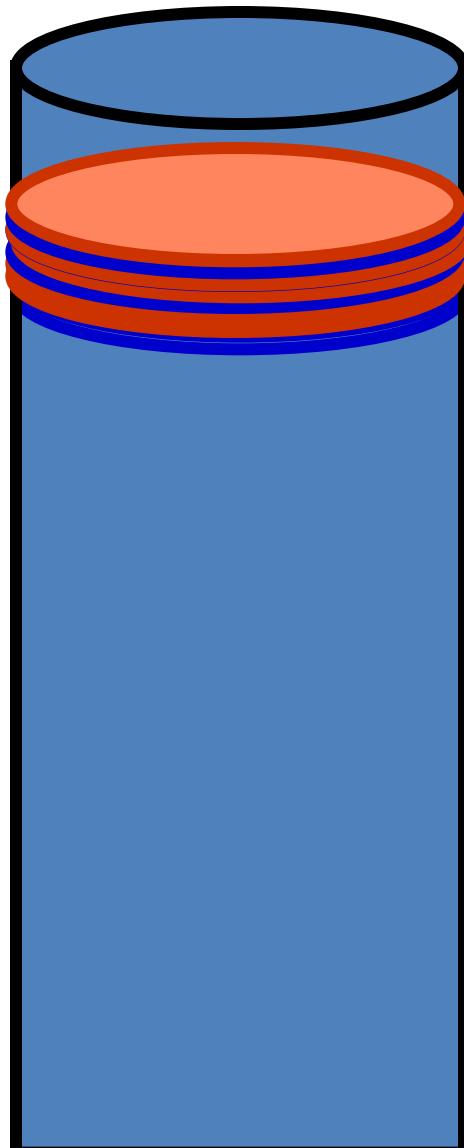
- **Zat cair sbg fase mobil**

- ✓ Zat pelarut yg mampu mlakukn elusi terlalu cepat tdk mampu memisahkan dg baik
- ✓ Elusi yg terlalu lambat mnyebabkan waktu retensi yg trlalu lama
- ✓ Golongan pelarut yg diurutkan dg dasar kenaikan adsorabilitasnya pd kolom alumina :
 - Perfluorokarbon
 - Hidrokarbon jenuh
 - Hidrokarbon tak jenuh
 - Halida & eter
 - Aldehid & keton
 - Alkohol & thiol
 - Asam & basa

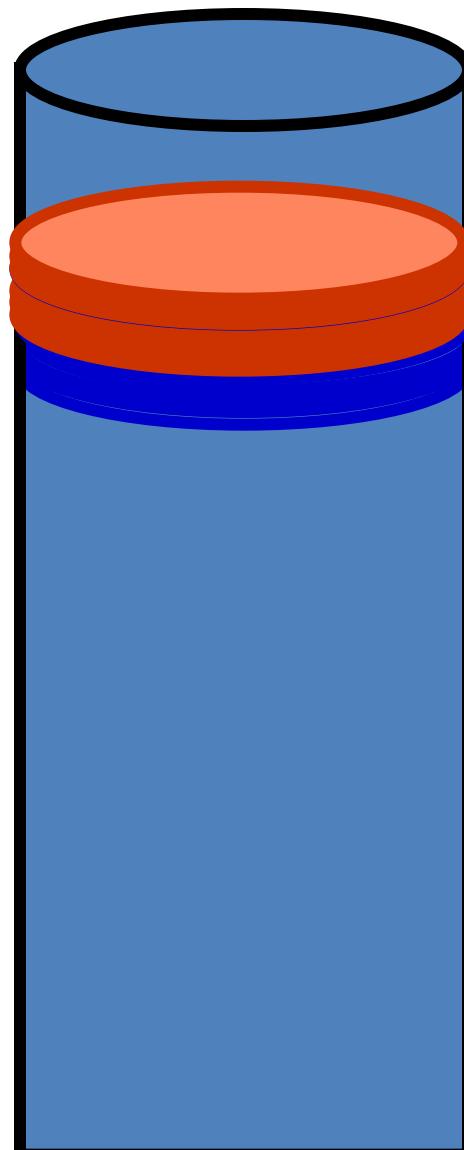
PENGISIAN & CARA KERJA KOLOM

- **Pemasukan absorben kedlm kolom.**
- **Kepadatan diseragamkan dg vibrator/plunger/ dlm bntuk larutan (slurry) & partikelnya dibiarkan mengendap.**
- **Fungsi glass wool di atas & dasar kolom sbg penyangga isian.**
- **Kecepatan elusi dibuat konstan 1 cm/mnt**

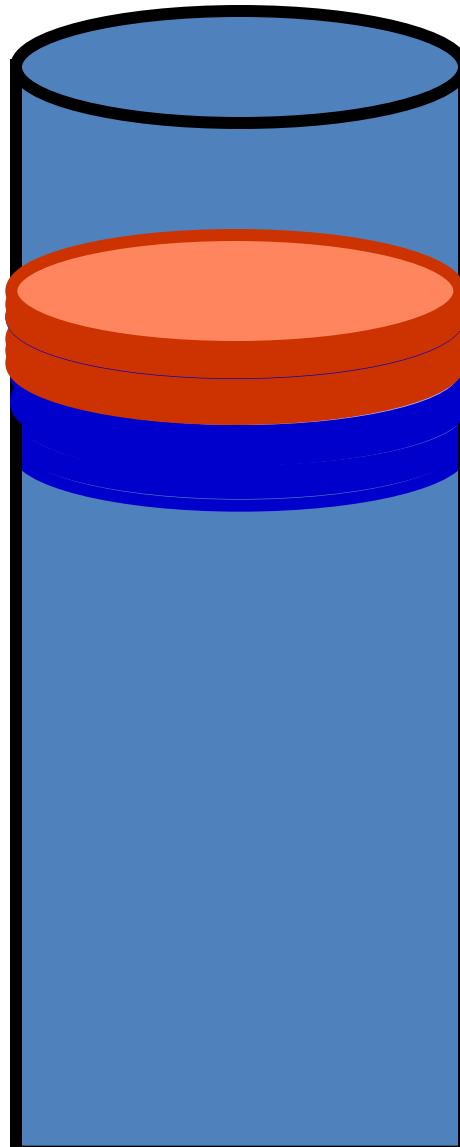
Principles of Separation on a column



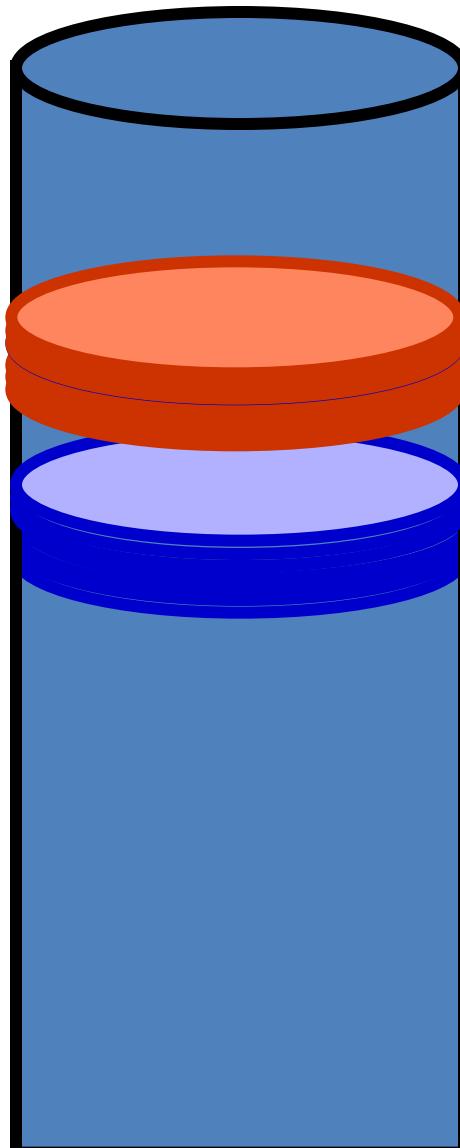
Principles of Separation



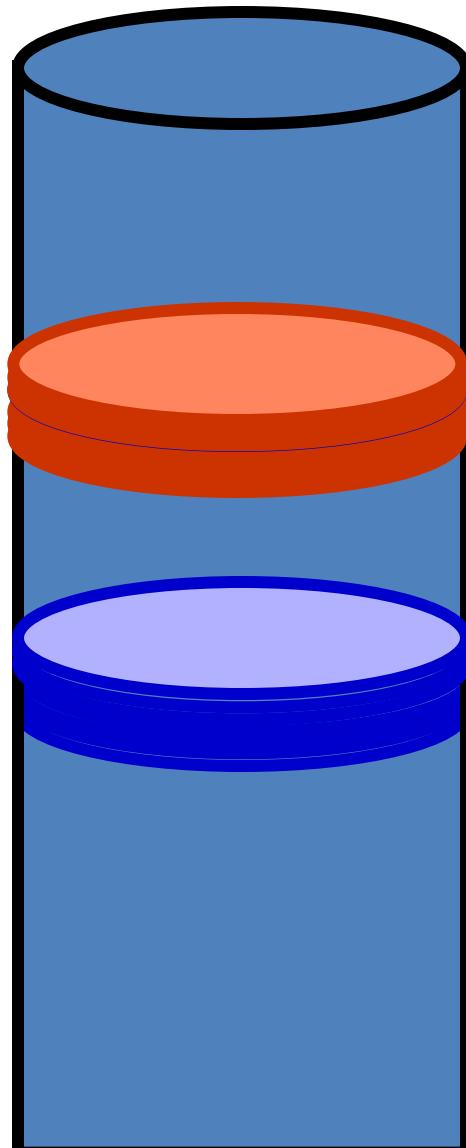
Principles of Separation



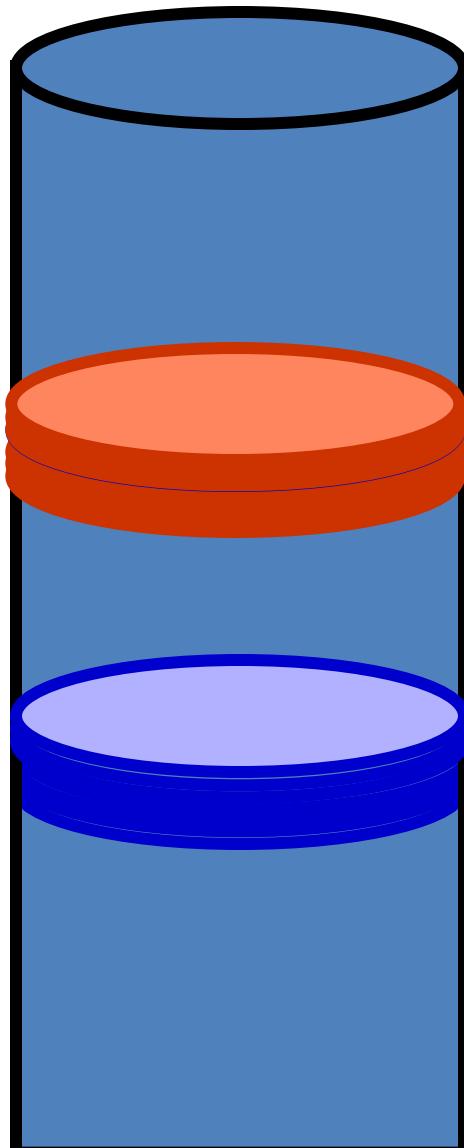
Principles of Separation



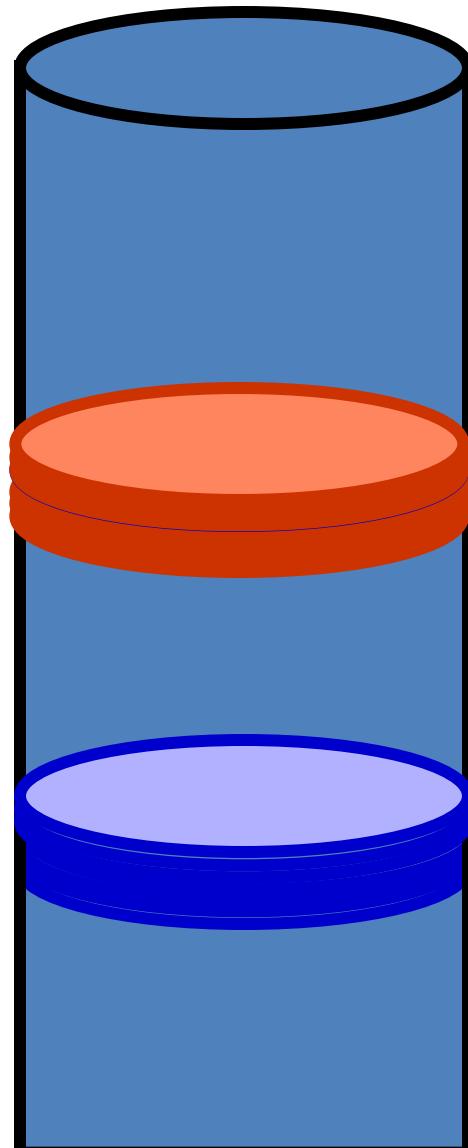
Principles of Separation



Principles of Separation



Principles of Separation

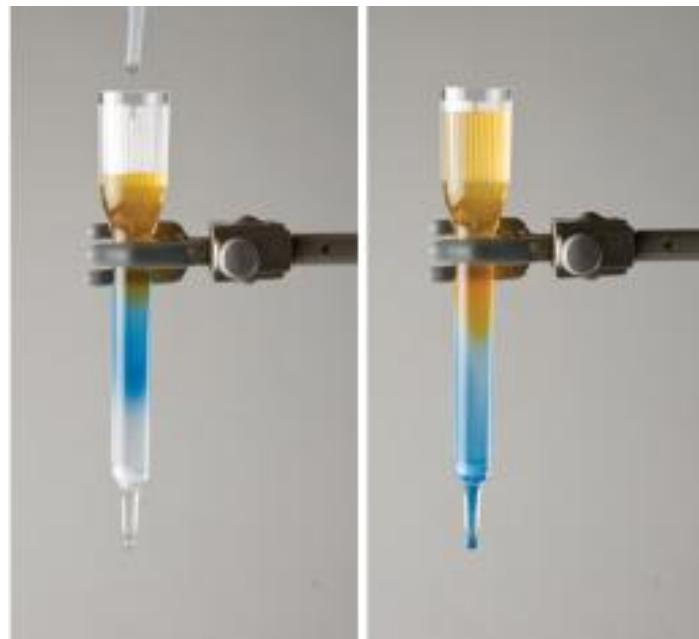


REMEMBER...

- The stationary phase is **POLAR**
- The more polar component interacts more strongly with the stationary phase
- The more polar component moves *more slowly.*
- The non-polar component moves *more rapidly.*

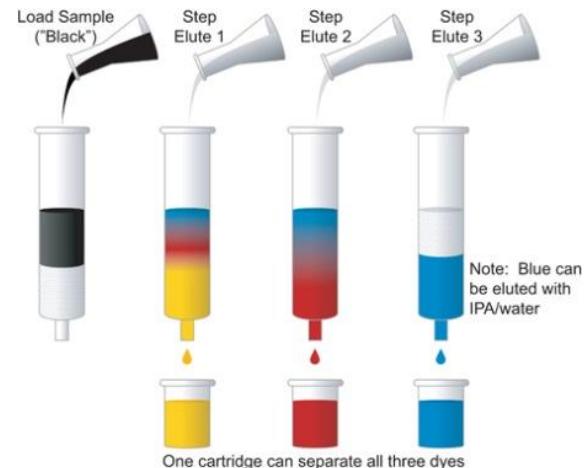
Tujuan

- **Mengetahui prinsip dasar kromatografi kolom**
- **Menentukan kadar betakaroten**



BAHAN-BAHAN

1. **Larutan standar:** beta karoten ditimbang sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dalam 10 ml petroleum eter-aston (10:1). Ambil masing-masing 0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml, 0.4 ml dan 0.5 ml lalu diencerkan dalam petroleum eter-aseton (10:1) hingga 25 ml
2. **Petroleum eter-aseton (1:1)**
3. **Petroleum eter-aseton (10:1)**
4. **Na₂SO₄**



ALAT-ALAT

- 1. Kolom kromatografi ukuran 16 mm x 150 mm**
- 2. Bagian bawah kolom diisi kapas absorben dengan tinggi 15 mm, diatasnya dimasukkan alumina setinggi 100 mm, kemudian dimasukkan Na_2SO_4 setinggi 20 mm dan bagian atas kolom diisi kapas setinggi 15 mm.**
- 3. Timbangan analitik**
- 4. Mixer magnet**
- 5. labu ukur 100 ml**
- 6. Kertas saring**
- 7. Corong pemisah**

PROSEDUR

- Sampel ditimbang sebanyak 5 gram dalam erlenmeyer lalu ditambahkan 35 ml petroleum eter-aseton (1:1)
- Erlenmeyer ditutup dan diaduk dengan mixer magnet selama 10 menit
- Residu dibiarkan sampai mengendap lalu dituangkan ke dalam labu ukur 100 ml melalui kertas saring
- Kertas saring dicuci dengan petroleum eter-aseton (1:1)
- Ekstraksi diulangi
- Filtrat yang diperoleh diencerkan hingga 100 ml dengan petroleum eter-aseton (1:1) kemudian digojog
- Larutan diambil 25 ml lalu dimasukkan dalam corong pemisah

PROSEDUR

- **25 ml aquades dimasukkan corong pemisah kemudian dikocok**
- **Dibiarkan hingga terjadi pemisahan lalu lapisan bawah (air-aseton) dialirkan keluar dari corong pemisah dan dibuang.**
- **Pencucian diulang dua kali**
- **Fase eter yang diperoleh ditambahkan Na_2SO_4 sebanyak 5 gram untuk tiap 100 ml fase eter**
- **Fase eter dimasukkan dalam kolom kromatografi**
- **Larutan petroleum eter-aseton (10:1) dielusikan ke dalam kolom**
- **Beta karoten yang diperoleh diencerkan dengan petroleum eter-aseton (10:1) lalu absorbansinya diukur pada panjang gelombang 450 nm**
- **Buat kurva standard an carai persamaan regresinya**
- **Hitung kadar beta karoten (mg/100 g atau mg/100 ml)**