

BAB 6

TEORI KROMATOGRAFI

Kromatografi ?

- Kromatografi merupakan metode pemisahan di mana komponen-komponen yang akan dipisahkan terdistribusi di antara dua fase, yaitu fasa diam (*stationary phase*) dan fasa gerak (*mobile phase*) IUPAC 1993
- Dapat diaplikasikan untuk senyawa organik dan anorganik

Prinsip-prinsip dasar Pemisahan

- Analit yang dipisahkan dari suatu campuran dilewatkan melalui **stationary phase (fasa diam)** menggunakan **mobile phase (fasa gerak)**
 - Fasa gerak = pelarut
 - Fasa diam = bahan packing kolom

Prinsip-prinsip dasar Pemisahan

- Pemisahan terjadi karena analit pada fasa gerak berinteraksi dengan fasa diam dengan kecepatan yang berbeda

Prinsip-prinsip dasar Pemisahan

- Contoh: Kolom Kromatografi elusi
- Dua zat (A & B) diinjeksikan dalam kolom melalui fase gerak (pelarut) atau eluen yang dipompa secara kontinu

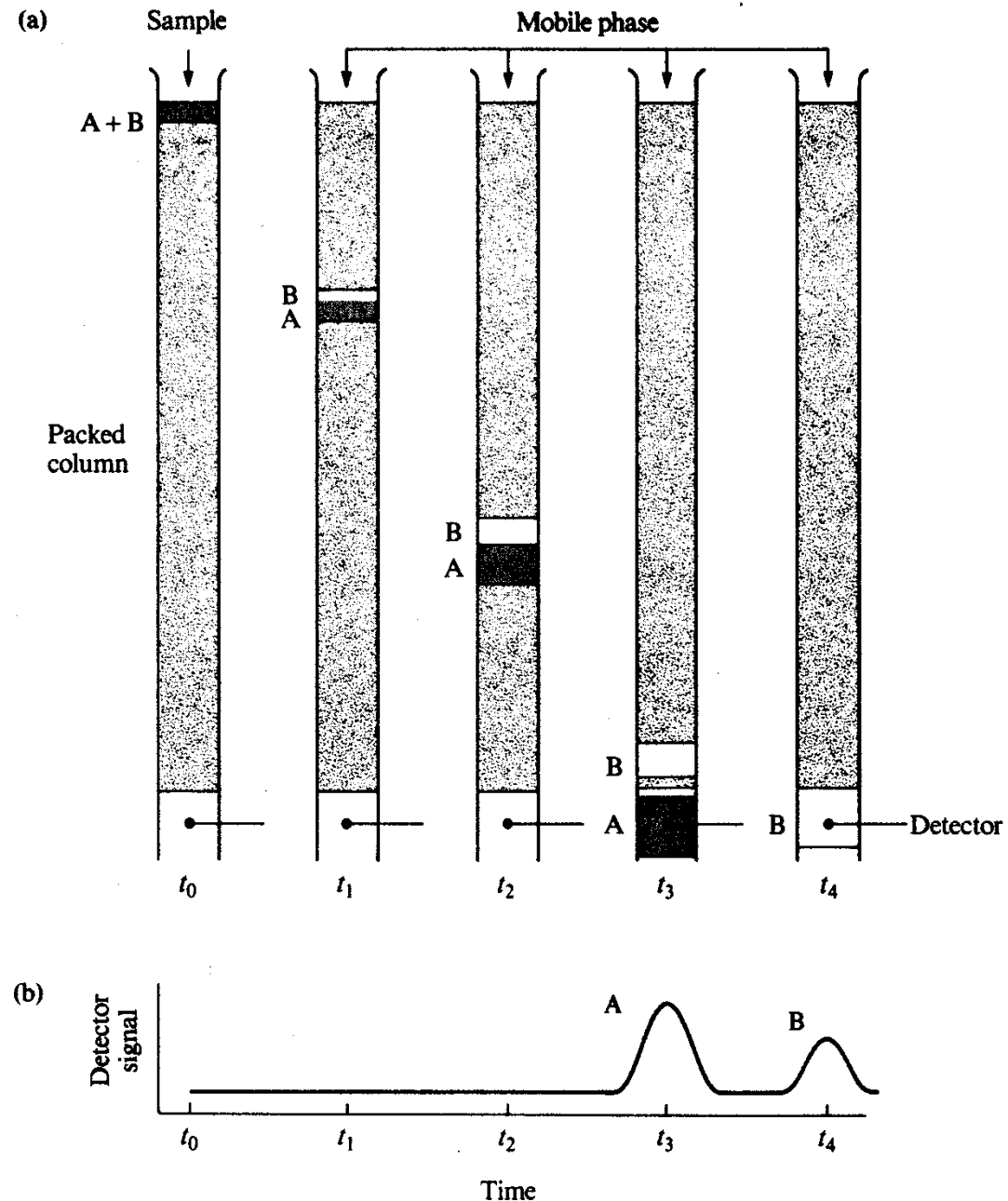
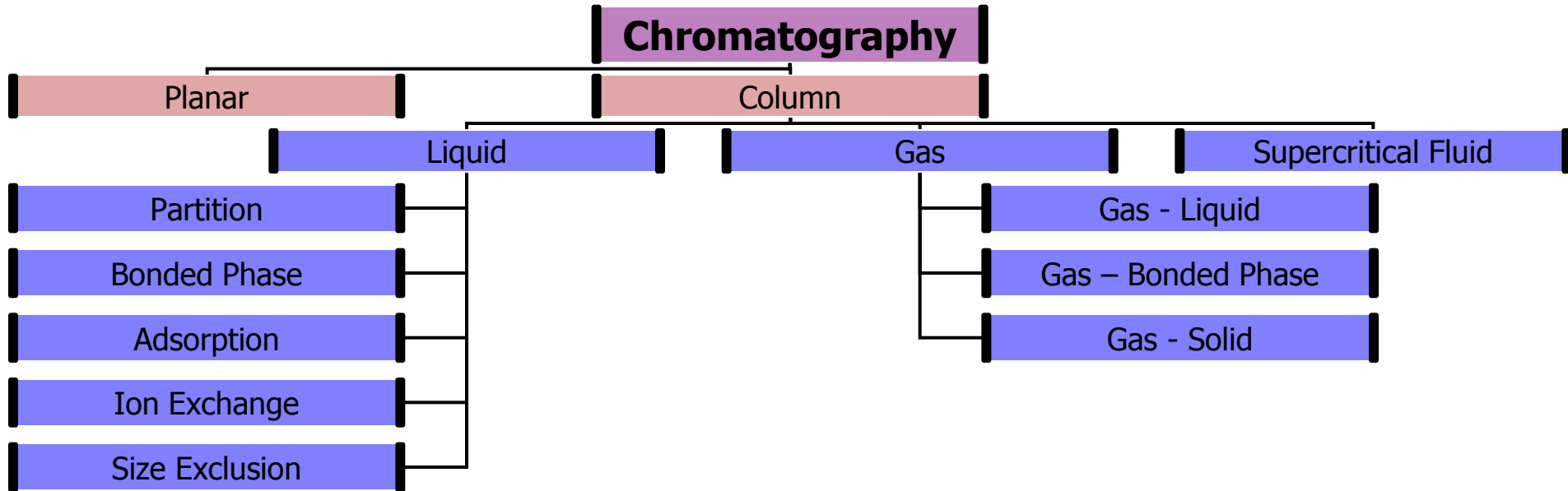


FIGURE 24-1 (a) Diagram showing the separation of a mixture of components A and B by column elution chromatography. (b) The output of the signal detector at the various stages of elution shown in (a).

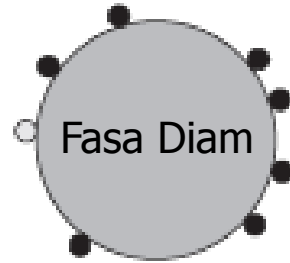
Prinsip-prinsip dasar Pemisahan

- Pemisahan tergantung pada partisi zat terlarut (solut) diantara fasa gerak dan fasa diam
- Interaksi ini digambarkan dengan koefisien partisi K
- $K = c_s / c_m$
dengan:
 c_s = konsentrasi fasa diam (molar)
 c_m = konsentrasi fasa gerak (molar)

Jenis-jenis Kromatografi

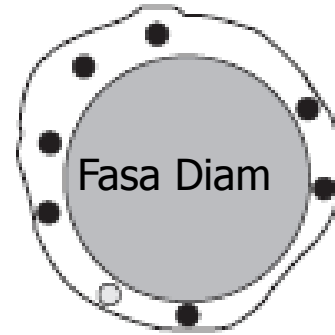


DASAR PEMISAHAN DALAM KROMATOGRAFI



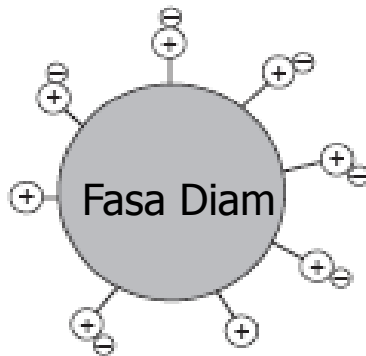
(a)

Kromatografi Adsorpsi



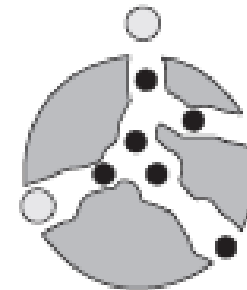
(b)

Kromatografi Partisi



(c)

Kromatografi Pertukaran Ion



(d)

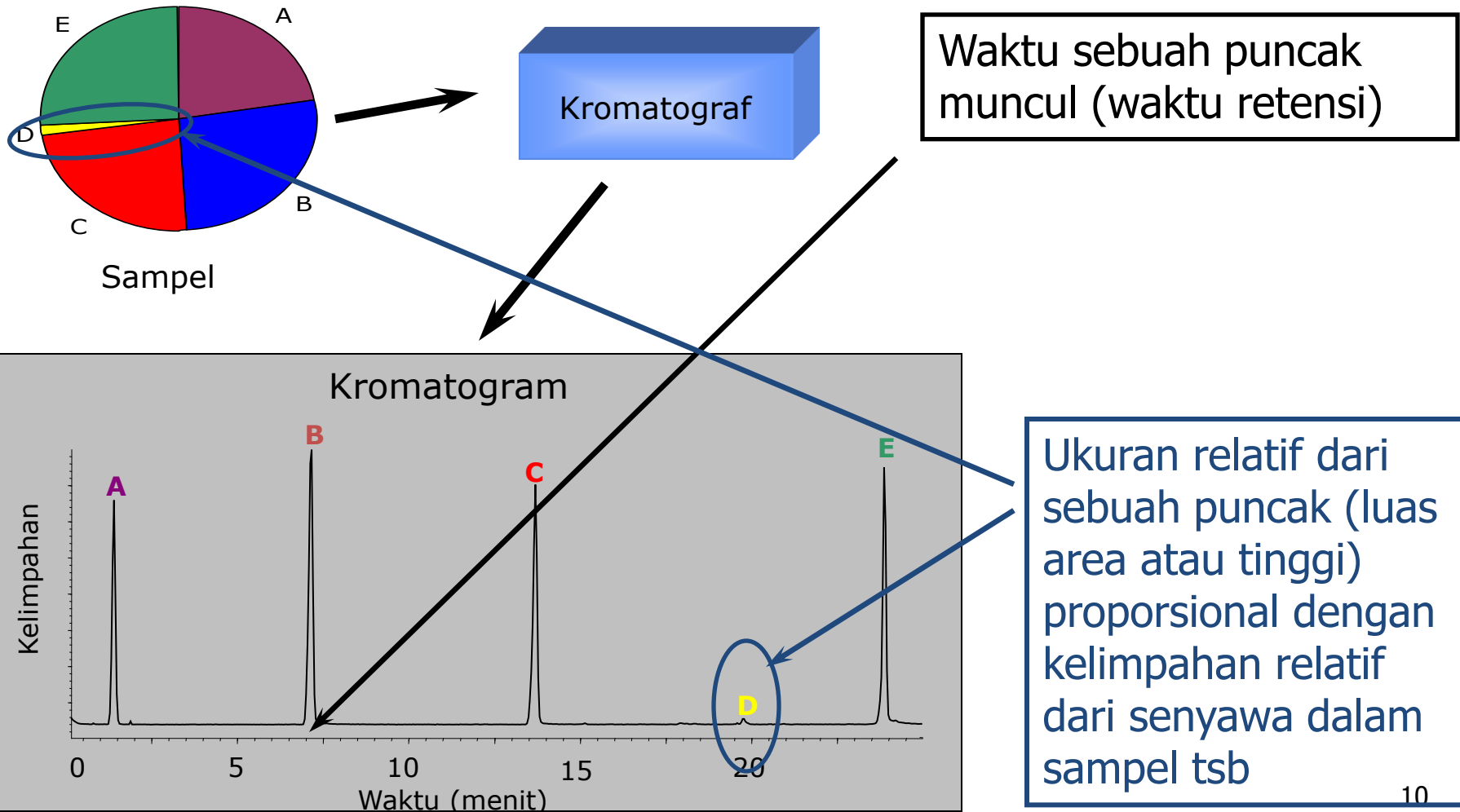
Kromatografi Eksklusi

Klasifikasi metode kromatografi kolom

TABLE 26-1 Classification of Column Chromatographic Methods

General Classification	Specific Method	Stationary Phase	Type of Equilibrium
Liquid chromatography (LC) (mobile phase: liquid)	Liquid-liquid, or partition	Liquid adsorbed on a solid	Partition between immiscible liquids
	Liquid-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Liquid-solid, or adsorption	Solid	Adsorption
	Ion exchange Size exclusion	Ion-exchange resin Liquid in interstices of a polymeric solid	Ion exchange Partition/sieving
Gas chromatography (GC) (mobile phase: gas)	Gas-liquid	Liquid adsorbed on a solid	Partition between gas and liquid
	Gas-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Gas-solid	Solid	Adsorption
Supercritical-fluid chromatography (SFC) (mobile phase: supercritical fluid)		Organic species bonded to a solid surface	Partition between supercritical fluid and bonded surface

Kromatogram



Term Kromatografi

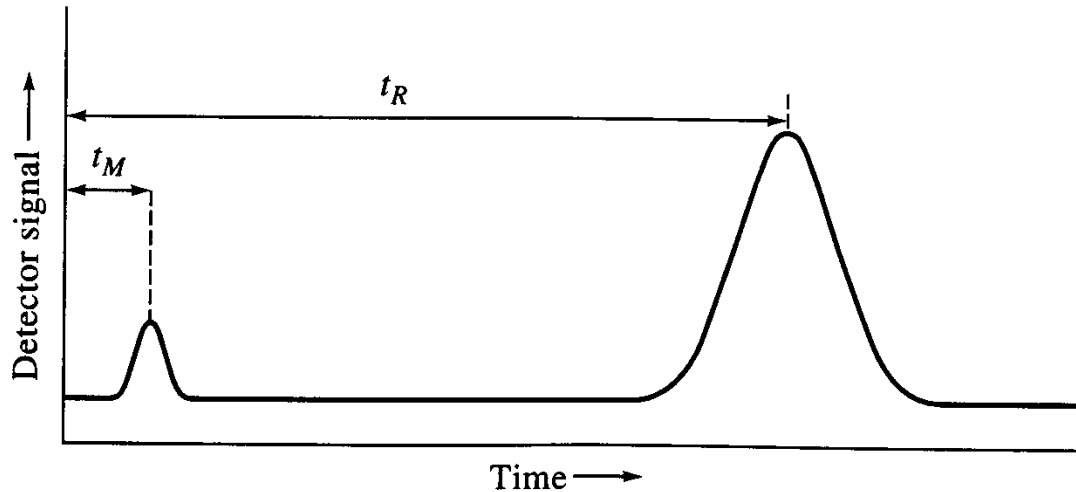


Figure 26-4 A typical chromatogram for a two-component mixture. The small peak on the left represents a species that is not retained on the column and so reaches the detector almost immediately after elution is started. Thus its retention time t_M is approximately equal to the time required for a molecule of the mobile phase to pass through the column.

Term Kromatografi

- Waktu retensi (t_R) = Waktu yang dibutuhkan setelah injeksi sebuah analit untuk mencapai detektor
- Dead time (t_M) = waktu yang dibutuhkan fasa gerak untuk keluar kolom
- Kecepatan fasa gerak (u) = L/t_M ; Kecepatan linear rata-rata dari gerakan molekul-molekul dalam fasa geraknya
L = Panjang kolom
- Kecepatan linear migrasi solut (\bar{v}) = L/t_R

Term Kromatografi

- Faktor retensi atau Faktor Kapasitas (k'_A) = suatu term yang digunakan untuk menggambarkan laju migrasi analit pada kolom

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

dengan:

K_A = tetapan distribusi spesies A

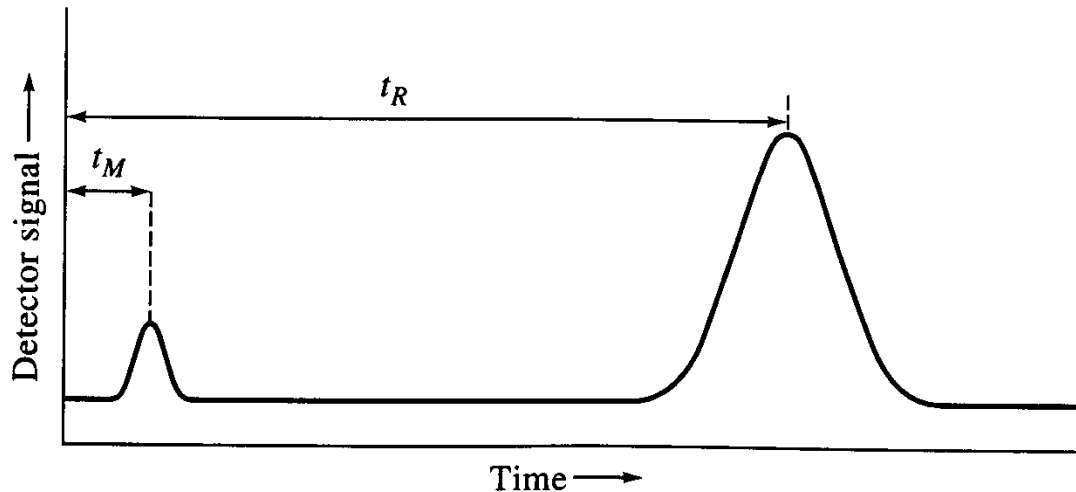
V_S = volume fasa diam

V_M = volume fasa gerak

Term Kromatografi

- Faktor retensi dapat ditentukan secara langsung dari kromatogram menggunakan

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



Term Kromatografi

- Interpretasi faktor retensi
- Jika $k'_A < 1$; Elusi terlalu cepat untuk penentuan waktu retensi yang akurat
- Jika $k'_A > 10$; Elusi terlalu lambat
 - Range yang disukai untuk k'_A diantara 1 dan 5

Term Kromatografi

- Faktor Selektivitas (α) = K_B/K_A
 - K_B adalah tetapan distribusi dari spesies yang ditahan lebih lama (sehingga $\alpha > 1$)
- Faktor selektivitas dapat juga didefinisikan dalam term faktor retensi dan waktu retensi:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Term Kromatografi -Efisiensi-

- *Plate Height (H) and Plat Teoritis (N)*
 - Untuk menggambarkan efisiensi kolom kromatografi, dilihat dari nilai N (plat teoritis)
 - Efisiensi kolom naik dengan naiknya N

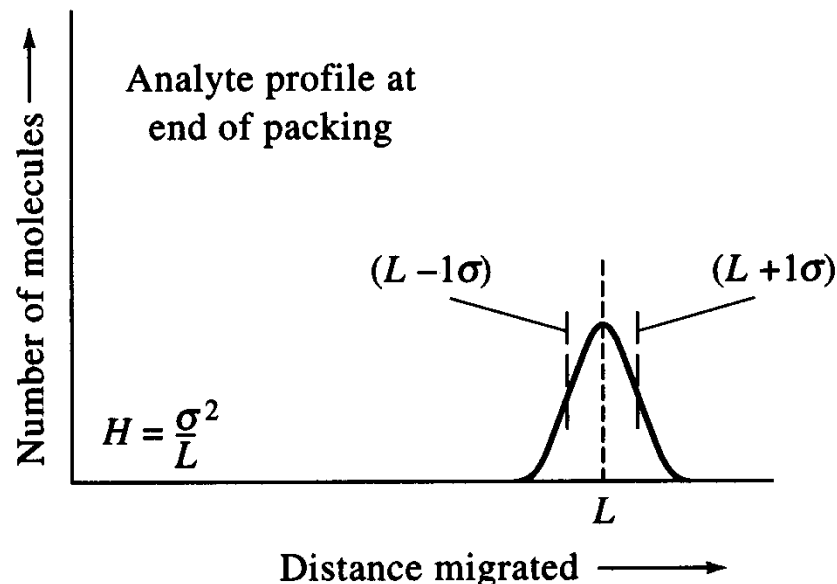
$$N = L/H$$

- Makin efisien, N makin makin besar.

Term Kromatografi

- **Teori Plat** – digunakan untuk menggambarkan migrasi solut melalui suatu kolom dan bentuk Gaussian dari sebuah puncak
 - Jika bentuk puncak kromatografi diasumsikan Gaussian, *plate height* dapat didefinisikan dalam term statistik yang melibatkan standar deviasi (σ)

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$



Term Kromatografi

- Teori Plat

H didefinisikan sebagai variansi (simpangan, deviasi, σ) per unit panjang kolom

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

- H adalah panjang kolom yang mengandung fraksi analit antara $L - \sigma$ dan

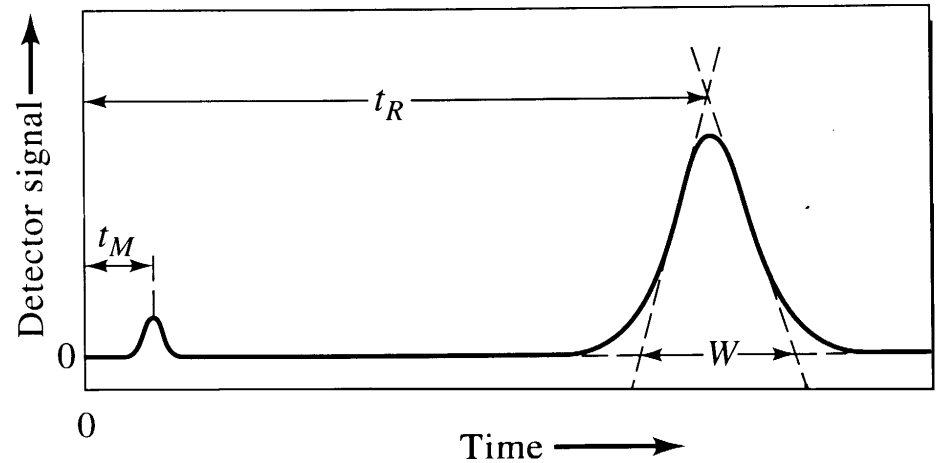
$L + \sigma$

Perhitungan N dari sebuah Kromatogram

W = panjang alas segitiga
(dalam satuan waktu)

t_M = waktu retensi solut yg tidak tertahan

t_R = waktu retensi solut



$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Term Kromatografi

- **Resolusi Kolom (R_S)** merupakan ukuran kuantitatif kemampuan sebuah kolom untuk memisahkan dua analit:

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

- Utk meningkatkan resolusi, maka panjang kolom dapat ditambah (L)
 - Keterbatasan: waktu lebih lama dan pita2 lebih lebar
 - Umumnya merupakan kompromi antara resolusi dan kecepatan analisis

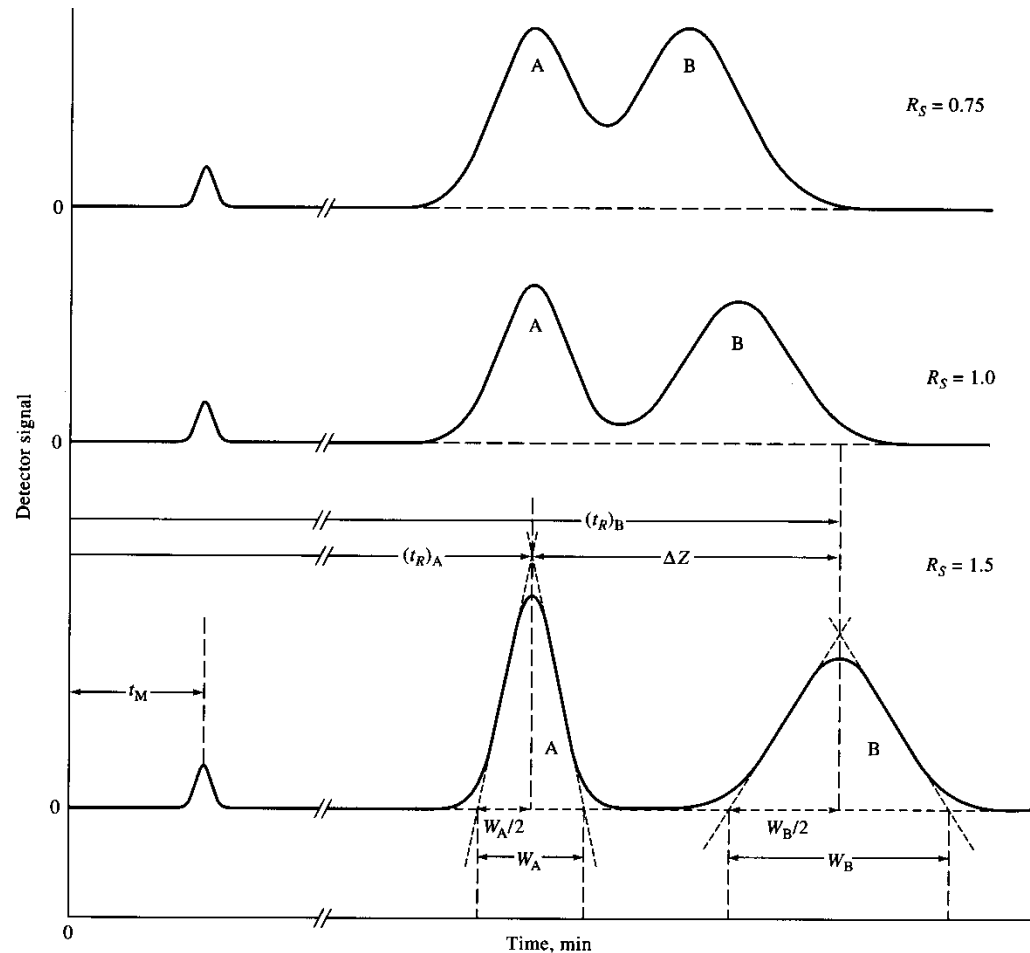


Figure 26-11 Separations at three resolutions. Here, $R_S = 2\Delta Z/(W_A + W_B)$.

A chromatographic analysis for the chlorinated pesticide Dieldrin gives a peak with a retention time of 8.68 min and a baseline width of 0.29 min. How many theoretical plates are involved in this separation? Given that the column used in this analysis is 2.0 meters long, what is the height of a theoretical plate?

Summary Term yang penting

TABLE 26-4 Important Chromatographic Experimental Quantities and Relationships

Name	Symbol of Experimental Quantity	Determined From
Migration time, nonretained species	t_M	Chromatogram (Figure 26-6)
Retention times, species A and B	$(t_R)_A, (t_R)_B$	Chromatogram (Figure 26-6)
Adjusted retention time, species A	$(t'_R)_A$	$(t'_R)_A = (t_R)_A - t_M$
Peak widths, species A and B	W_A, W_B	Chromatogram (Figure 26-6)
Length of column packing	L	Direct measurement
Flow rate	F	Direct measurement
Volume of stationary phase	V_S	Packing preparation data
Concentration of analyte in mobile and stationary phases	c_M, c_S	Analysis and preparation data

Summary Term yang penting

TABLE 26-5 Important Derived Quantities and Relationships

Name	Calculation of Derived Quantities	Relationship to Other Quantities
Linear mobile-phase velocity	$u = L/t_M$	
Volume of mobile phase	$V_M = t_M F$	
Retention factor	$k' = (t_R - t_M)/t_M$	$k' = \frac{KV_S}{V_M}$
Distribution constant	$K = \frac{k' V_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Selectivity factor	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Resolution	$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$
Number of plates	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = 16 R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$
Plate height	$H = L/N$	
Retention time	$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$	

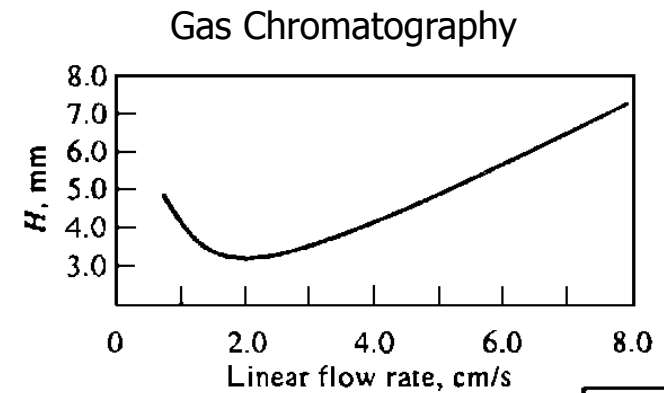
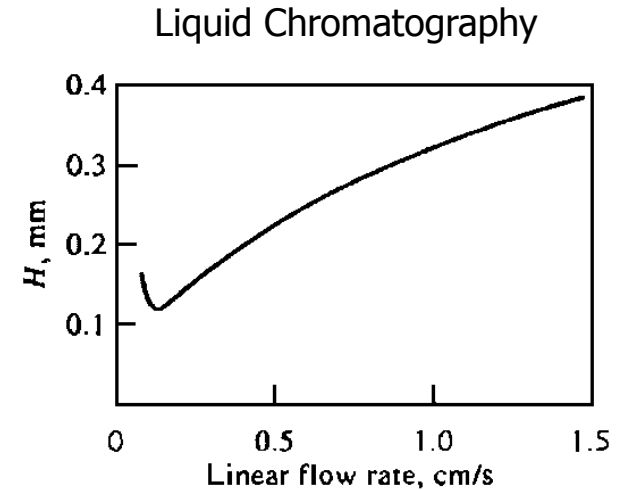
Variabel yg mempengaruhi Effisiensi pemisahan dalam Kolom Kromatografi

Secara umum Effisiensi Pemisahan : Effisiensi tinggi maka $N \gg$ dan $H \downarrow$

1. Ukuran Partikel Packing
2. Viskositas Fasa Gerak
3. Temperature
4. Kecepatan Linear Fasa gerak;
5. Panjang Kolom

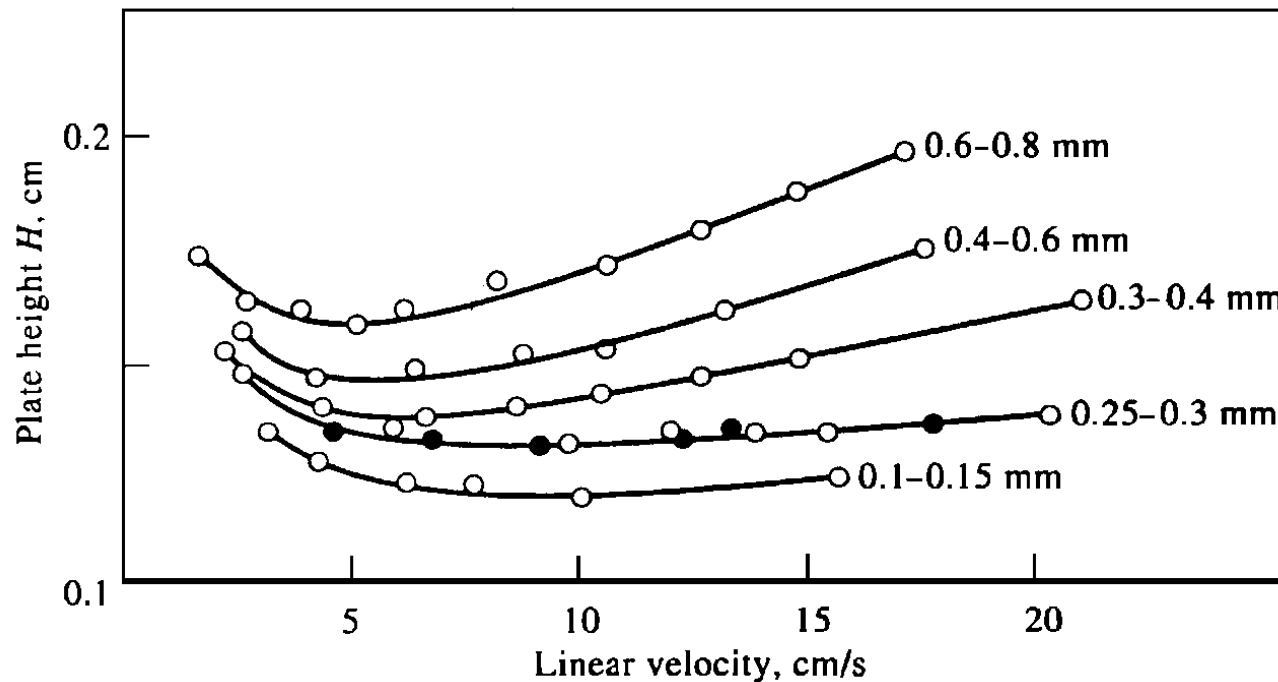
Variabel yang mempengaruhi Efisiensi Kolom

- Laju alir Fasa gerak
 - Optimum laju alir pada H minimum
 - H lebih kecil untuk HPLC daripada untuk GC (lebih efisien), tetapi prakteknya kolom GC lebih panjang daripada HPLC – sehingga N untuk GC lebih besar.



Variabel yang mempengaruhi Efisiensi Kolom

- Ukuran partikel packing kolom
 - Semakin kecil partikel packing, semakin besar efisiensi kolom.



Masalah umum ELUSI

- Umumnya sulit untuk menemukan suatu kondisi dimana semua puncak dapat terpisah baik dan memungkinkan kuantifikasi yang dapat dipercaya
- Solusi
 - *Running* pada beberapa kondisi
 - Elusi yang terprogram (merubah kondisi selama *running*)

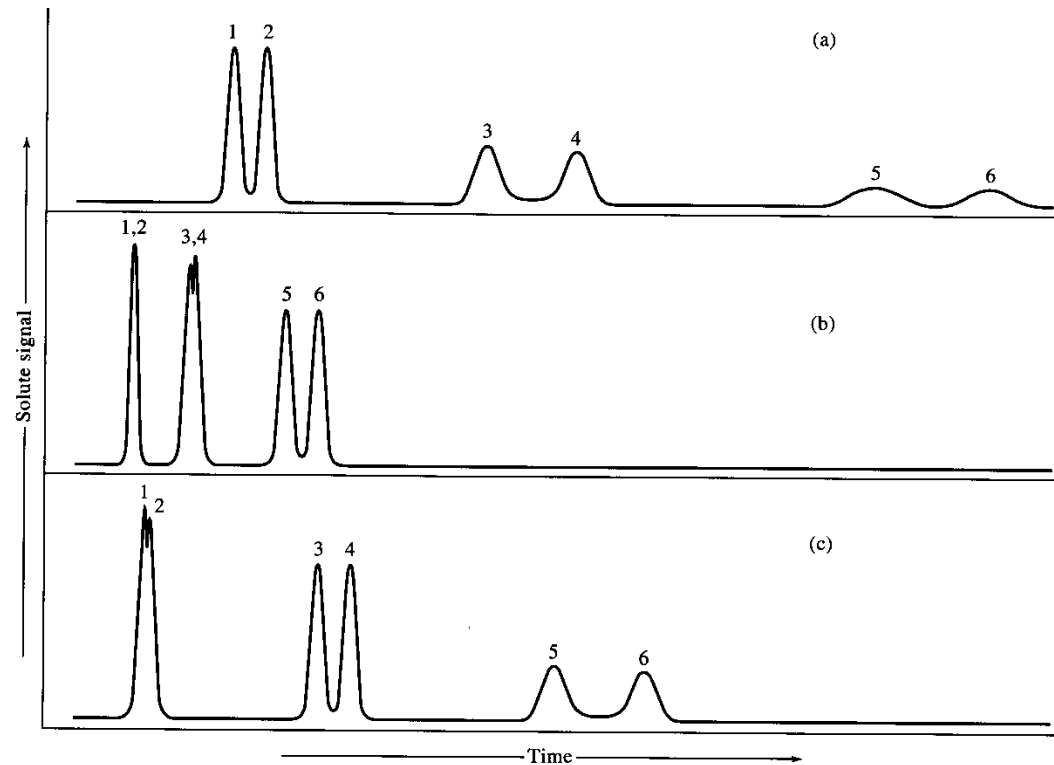


Figure 26-14 Illustration of the general elution problem in chromatography.