

Chemical Separations

Distillation
Solvent Extraction
Chromatographic Theory
Gas Chromatography
 - Packed column
 - Capillary column

Liquid Chromatography
Affinity Chromatography
Field Flow Fractionation
Supercritical Fluid Chromatography
Electrophoresis

Chromatography

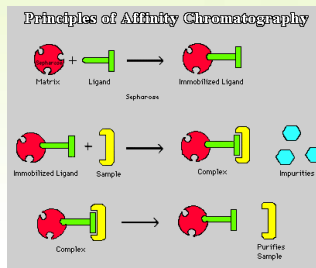
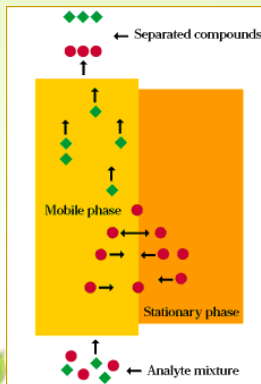
Components partition between two phases.

Stationary phase : dose not move

Mobile phase : dose move

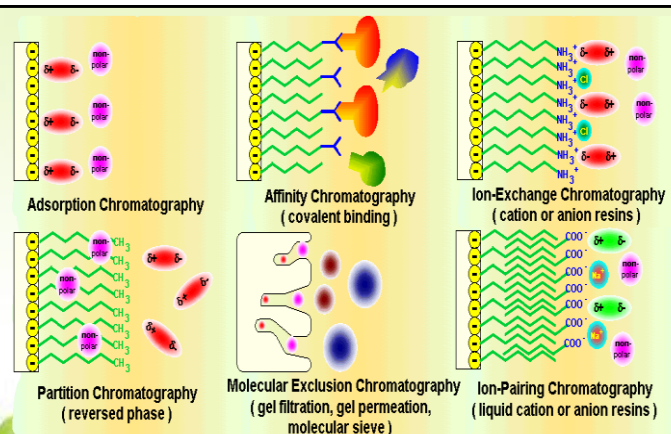
Solutes are separated due to difference in how they interact with the two phase

2



<http://bricker.tcnj.edu/tech/BIOL311chromatography.htm>

3



<http://kinard.people.cofc.edu/221LabCHEM/CHEM221L%20Gas%20Chromatography%20of%20Methyl%20Salicylate.htm>

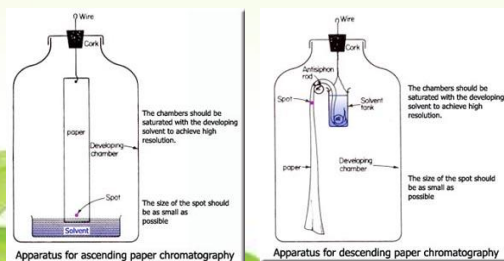
4

Paper chromatography



Stationary phase: Water that is tightly bound to the cellulose structure and fill interspaces of the paper fibers.

Mobile phase: Any solvent (also known as a developing solvent) that is partially miscible in water. Choice of the solvent will depend on the nature of the substances to be separated. Often, a mixture of two or three solvents is required.



5

Paper Chromatography Lab

8/11/2016

<https://www.youtube.com/watch?v=ZCzgQXGz9Tg>

6

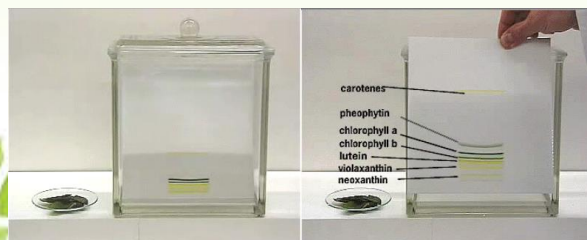
Thin layer chromatography

TLC = adsorption chromatography in which samples are separated based on the interaction between a thin layer of adsorbent and a selected solvent.

Stationery phase: A thin layer (250 um) of an adsorbent attached on a plate

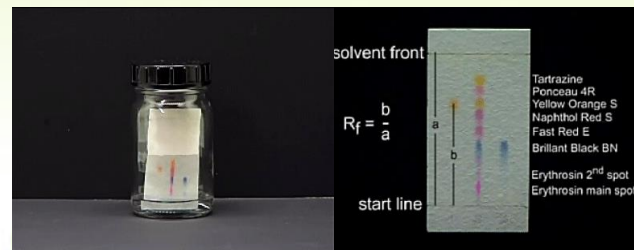
Mobile phase: Selected solvent(s).

Separation of Plant Pigments by Thin Layer Chromatography (TLC)



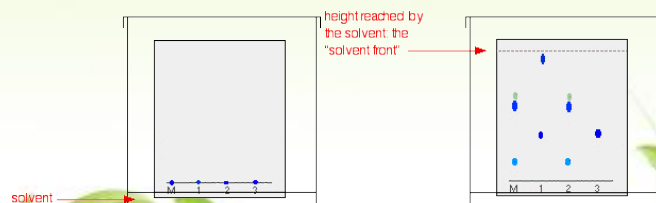
7

Separation of Food Dyes by Thin Layer Chromatography (TLC)



8

$$R_f = \frac{\text{distance travelled by compound}}{\text{distance travelled by solvent}}$$



<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/paper.html>

9

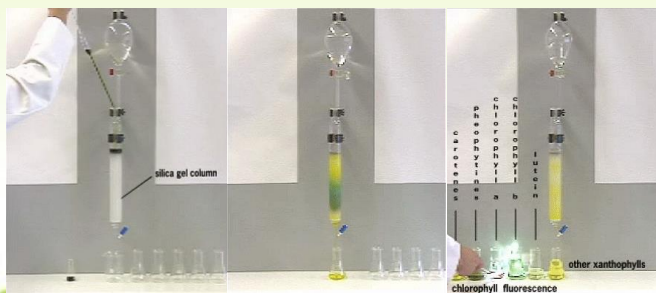


8/11/2016

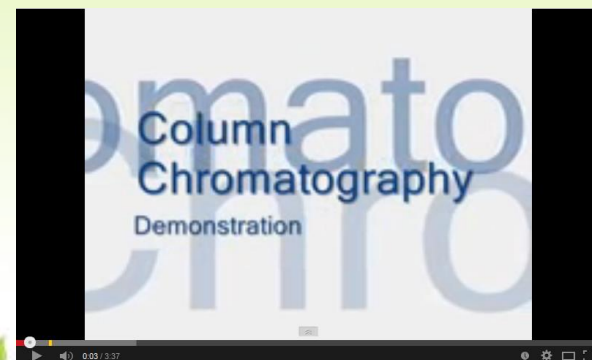
<https://www.youtube.com/watch?v=qdmKGskCyh8>

10

Separation of Plant Pigments by Column Chromatography (CC)



11

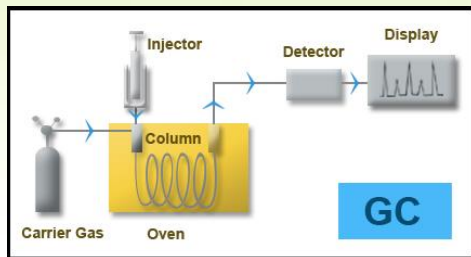


8/11/2016

<http://www.youtube.com/watch?v=1Nbhnt9lGQ>

12

Gas Chromatography



<http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-3/>

13

Gas Chromatography



14

ส่วนควบคุมและตรวจ
สอบการทำงานของเครื่อง



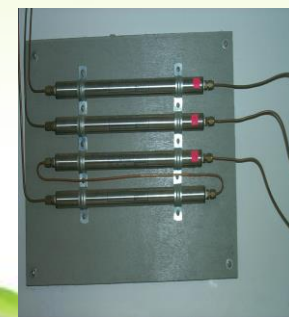
8/11/2016

1. ก๊าซตัวพา

- ก๊าซต่าง ๆ



- คอลัมน์กรองก๊าซ

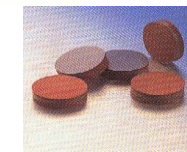
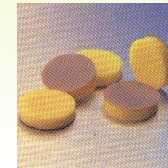


2. ส่วนควบคุมการไหลของก๊าซ



8/11/2016

3. ส่วนฉีดสาร



8/11/2016

- Syringe สำหรับฉีดสาร



8/11/2016

4. คอลัมน์และเตา

คอลัมน์ มี 2 แบบ

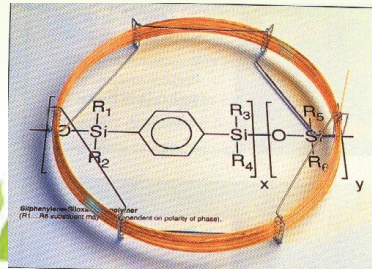
(1) แบบ Stainless Steel



8/11/2016

คอลัมน์

(2) Capillary column



8/11/2016

เตาที่ควบคุมคอลัมน์



8/11/2016

5. เครื่องตรวจวัด

(1) FID

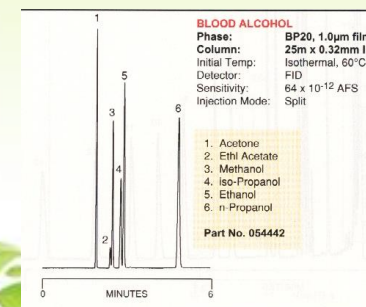
(2) NPD

(3) ECD



8/11/2016

โครมาโทแกรม



8/11/2016

The Flame Ionization Detector

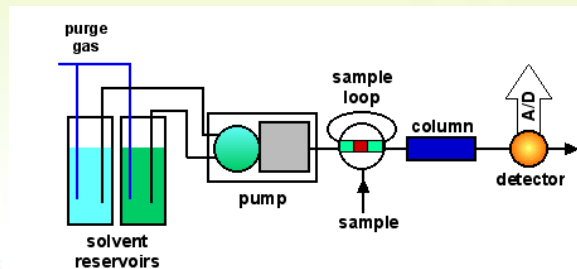
25

Gas

Chromatography

26

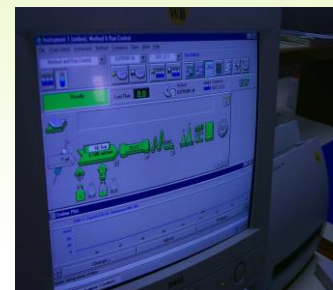
High performance liquid chromatography



<http://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/analsci/chrom/hplc.html>

27

HPLC



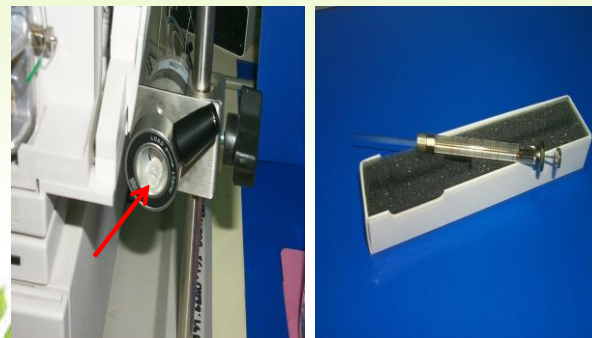
28

High performance liquid chromatography

	Normal Phase	Reversed Phase
Stationary phase	Polar (silica gel)	Non-polar (C18)
Mobile phase	Non-polar (organic solvents)	Polar (aqueous/organic)
Sample movement	Non-polar fastest	Polar fastest
Separation based on	Different polarities (functionality)	Different hydrocarbon content

29

High performance liquid chromatography



30

วิธีการดูดสารตัวอย่าง

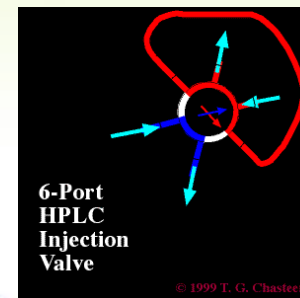
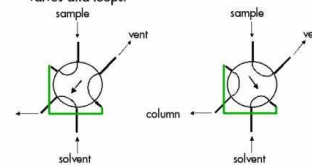


8/11/2016

High performance liquid chromatography

Injection systems

A very common approach is the use of sampling valves and loops.



6-Port
HPLC
Injection
Valve

© 1999 T. G. Chasteen

http://www.shsu.edu/~chm_tgc/sounds/sound.html

32

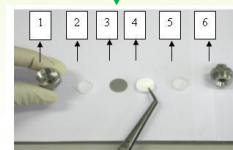
ชุดกรองสารสำหรับเครื่อง HPLC



กรองสารตัวอย่าง

8/11/2016

ชุดกรองสารตัวอย่าง

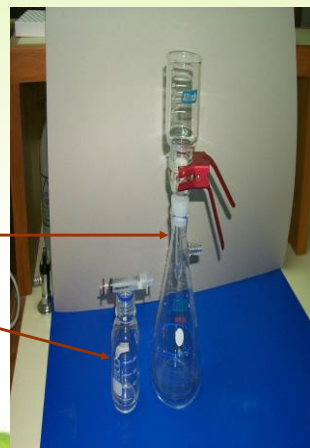


<http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/12086>

34

1. เฟสเคลื่อนที่

- ของเหลว
- กรองด้วยชุดกรอง
- บรรจุใส่ขวด



8/11/2016

ชุดกรอง mobile phase



<http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/12086>

36

1. ขวดใส่เฟสเคลื่อนที่

2. ขวดใส่สารตัวอย่าง



8/11/2016

37

2. ปั๊ม

ทำน้ำที่จุดเฟสเคลื่อนที่
ให้ไหลไปตามท่อแล้วเข้า
สู่คอลัมน์



8/11/2016

38

3. คอลัมน์

ทำน้ำที่แยกสารตาม
ความมีขั้ว



8/11/2016

39

- แผนภาพแสดงการทำงาน
ของเครื่อง
HPLC

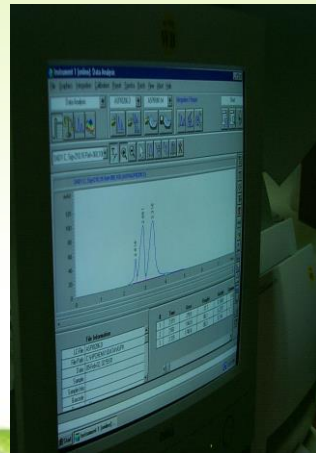


8/11/2016

40

6. เครื่องตรวจวัด

แผนภาพโครมาโทแกรม



8/11/2016

41

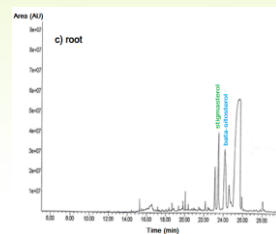
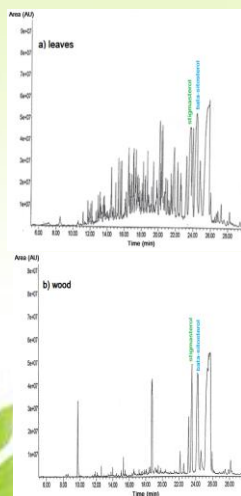
HPLC is a technique in analytic chemistry used to separate the components in a mixture, to identify each component, and to quantify each component.



8/11/2016

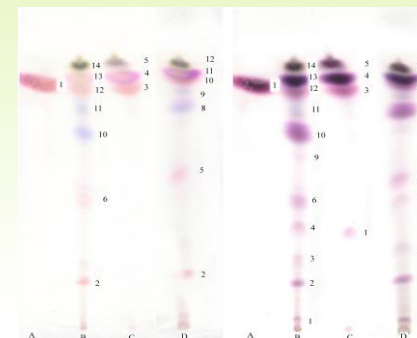
42

DETERMINATION OF BETA-SITOSTEROL AND STIGMASTEROL IN *SERICOCALYX SCHOMBURGKII* (CRAIB) BREMAK BY GC-MS



นายอนุกร ภูเรือรัตน์

43

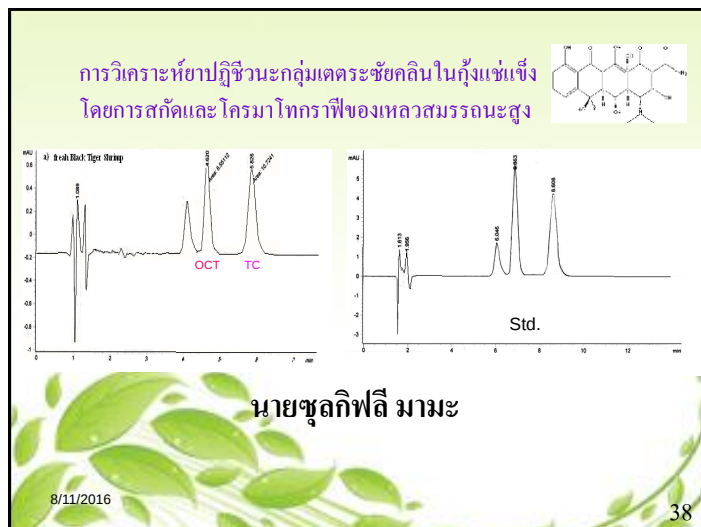
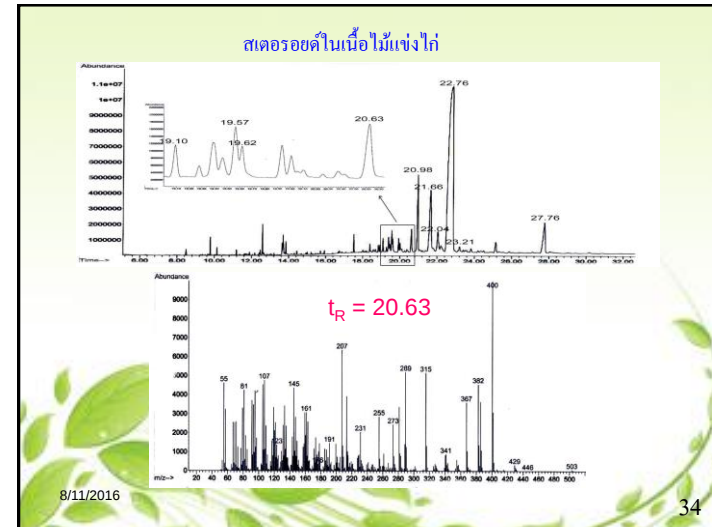
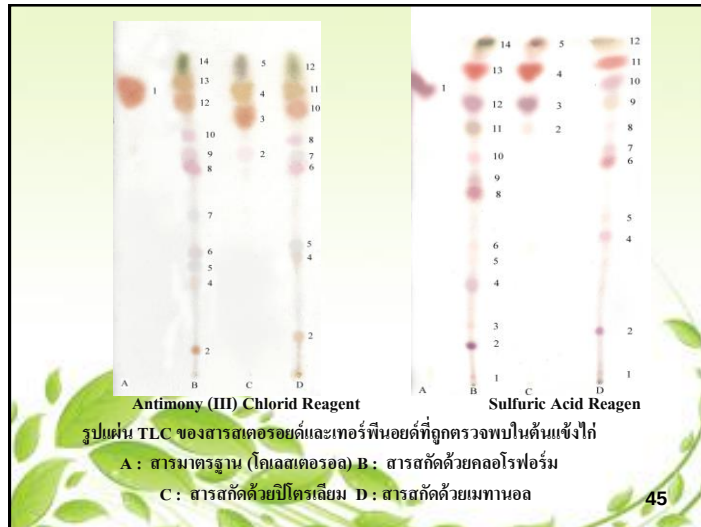


(ก) อบ 10 นาที

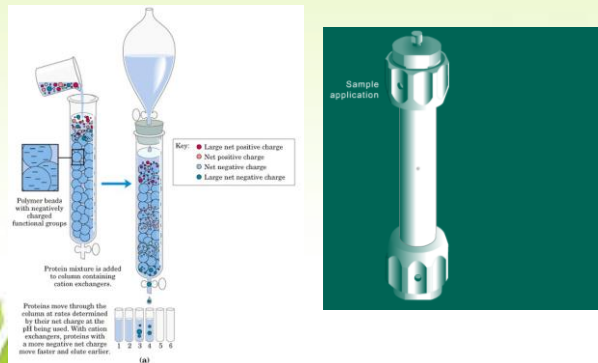
(ข) อบ 20 นาที

รูป แผน TLC ของสารสเตอรอยด์ที่ถูกตรวจพบจากเนื้อไม้ต้นแซ้งไก่น้ำด้วยสารละลาย Vanillin-Phosphoric Acid Reagent นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C
A : สารมาตรฐาน (โกลสเตอรอล) B : สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม
C : สารสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ D : สารสกัดด้วยเมทานอล

44



Ion Exchange Chromatography



<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/SizeExclusion/>

49

Ion Exchange Chromatography

• Basic Separation Principle:

Exchange equilibrium between ions in solution and ions (of the same charge) held by surface bonded functional groups

50

Ion Exchange Chromatography

- **Cation Exchange**
 - Sulfonic acid – $\text{SO}_3^- (\text{H}^+)$
 - Carboxylic Acid
- **Anion Exchange**
 - Primary Amine – $\text{NH}_3^+(\text{OH}^-)$
 - Tertiary Amine

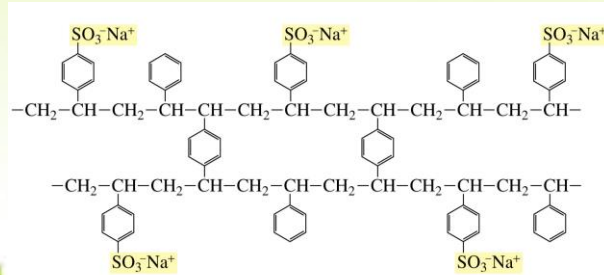
51

Mobile Phase

- Cation Exchange – H^+
- Anion Exchange – OH^-
- pH is controlled with a Buffer Solution
 - e.g. $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{--}$

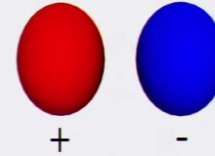
52

Stationary Phase – Ion Exchange Resin



53

GE Healthcare
Life Sciences



Separation in Ion Exchange Chromatography depends upon the reversible adsorption of charged solute molecules to immobilized groups of opposite charge.

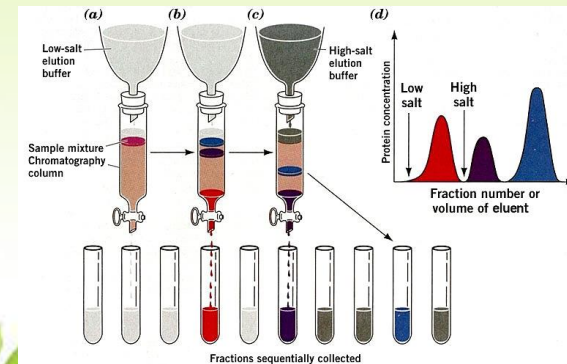
8/11/2016

54

Ion Exchange Chromatography – General Characteristics

- In general, ion exchangers favor binding of ions with:
 - ↑ charge
 - $3^+ > 2^+ > 1^+$
 - ↓ hydrated radius
 - $H^+ > Li^+ > Na^+ > K^+$ (p. 174)
 - H^+ bound least strongly b/c hydrated radius is highest
 - ↑ polarizability

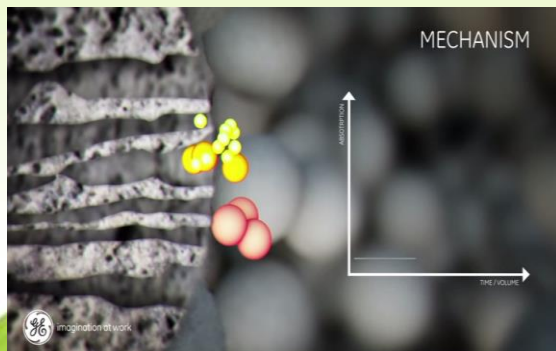
55



<http://bricker.tcnj.edu/tech/BIOL311chromatography.htm>

56

Gel-Filtration Chromatography



57

<https://www.youtube.com/watch?v=oV5VB5KO3IQ>



58

8/11/2016

<https://www.youtube.com/watch?v=CWtW6EN7is>

ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



8/11/2016

59

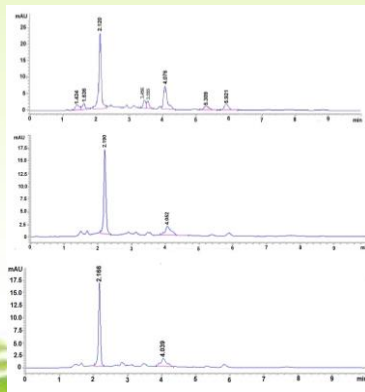
DETERMINATION OF URIC ACID IN GERMINATED BROWN RICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Chromatographic condition:

The HPLC procedure has been developed for the determination of uric acid in germinated brown rice. For the separation conditions, a reverse-phase column hypersil ODS, 5 μm (4.0 $\times$ 250 mm), an isocratic elution system of methanol/water (10:90 v/v) at the flow rate of 0.70 mL min⁻¹. The photodiode array detector was set at 292 nm.



60



Chromatogram of uric acid in germinated brown rice sample

8/11/2016

61

Determination of vitamin A and vitamin E in rice and bran by high performance liquid chromatography

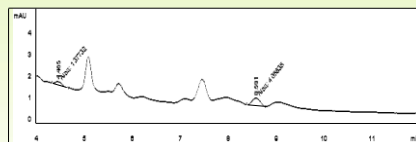
สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเรตินอยด์และโทโคฟีรอล

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
คอลัมน์	C ₁₈ ขนาด 250 มิลลิเมตร×4.6 มิลลิเมตร ; 5 ไมโครเมตร
ตัวตรวจวัด	อัลตราไวโอเลต
ความยาวคลื่น	300 นาโนเมตร
ชนิดตัวทำละลาย	เมทานอล
อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่	100:0
อัตราการไหลของตัวทำละลาย	1.50 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรของสาร	25 ไมโครลิตร
รีเทนชันไทม์ของเรตินอยด์	4.73 นาที
รีเทนชันไทม์ของโทโคฟีรอล	9.31 นาที
ระยะเวลาในการวิเคราะห์	10.0 นาที

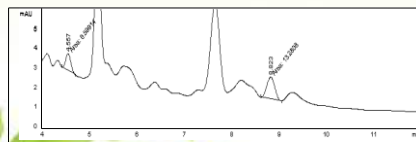
8/11/2016

นางสาวพรทิพา โพธารเจริญ

62



ตัวอย่างเมล็ดข้าว

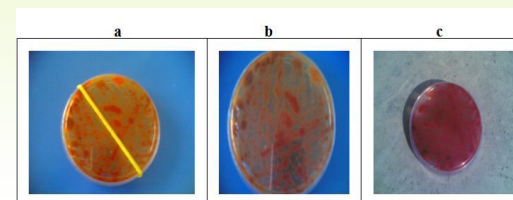


ตัวอย่างรำข้าว

8/11/2016

63

Determination of Monascus Metabolites in Fish Food by High Performance Liquid Chromatography



8/11/2016

นางสาวนันทิมา จันทร์ทอง

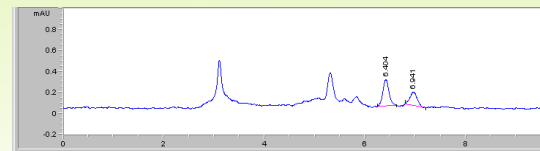
64

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

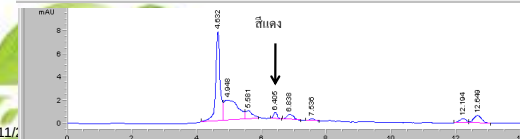
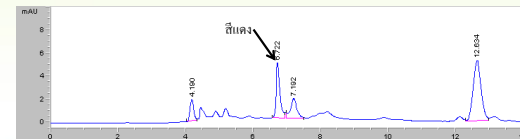
พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
คอลัมน์	C18 ชนิดหัวภาคกลับ
	ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร
	ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร
ความยาวคลื่นของการตรวจวัด	390 นาโนเมตร
ชนิดเฟสเคลื่อนที่	Methanol 100%
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง	25 ไมโครลิตร
รีเทนชันไทม์	6.5 นาที
ระยะเวลาในการวิเคราะห์	10 นาที

8/11/2016

65



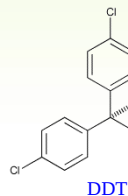
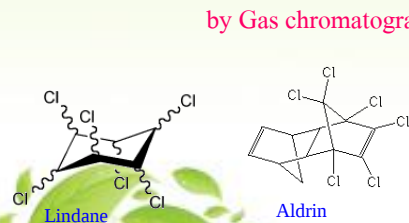
การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC



8/11/

66

การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงประเภทคลอรีนเตทไฮโดรคาร์บอน ในน้ำโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี Determination of pesticides in water by Gas chromatography



8/11/2016

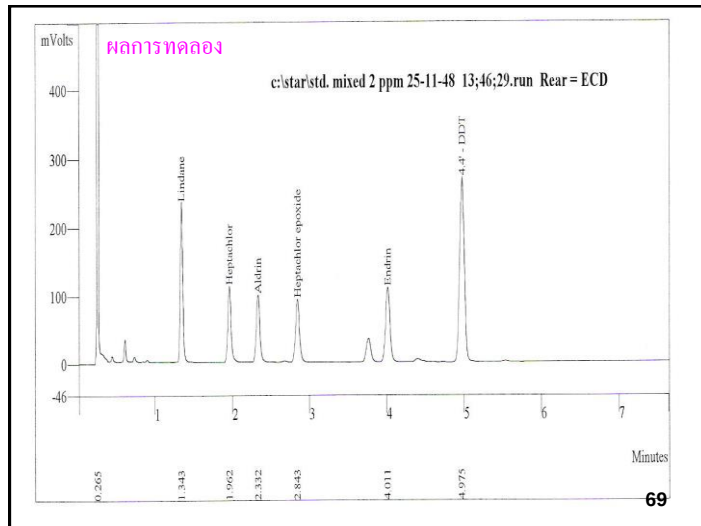
67

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	สภาวะ
1. คอลัมน์	DB-5, 20 m x 0.25 mm id., film 0.24 μ m
2. อุณหภูมิจุดฉีดสาร	230 °C
3. อุณหภูมิคอลัมน์	เป็นแบบโปรแกรมอุณหภูมิ คือเริ่มที่ 165 °C มีอัตราการเพิ่ม 7°C/min จนถึง 185°C และมีอัตราการเพิ่ม 10°C/min จนถึง 220°C และคงที่ 5 นาที
4. อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	300 °C
3. อัตราการไหลแก๊สตัวพา	แก๊สไนโตรเจน 2 ml/min
4. เครื่องตรวจวัด	ECD
5. ปริมาณสาร	1 ไมโครลิตร
6. เวลาในการวิเคราะห์	7 นาที

8/11/2016

68



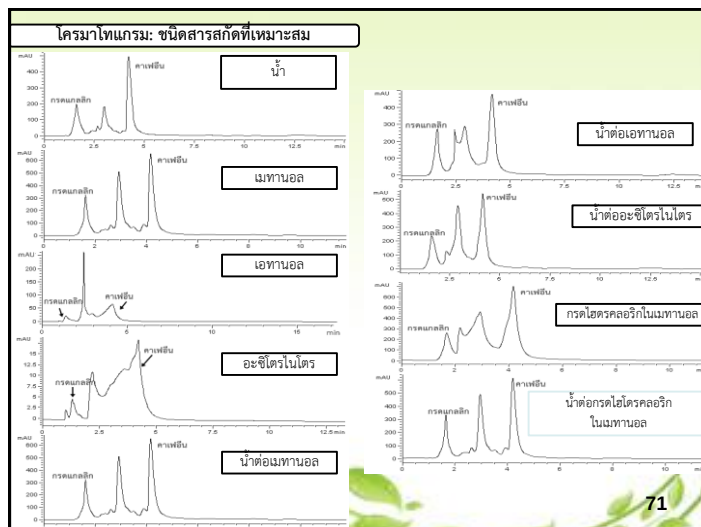
Determination of Gallic acid and Caffeine in tea by High performance Liquid Chromatography

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
คอลัมน์	C ₁₈ ขนาด 4.0 มิลลิเมตร× 250 มิลลิเมตร
ตัวตรวจวัด	อัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร
ชนิดตัวทำละลาย	เมทานอลต่อน้ำ
อัตราส่วนปริมาตรของตัวทำละลาย	1 มิลลิลิตรต่อน้ำ
ปริมาตรของสารตัวอย่าง	20.0 ไมโครลิตร
รีเทนชันไทม์ของกรดแกลลิก	1.582 นาที
รีเทนชันไทม์ของคาเฟอีน	4.263 นาที
ระยะเวลาในการวิเคราะห์	10.0 นาที

นางสาวณฤมล บุญส่ง

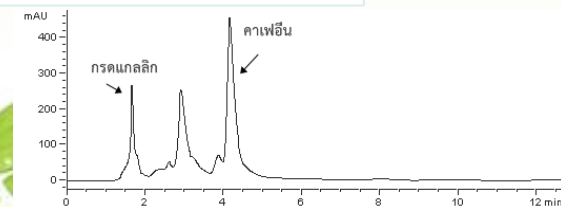
8/11/2016

70



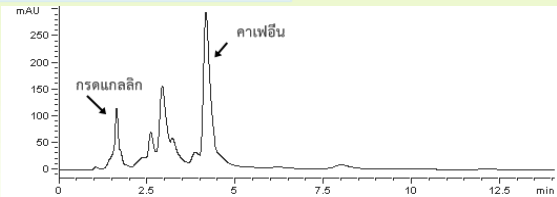
พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
สารสกัดที่เหมาะสม	น้ำต่อกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล
เทคนิคการสกัด	การ sonicated โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก
ระยะเวลาในการสกัด	15 นาที
อัตราส่วนของสารตัวอย่างต่อสารสกัด	5:1 ปริมาณต่อปริมาณ

โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างชาเขียวจีนกลั่นโสม

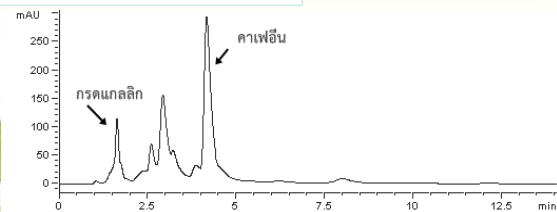


8/11/2016

โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างชาเขียวญี่ปุ่น



โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างชาเขียวจีน



8/11/2016

73