ST2092209 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับสุขภาพและเครื่องสำอาง 2

การแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์

(Separation and Purification)

ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ
Asst.Prof.Woravith Chansuvarn, Ph.D.

Chemographics
LINE woravith
woravith.c@rmutp.ac.th
https://sci.rmutp.ac.th/woravith

#แผนการเรียนรู้และการประเมินผลการเรียนรู้

2.2

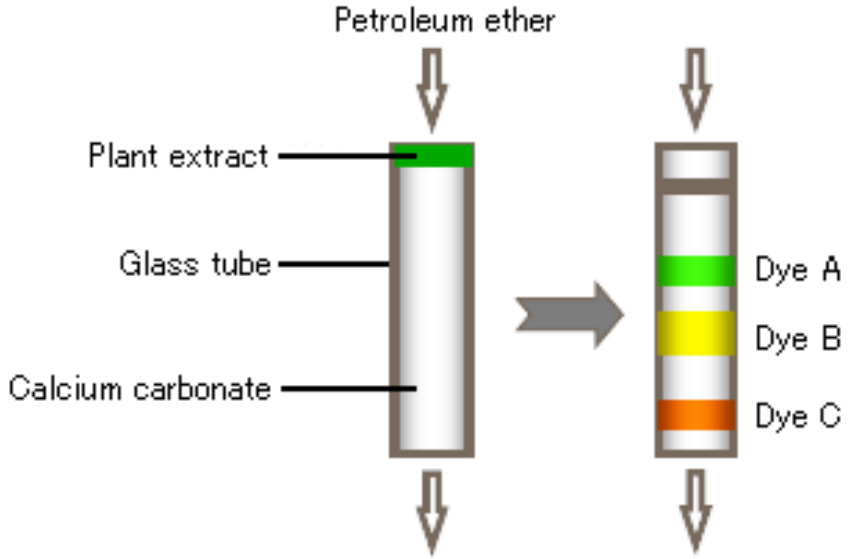
โครมาโทกราฟีเบื้องต้น

- อธิบายเทคนิคทางโครมาโทกราฟี
- อธิบายโครมาโทกราฟแบบกระดาษและแบบชั้นบาง
- อธิบายโครมาโทรกราฟีแบบแก๊สและของเหลว
- ปฏิบัติ การแยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

Background

Tswett (Michael S. Tswett, ชาวรัสเซีย) เสนอคำว่า **โครมาโทกราฟี** (chromatography : มาจากรากศัพท์ภาษากรีกคือ khromatos หมายถึง **สี** และ graphe หมายถึง ภาพบันทึก) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1903

เพื่ออธิบายการแยกรงควัตถุในพืชที่สกัดออกมาด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เมื่อผ่านลงสู่คอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วยผงแคลเซียมคาร์บอเนตมีการเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จนเห็นเป็นแถบสีของแต่ละรงควัตถุแยกออกจากกัน



เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

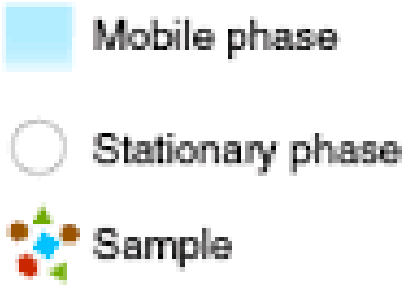
โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคเพื่อใช้ในการแยกสารผสม โดยให้องค์ประกอบของสารที่ถูกแยกกระจายอยู่ระหว่าง 2 วัฏภาค/เฟส (phase) คือ

- วัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase)
- วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

โดยอาศัยหลักการของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับของสารผสมนั้น ๆ

หลักการพื้นฐาน

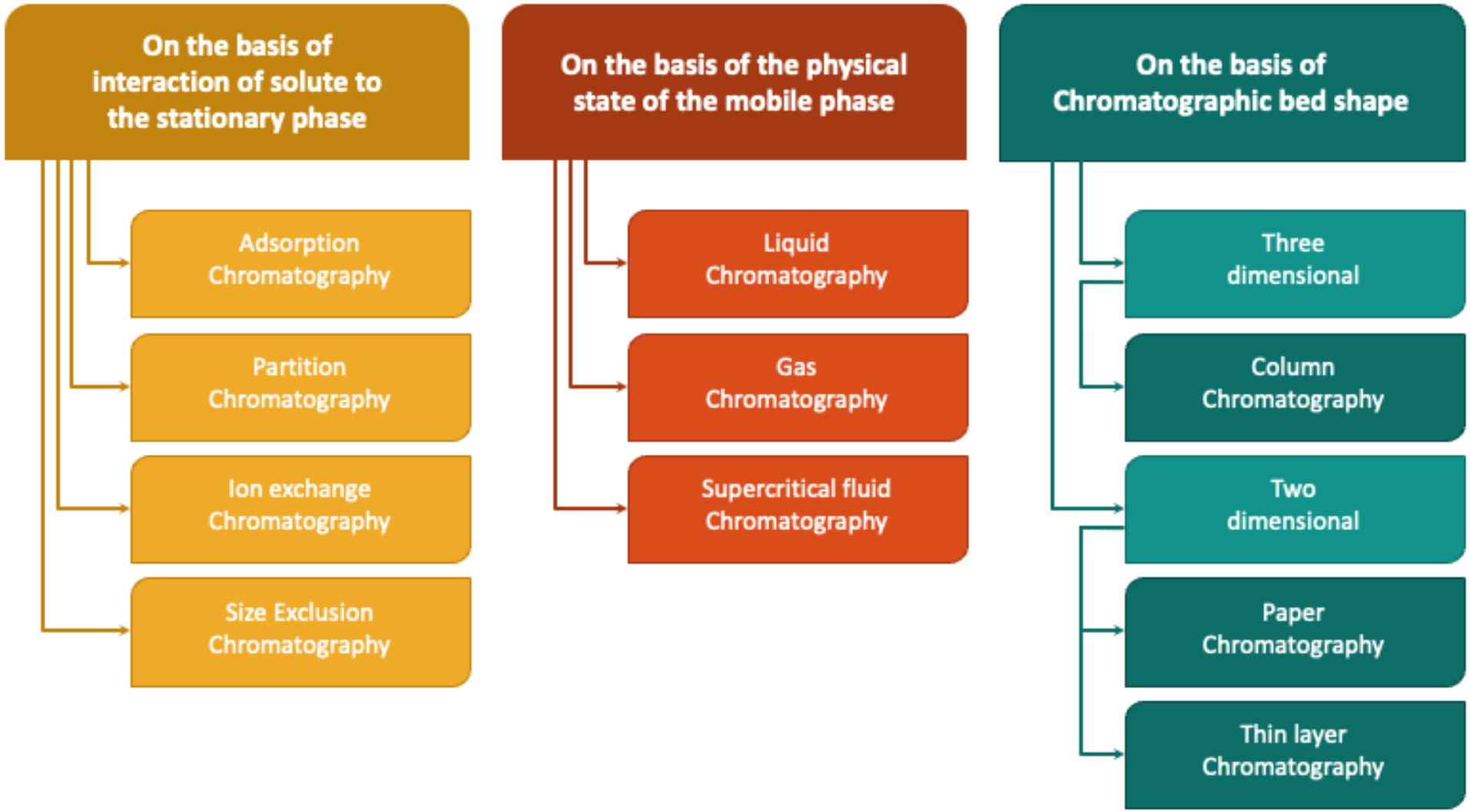
“สารที่ต้องการแยกแต่ละชนิดมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันเมื่อเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ภายใต้อิทธิพลของวัฏภาคเคลื่อนที่”



อัตราการเคลื่อนที่จะมากหรือน้อยผันแปรไปตามอัตราส่วนการกระจายตัวของสารนั้นในวัฏภาคอยู่กับที่และวัฏภาคเคลื่อนที่
เช่น สาร A มีการกระจายตัวสู่วัฏภาคอยู่กับที่มากกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสาร B ที่มีการกระจายตัวสู่วัฏภาคเคลื่อนที่มากกว่าวัฏภาคอยู่กับที่

CHROMATOGRAPHY

Classification of Chromatography



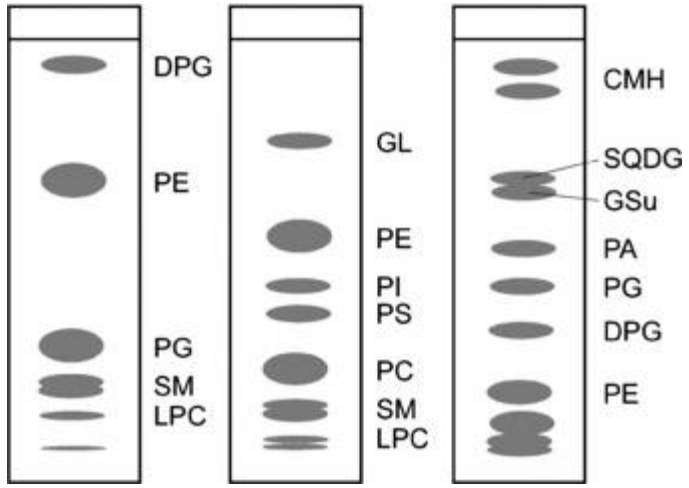
โครมาโทกราฟแบบกระดาษและแบบชั้นบาง

โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper Chromatography)

- ใช้หลักการกระจายตัวในการแยกสารที่มีองค์ประกอบมากกว่า 2 ชนิดและมักเป็นสารที่มีสี
- อาศัยความสามารถในการละลายของสารที่เป็นตัวทำละลายและความสามารถในการถูกดูดซับบนตัวดูดซับที่แตกต่างกัน

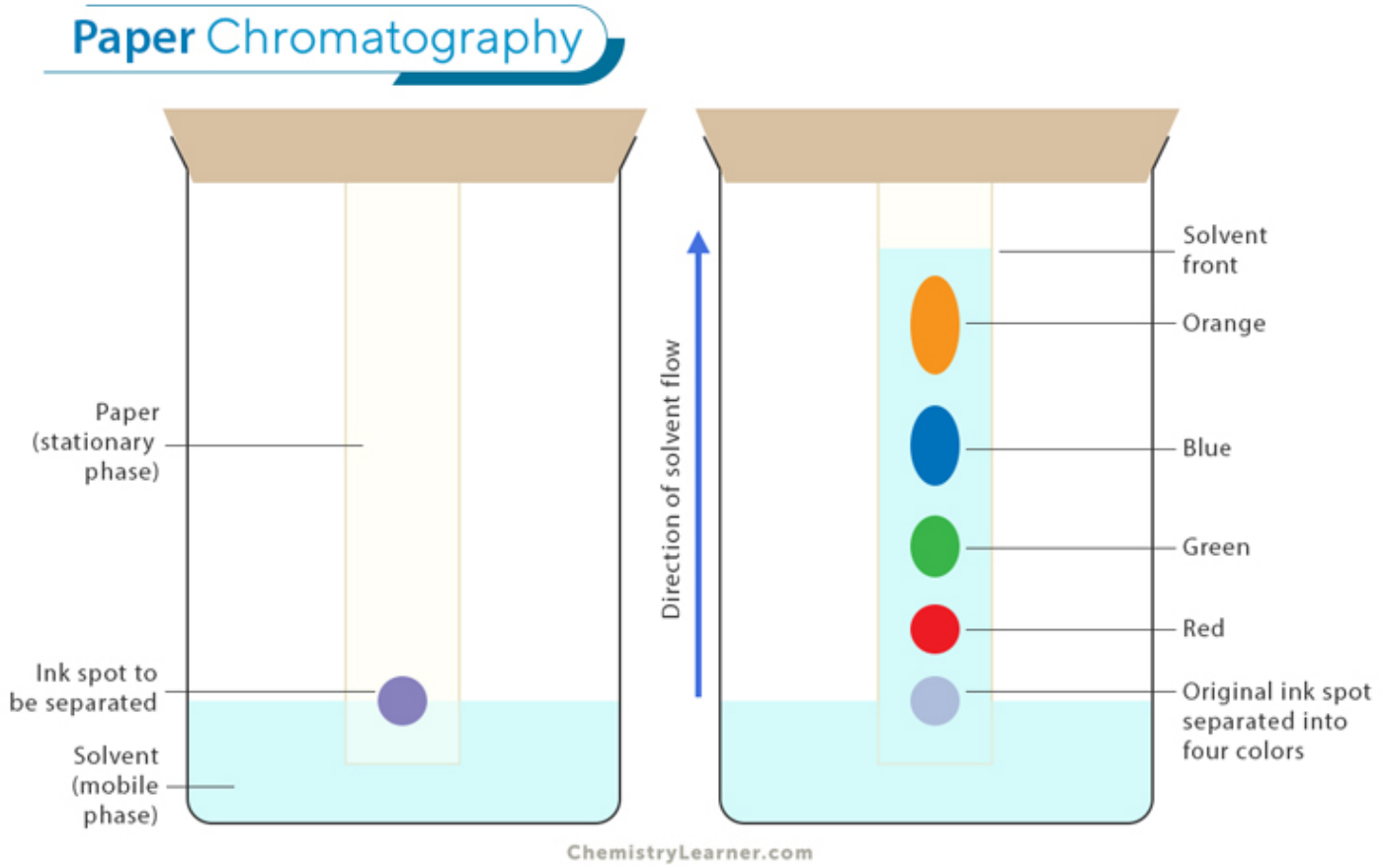
โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin-Layer chromatography; TLC)

- ใช้หลักการแบบดูดซับ โดยวัฏภาคอยู่กับที่จะเป็นอะลูมินา (alumina, Al_2O_3) หรือซิลิกาเจล (silica gel, SiO_2) เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่อาจจะเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้



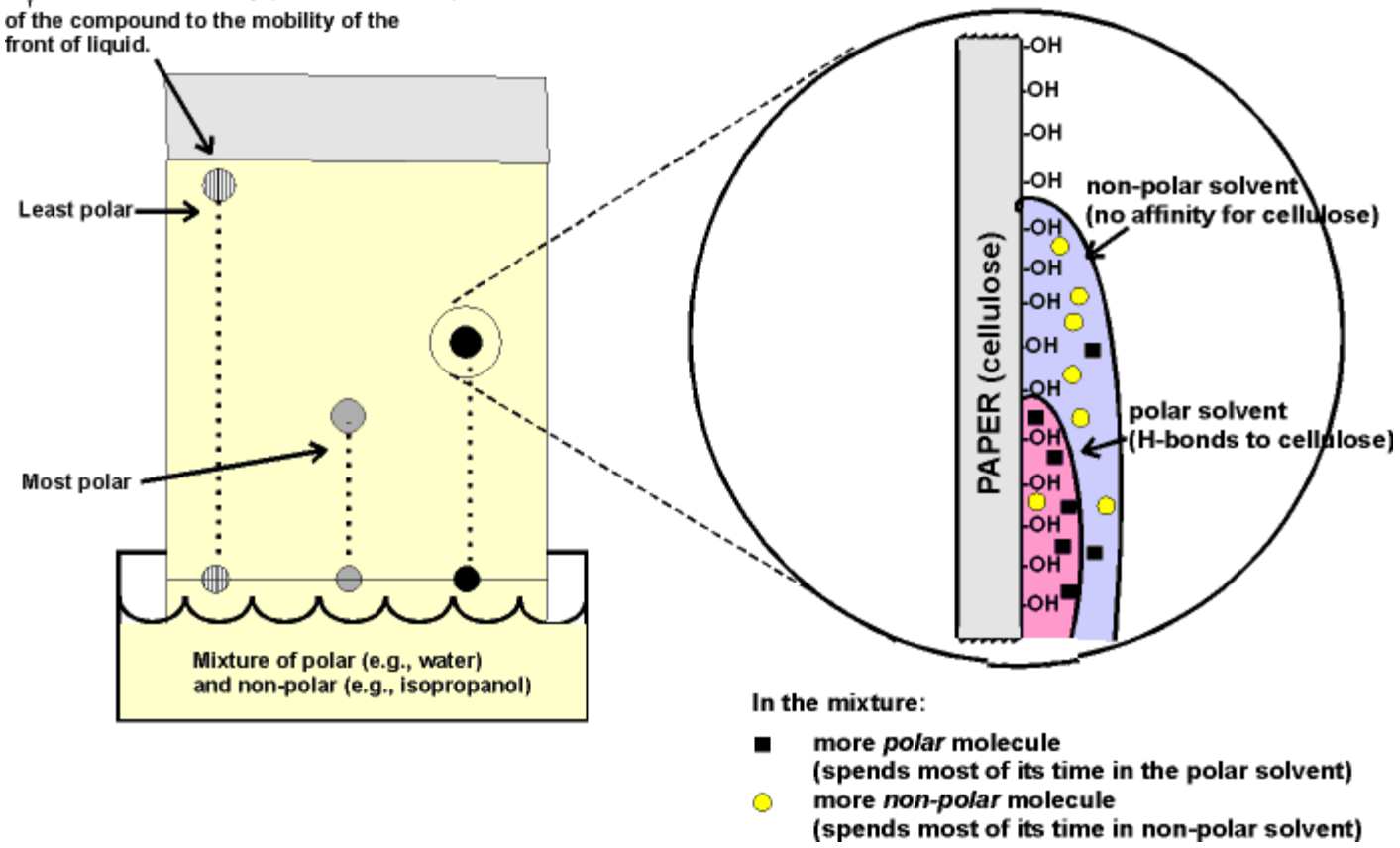
โครมาโทกราฟแบบกระดาษ

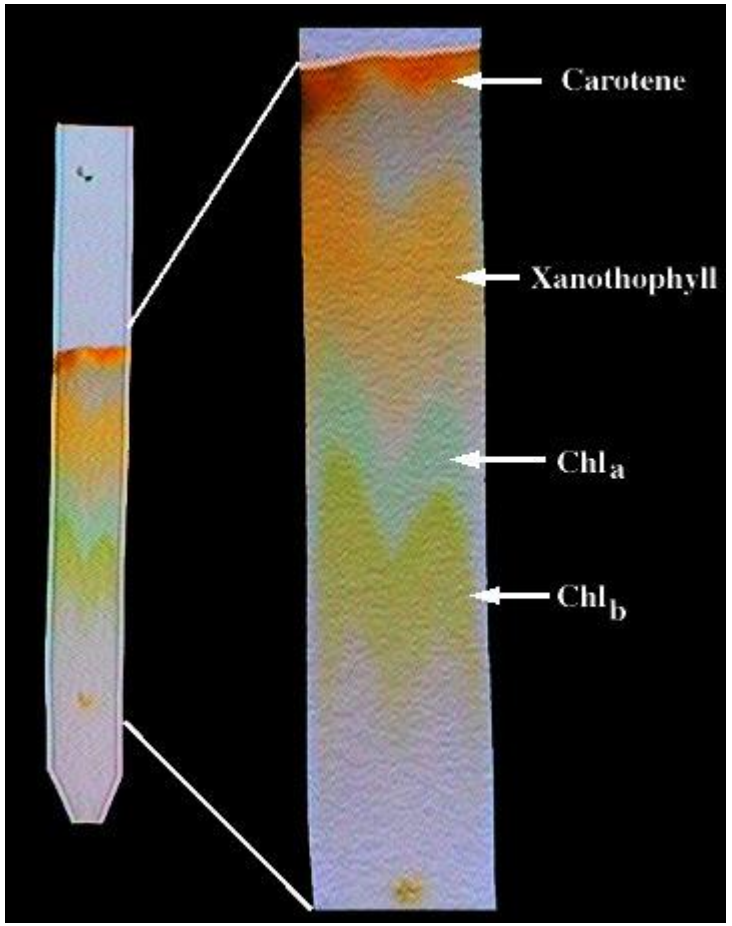
- ใช้หลักการกระจายตัวในการแยกสารที่มีองค์ประกอบมากกว่า 2 ชนิดและมักเป็นสารที่มีสี
- อาศัยความสามารถในการละลายของสารที่เป็นตัวทำละลาย และความสามารถในการถูกดูดซับบนตัวดูดซับที่แตกต่างกัน



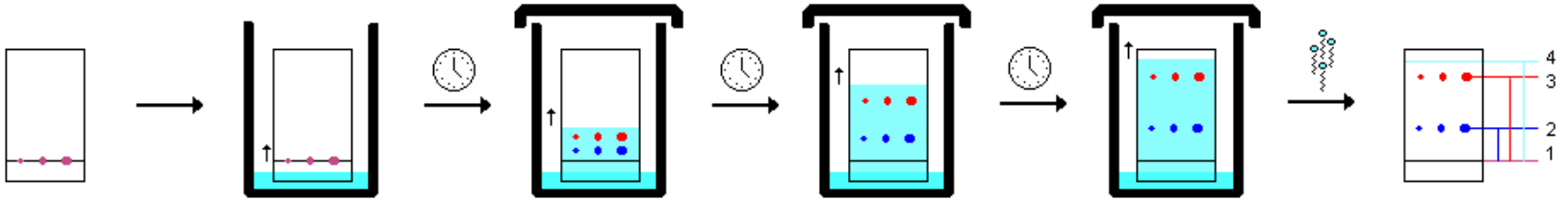
Paper chromatography

R_f = ratio of the mobility (distance traveled) of the compound to the mobility of the front of liquid.





solution of liquid plant pigments



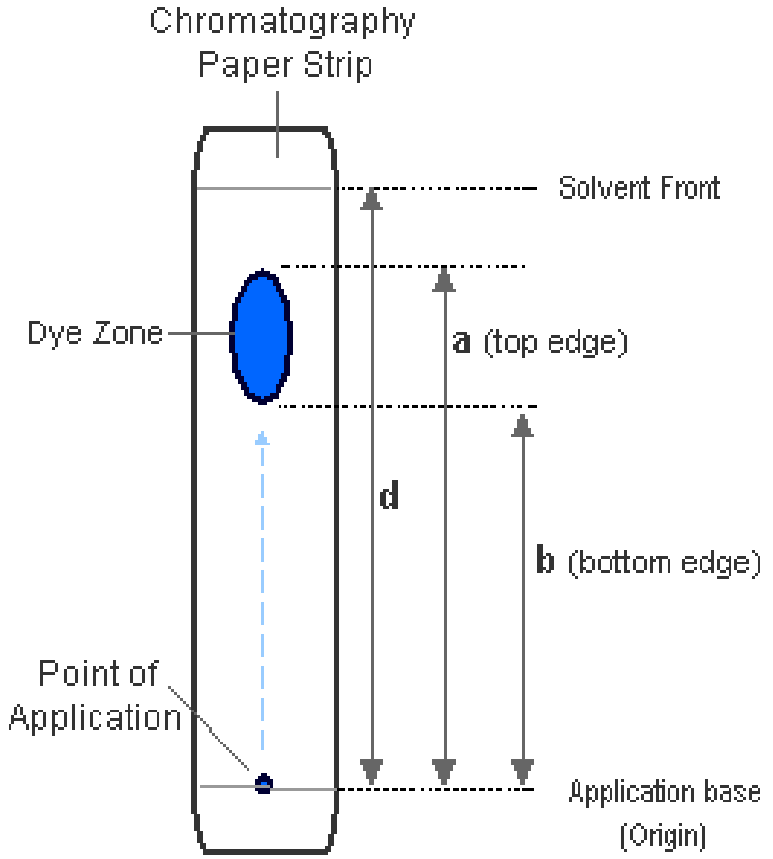
Retention factor (R_f)

$$R_f = \frac{\text{distance traveled by sample}}{\text{distance traveled by solvent}}$$

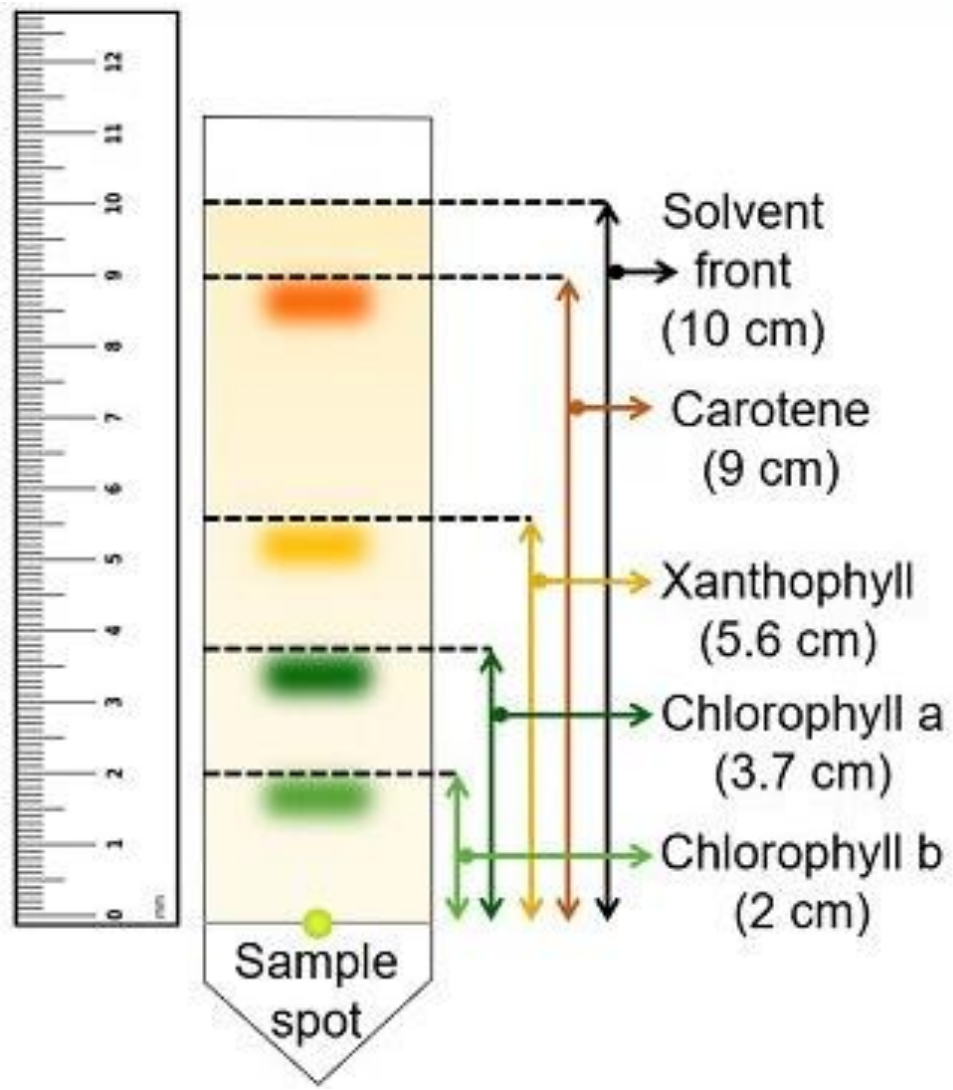
The R_f value can be used to identify compounds due to their uniqueness to each compound. When comparing two different compounds under the same conditions, the compound with the larger Rf value is less polar because it does not stick to the stationary phase as long as the polar compound, which would have a lower R_f value.

If it is desired to express positions relative to the position of another substance, x, the R_x (relative retention value)

$$R_x = \frac{\text{distance of compound from origin}}{\text{distance of compound x from origin}}$$



RF top = RF(a) = (a) / d
RF bottom = RF(b) = (b) / d
RF center = RF(c) = [(a+b)/2] / d



1. Light green spot indicates **chlorophyll-b** pigment.

- Rf value= Distance chlorophyll-b travelled / Distance solvent travelled = 2/10 = 0.2

2. Dark green spot represents **chlorophyll-a** pigment.

- Rf value= Distance chlorophyll-a travelled / Distance solvent travelled = 3.7/10 = 0.37

3. The yellow band represents **xanthophyll** pigment.

- Rf value= Distance xanthophyll travelled / Distance solvent travelled = 5.6/10 = 0.56

4. The yellow-orange band indicates **carotene** pigment.

- Rf value= Distance carotene travelled / Distance solvent travelled = 9/10 = 0.9

Factors affecting the R_f

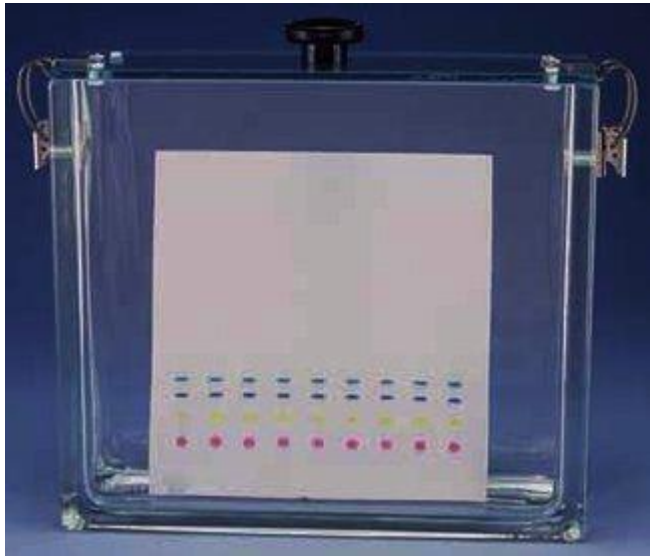
- Stationary phase
- The concentration of the stationary phase
- Mobile phase
- The concentration of the mobile phase
- Temperature

The R_f value of compounds in the mixture differs by any changes in the concentration of stationary and mobile phases.

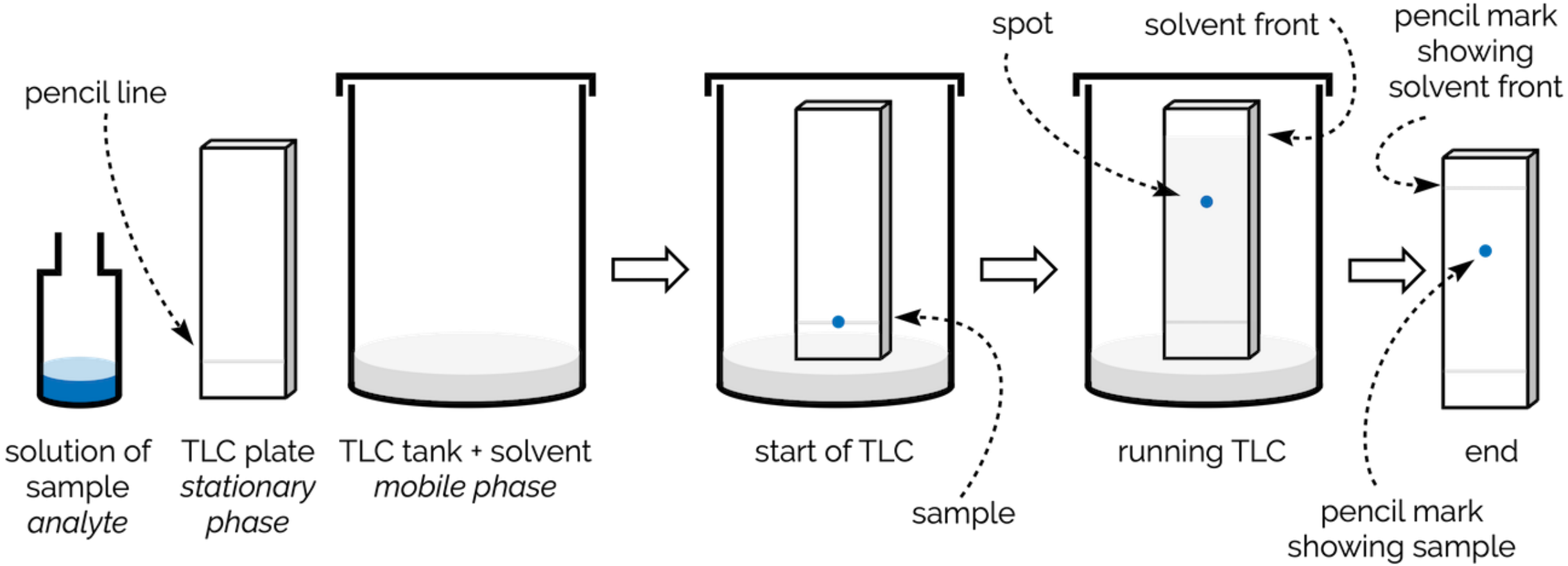
- Temperature affects the solvent capillary movement and the analyte's solubility in the solvent.
- Rf value is independent of the sample concentration.
- R_f value is always **positive**.

โครมาโทกราฟแบบชั้นบาง

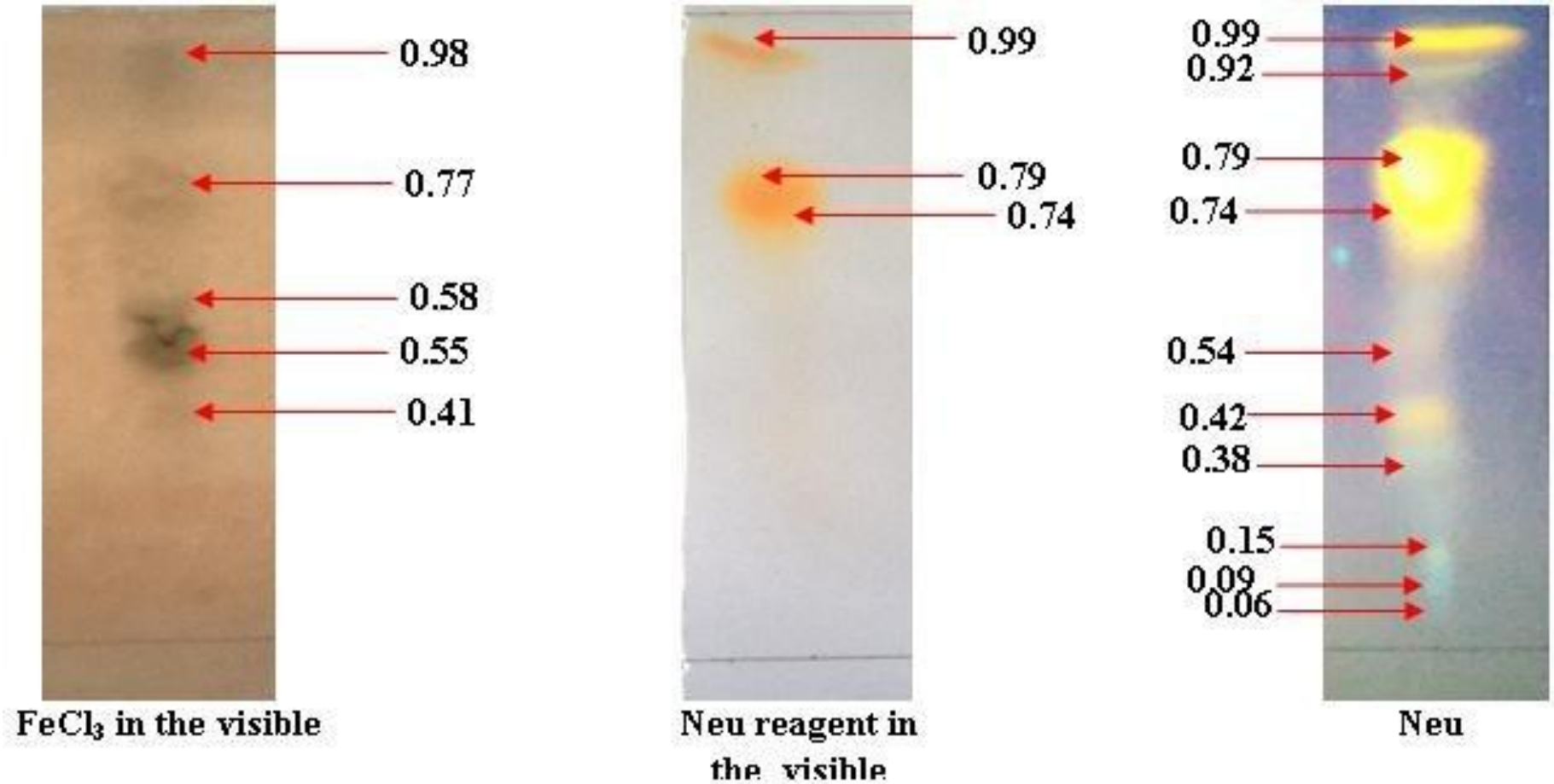
TLC เป็นวิธีการเบื้องต้นสาหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารประกอบอินทรีย์ทั้งด้านการสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อพิจารณาจำนวนองค์ประกอบในสารผสมและวินิจฉัย (identify) องค์ประกอบนั้น ๆ โดยการเปรียบเทียบกับสารประกอบที่ทราบสูตรโครางสร้างแล้ว



- วัฏภาคอยู่กับที่เป็น Al_2O_3 ใช้ได้ดีกับสารที่เป็นเบส
- วัฏภาคอยู่กับที่เป็น SiO_2 ใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด (โดยเฉพาะสารที่เป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นเบสที่อ่อนมาก)


pencil line
solution of sample *analyte*
TLC plate *stationary phase*
TLC tank + solvent *mobile phase*
start of TLC
sample
spot
solvent front
running TLC
pencil mark showing solvent front
end
pencil mark showing sample

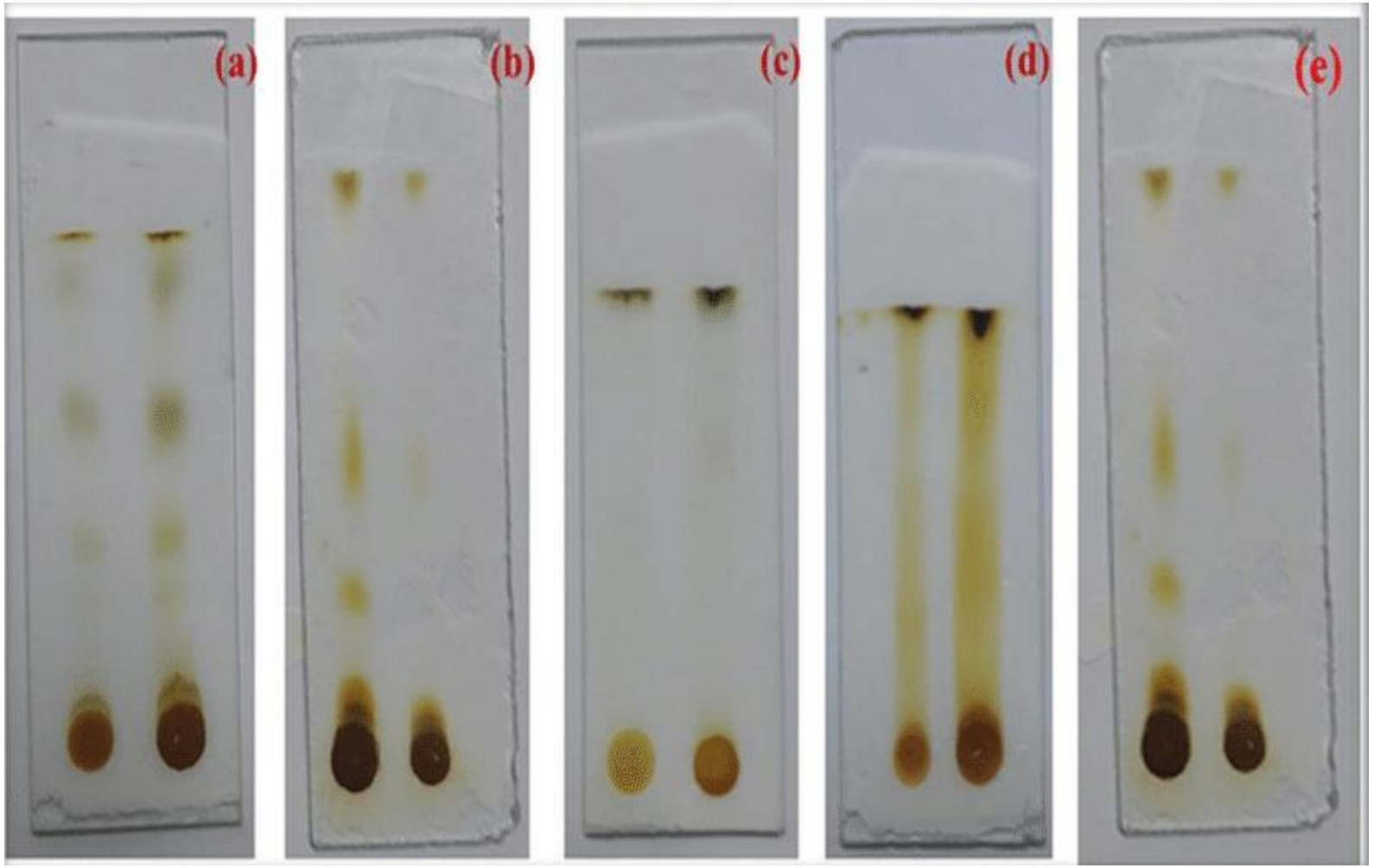
Stationary Phase	Chromatographic Mechanism	Typical Application
Silica Gel	adsorption	steroids, amino acids, alcohols, hydrocarbons, lipids, aflaxtoxin, bile, acids, vitamins, alkaloids
Silica Gel RP	reversed phase	fatty acids, vitamins, steroids, hormones, carotenoids
Cellulose, kieselguhr	partition	carbohydrates, sugars, alcohols, amino acids, carboxylic acids, fatty acids
Aluminum oxide	adsorption	amines, alcohols, steroids, lipids, aflatoxins, bile acids, vitamins, alkaloids
PEI cellulose	ion exchange	nucleic acids, nucleotides, nucelosides, purines, pyrimidines
Magnesium silicate	adsorption	steroids, pesticides, lipids, alkaloids



Tano, M., Kabran, G., Roger, M., et al. (2018). Thin layer chromatographic profiles and antioxidants capacity of leaf extracts of Nelumbo Nucifera Gaertn. (NELUMBONACEAE) from Cote D'ivoire. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*.

TLC Plate of methanolic extract of leaves of Gymnema sylvestre developed using

ผักเชียงดา
(*Gymenema Sylvestre*)



Tolune Chloroform Ethylacetate Ethylacetate + methanol (12:3) Methanol

Kumar, P. V. & Ahamed, A. J. (2017). Identification of bioactive compounds from the methanolic leaf extract of *Gymenema Sylvestre*. *Journal of Advanced Applied Scientific Research*. 1. 10.46947/joaasr18201763.

โครมาโทรกราฟีแบบคอลัมน์

โครมาโทรกราฟีแบบคอลัมน์เป็นการแยกสาร โดยวัฏภาคอยู่กับที่ (ตัวดูดซับ) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่วัฏภาคเคลื่อนที่คือตัวทำละลายหรือตัวชะที่ไหลผ่านคอลัมน์

ดังนั้น สารต่าง ๆ จะแยกออกจากกันตามความสามารถในการยึดกับตัวดูดซับ และการละลายในตัวชะ

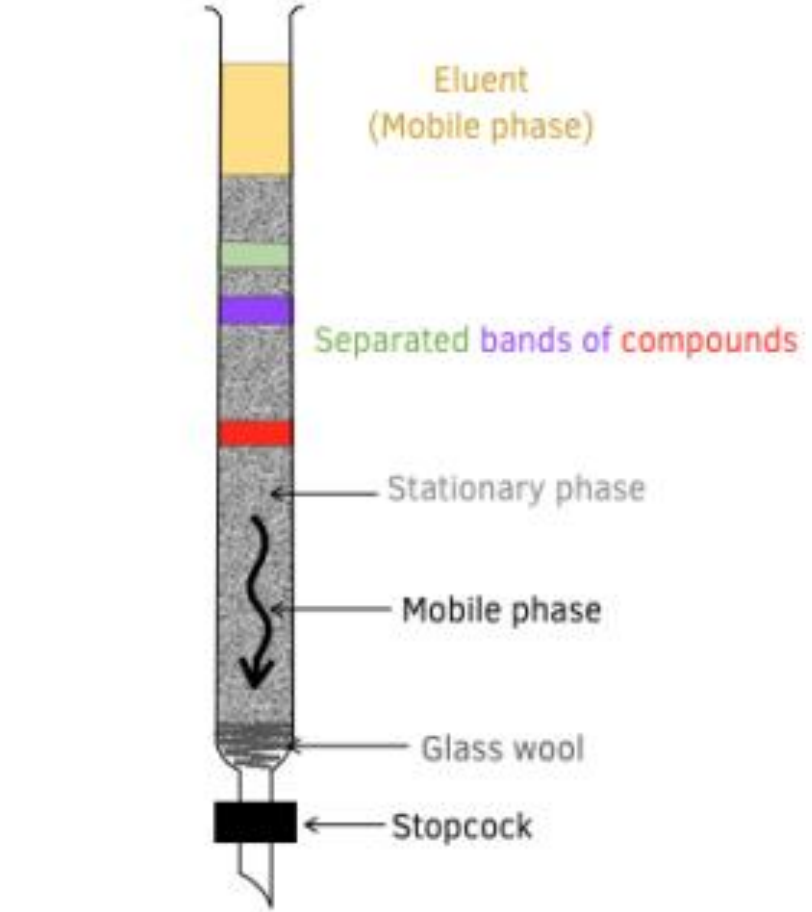
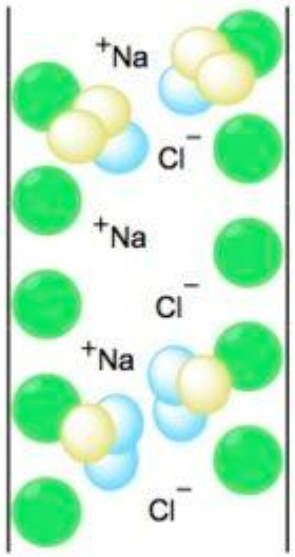


Fig 1. Column Chromatography Set-Up. The mobile phase flows downwards through the solid stationary phase.

Column chromatography types

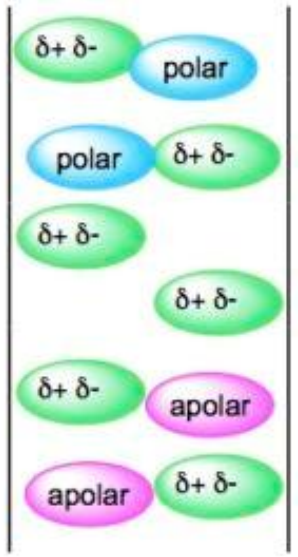
No.	Types of column chromatography	Mobile phase	Stationary phase	Sample phase
1	Adsorption chromatography	Liquid	Solid adsorption	Solution
2	Partition chromatography	Liquid	Immiscible solvent on solid matrix	Solution
3	Ion-exchange chromatography	Liquid	Ion exchange resin	Solution
4	Gel chromatography	Liquid	Solvent held in the interstices of polymetric solvent	Solution

How Chromatography Works: The Fundamental Principle



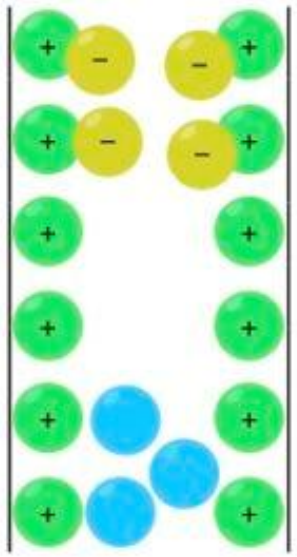
Hydrophobic Interaction (hydrophobicity)

To separate molecules based on their hydrophobicity



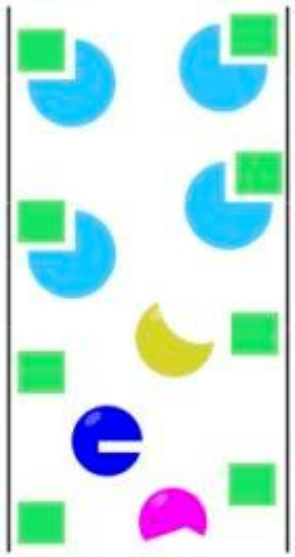
Normal-phase (polarity)

To separate molecules by their polarity



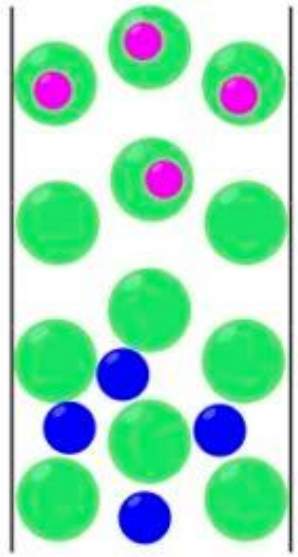
Ion-exchange (net charge)

To separate molecules based on their ionic interactions



Affinity (specific binding)

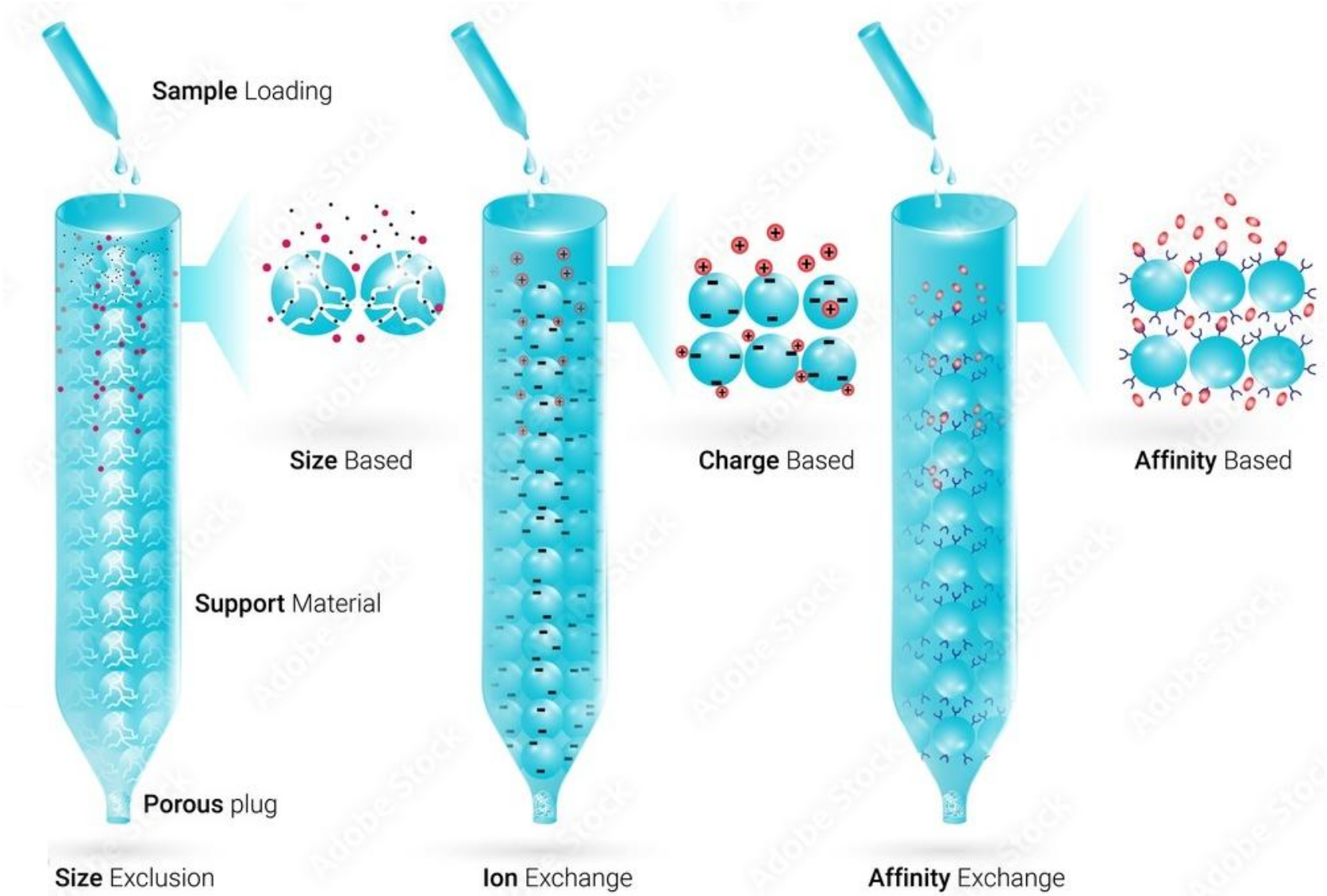
To separate molecules based on their ability to bind *specific* small molecules or biomolecules



Size-exclusion (molecular size)

To separate molecules by their size

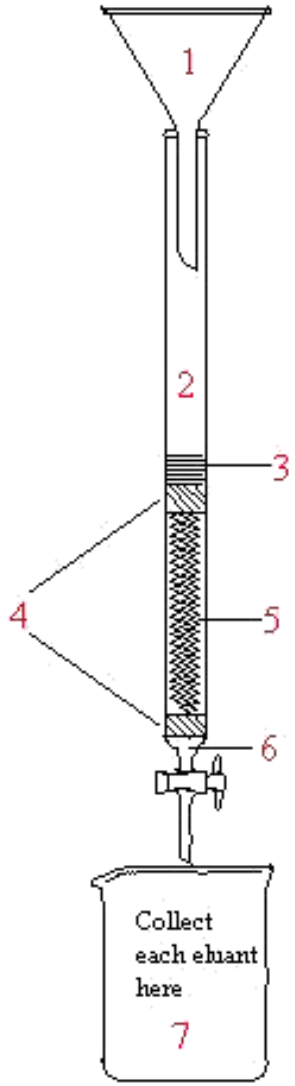
Ref. https://bitesizebio.com/30007/how-chromatography-works


Sample Loading
Size Based
Charge Based
Affinity Based
Support Material
Porous plug
Size Exclusion
Ion Exchange
Affinity Exchange

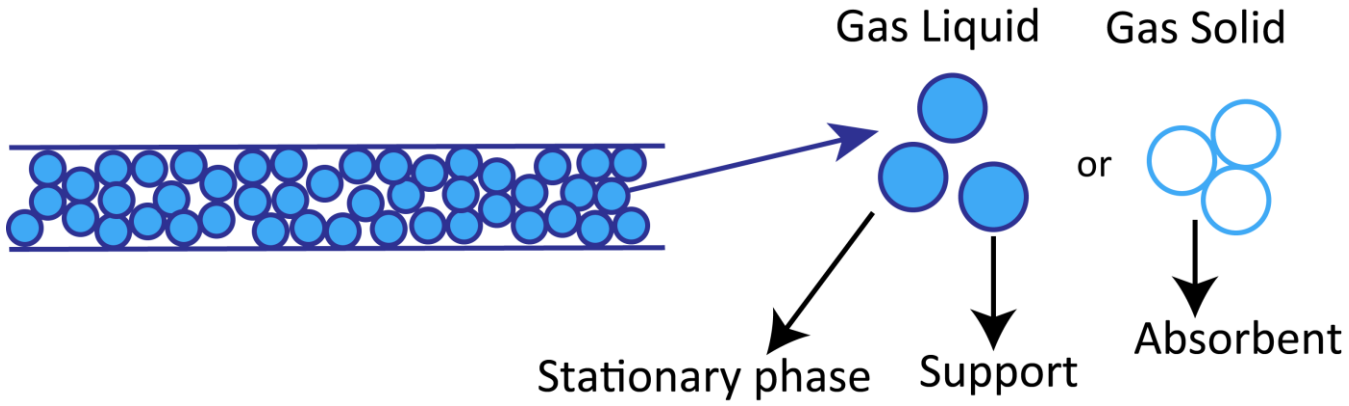
https://www.youtube.com/watch?v=-4S6L_szMU8

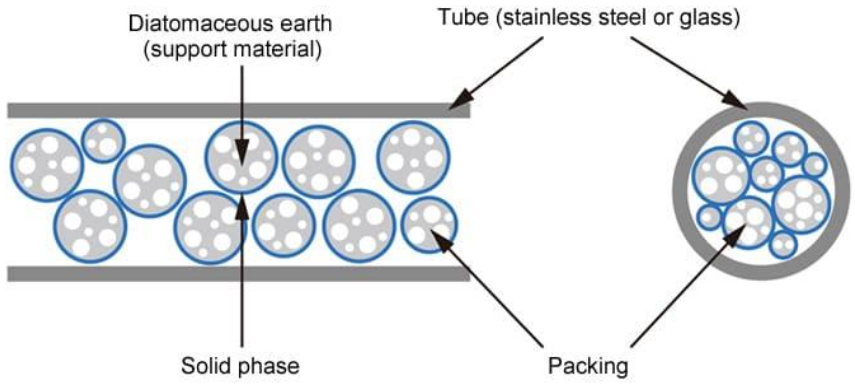
คอลัมน์ : Packed Column

ตัวดูดซับที่ทำหน้าที่แยกสารจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์



1 liquid funnel
2 glass column
3 eluent
4 sand (ca. 1 cm)
5 adsorbent (alumina)
6 glass wool (not shown)
7 collection flask





[Demonstration - Wet Packing a Chromatography Column]

ตัวดูดซับที่ใช้โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ทิศทางการลดลงของกลังการดูดซับ

- อะลูมินา (Alumina)
- ถ่าน (Charcoal)
- ซิลิกาเจล (Silica gel)

ตัวดูดซับอย่างแรง

- แมกนิเซีย (Magnesia)
- แมกนีเซียมคาร์บอเนต (Magnesium carbonate)
- แคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate)
- แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)

ตัวดูดซับปานกลาง

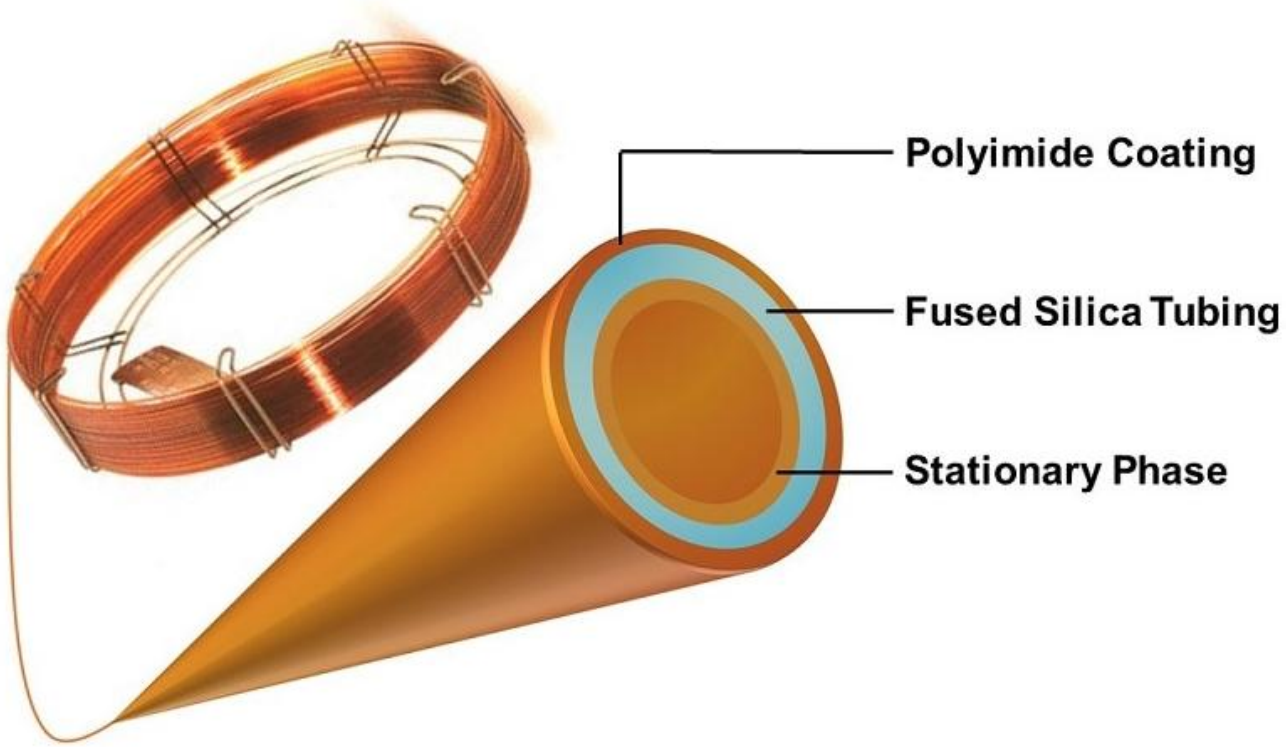
- อินูลิน (Inulin)
- แป้ง (Starch)
- ซูโครส (Sucrose)
- เซลลูโลส (Cellulose)

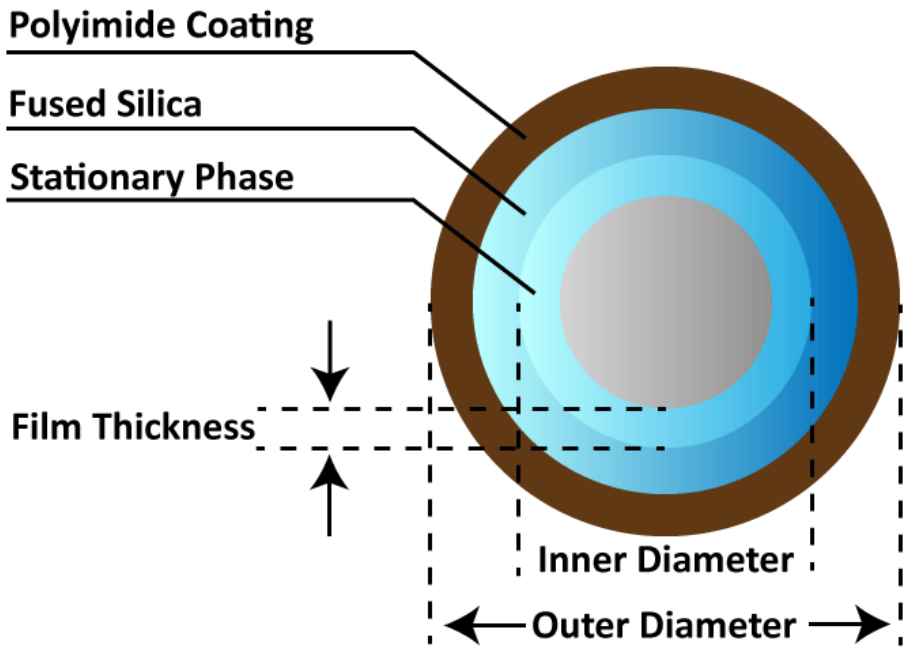
ตัวดูดซับอย่างอ่อน

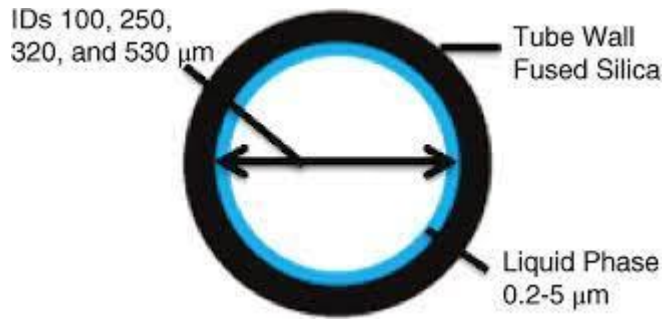
https://www.youtube.com/watch?v=ItTtnVKcqDw

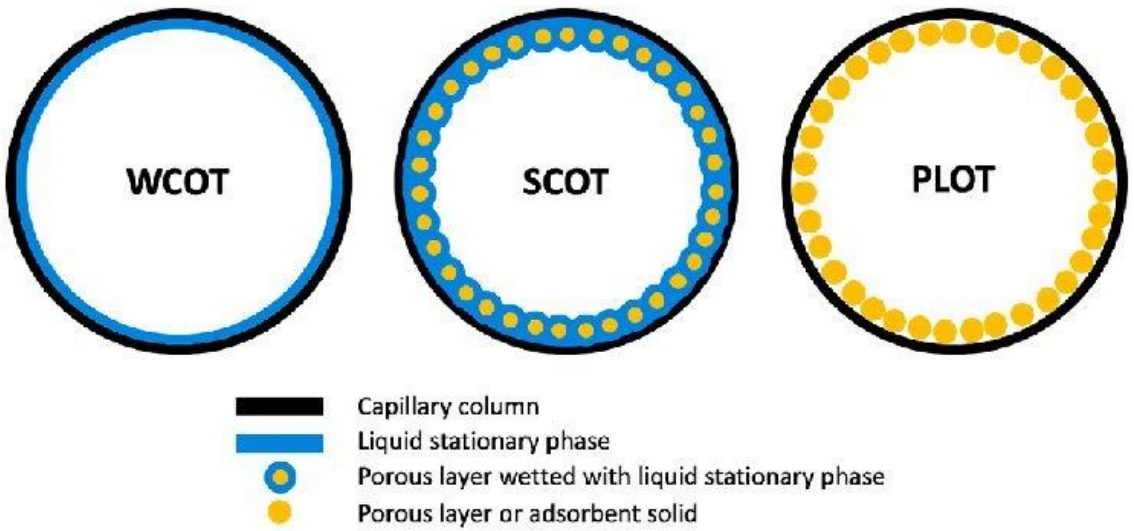
คอลัมน์ : Capillary Column

ตัวดูดซับแบบชั้นฟิลม์เคลือบอยู่บนผิวด้านในของคอลัมน์



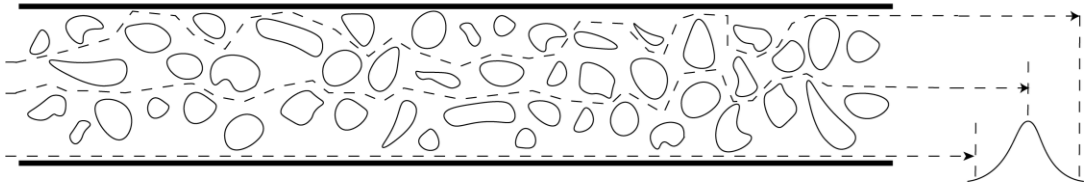



IDs 100, 250,
320, and 530 µm
Tube Wall
Fused Silica
Liquid Phase
0.2-5 µm

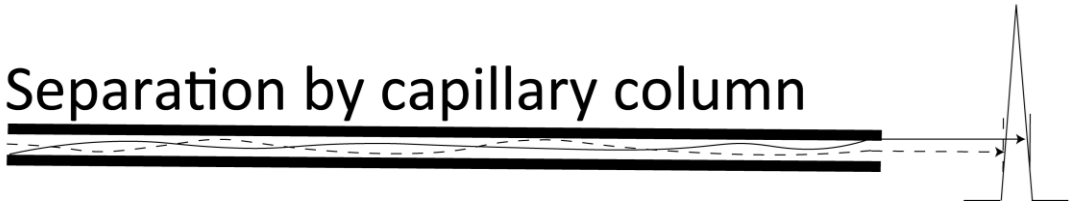

WCOT
SCOT
PLOT
Capillary column
Liquid stationary phase
Porous layer wetted with liquid stationary phase
Porous layer or adsorbent solid

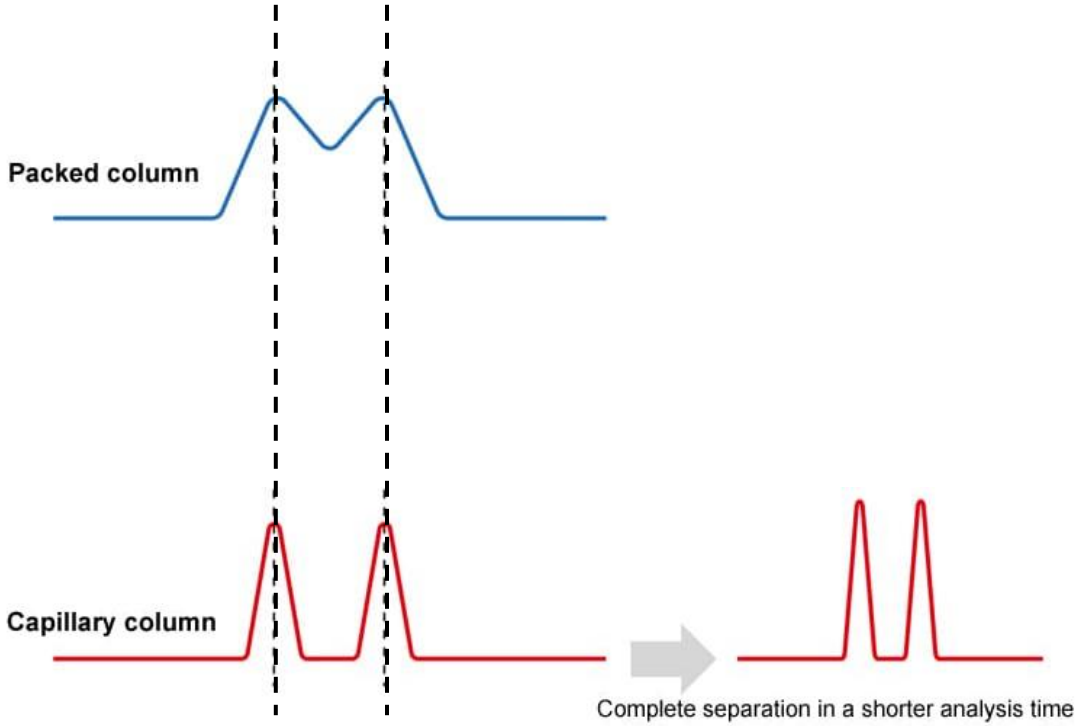
ALTMANN
ANALYTIK
GC Column Quality Assurance Test
Dear Customer,
thank you for choosing an ALTMANN ANALYTIK product.
In the box You can find all the instructions for the GC column installation and testing and the Test Mixture Sample. Attached you can also find the Quality Assurance Test Chromatogram.
Column Specifications
STATIONARY PHASE: AAGC-624
FILM THICKNESS: 1.80 µm
INTERNAL DIAMETER: 0.32 mm
LENGTH: 30 m
Crossbond
TEMPERATURE MAX: 240 - 260°C
SERIAL NUMBER: 181573 T
PART NUMBER: AAGC-624-03218030
Chromatographic Conditions
230°C

Separation by packed column



Separation by capillary column

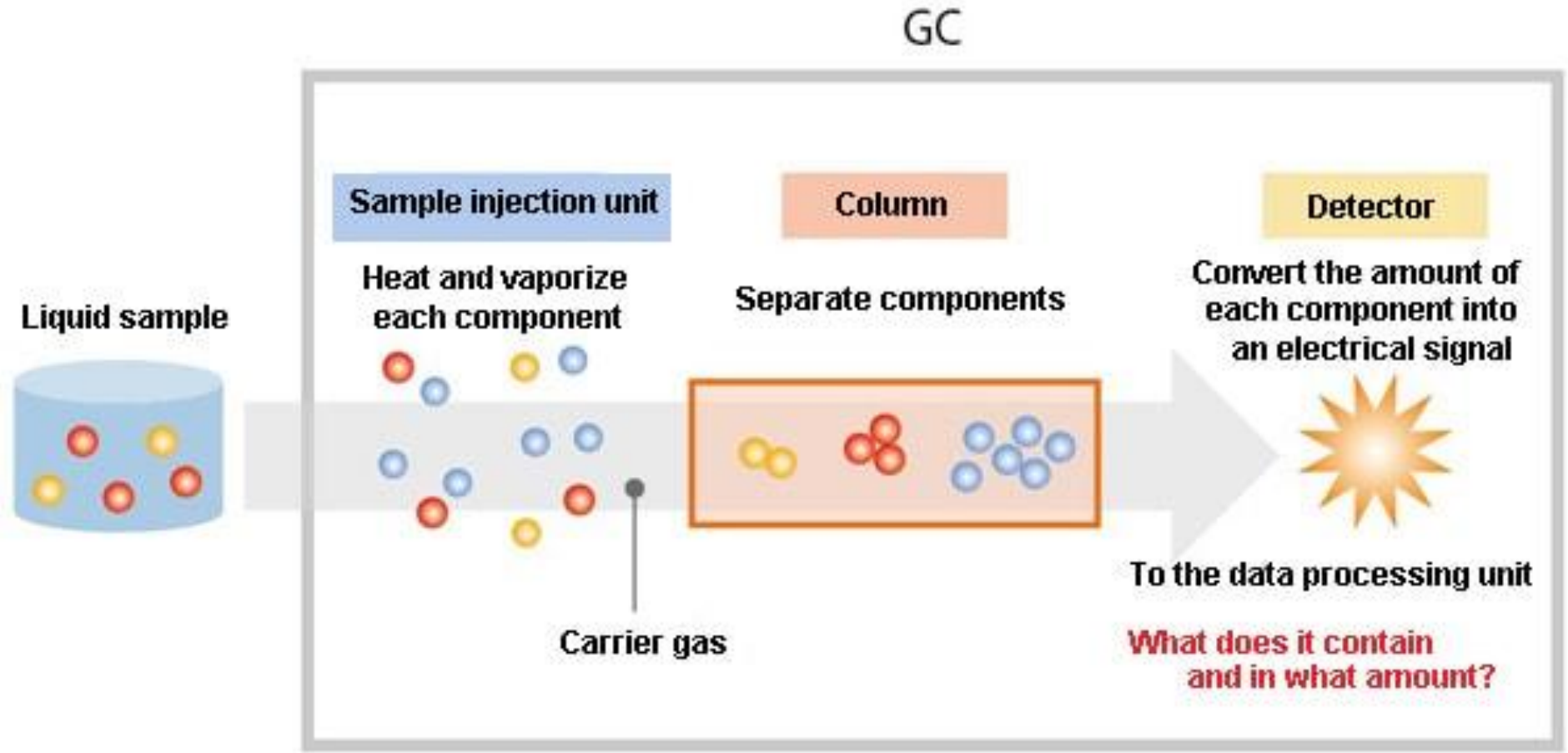




โครมาโทรกราฟีแบบแก๊ส : GC

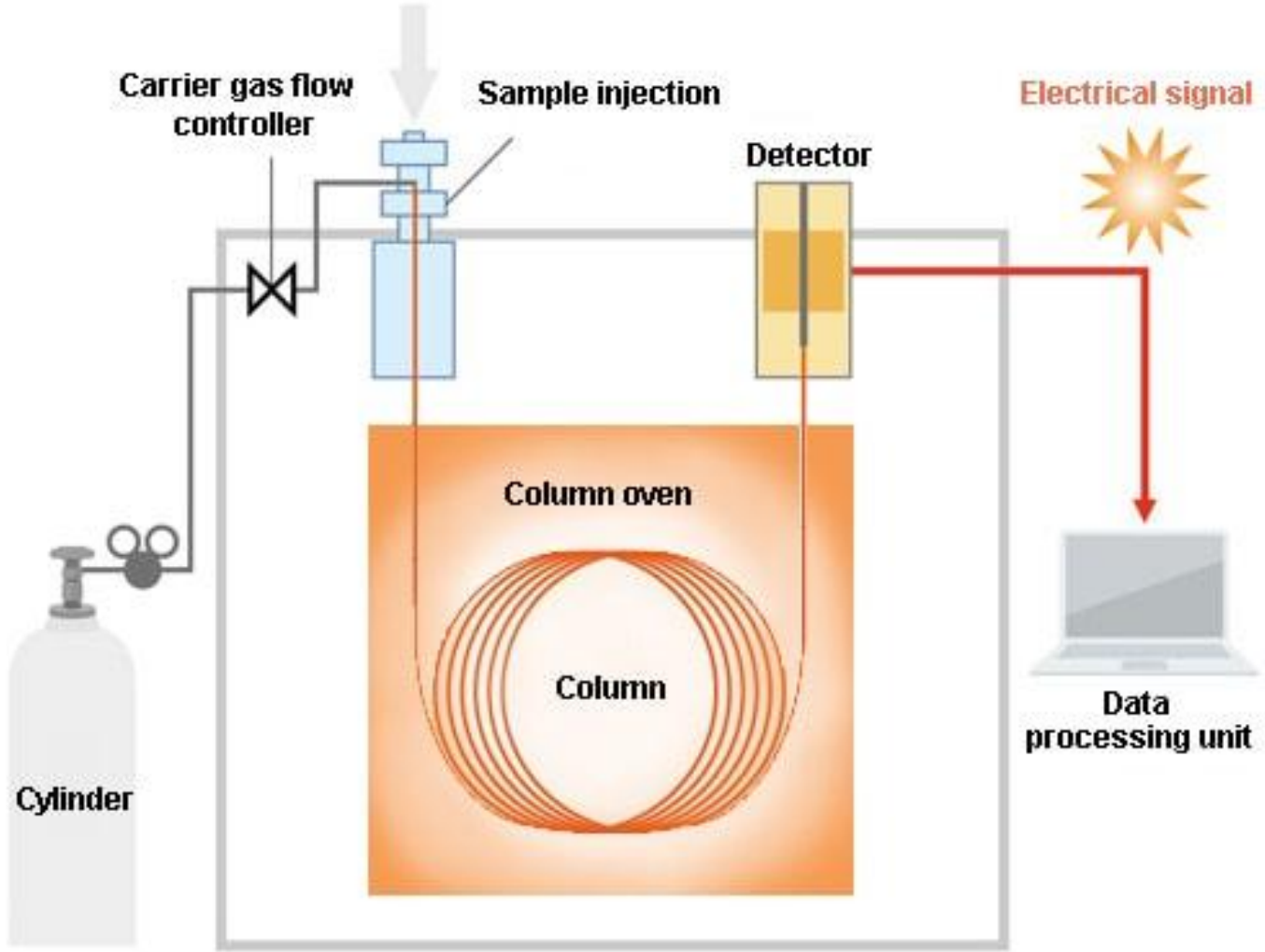
Mobile phase : Gas

- วัฏภาคอยู่กับที่ คือสารที่เคลือบผิวหรือบรรจุอยู่ภายในคอลัมน์
- วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ แก๊สตัวพา (นิยมใช้เป็น He)
- เมื่อสารผสมถูกฉีดเข้าเครื่อง ณ บริเวณหัวฉีด ซึ่งเป็นบริเวณที่ให้ความร้อนมีอุณหภูมิสูงพอที่จะทำให้สารผสมเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊ส และส่วนแก๊สของสารผสมจะเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ โดยอาศัยแก๊สตัวพา และมีการให้ความร้อนของคอลัมน์ด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิ ทำให้เกิดกระบวนการแยกขึ้น จากนั้นสารผสมที่ถูกแยกภายในคอลัมน์จะเคลื่อนที่เข้าสู่ตัวตรวจวัด

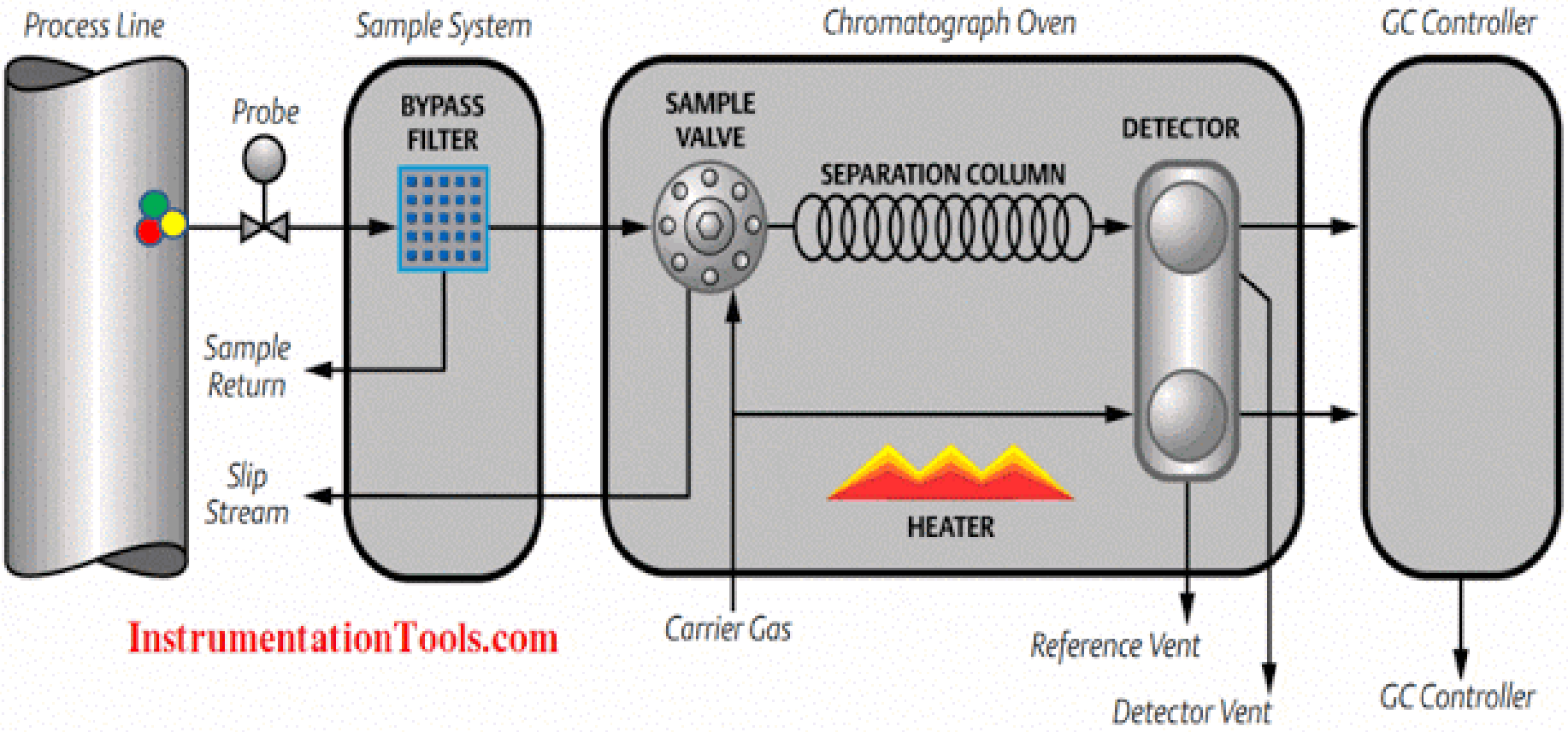


https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/index.html

GC diagram


Carrier gas flow controller
Sample injection
Detector
Electrical signal
Column oven
Column
Cylinder
Data processing unit

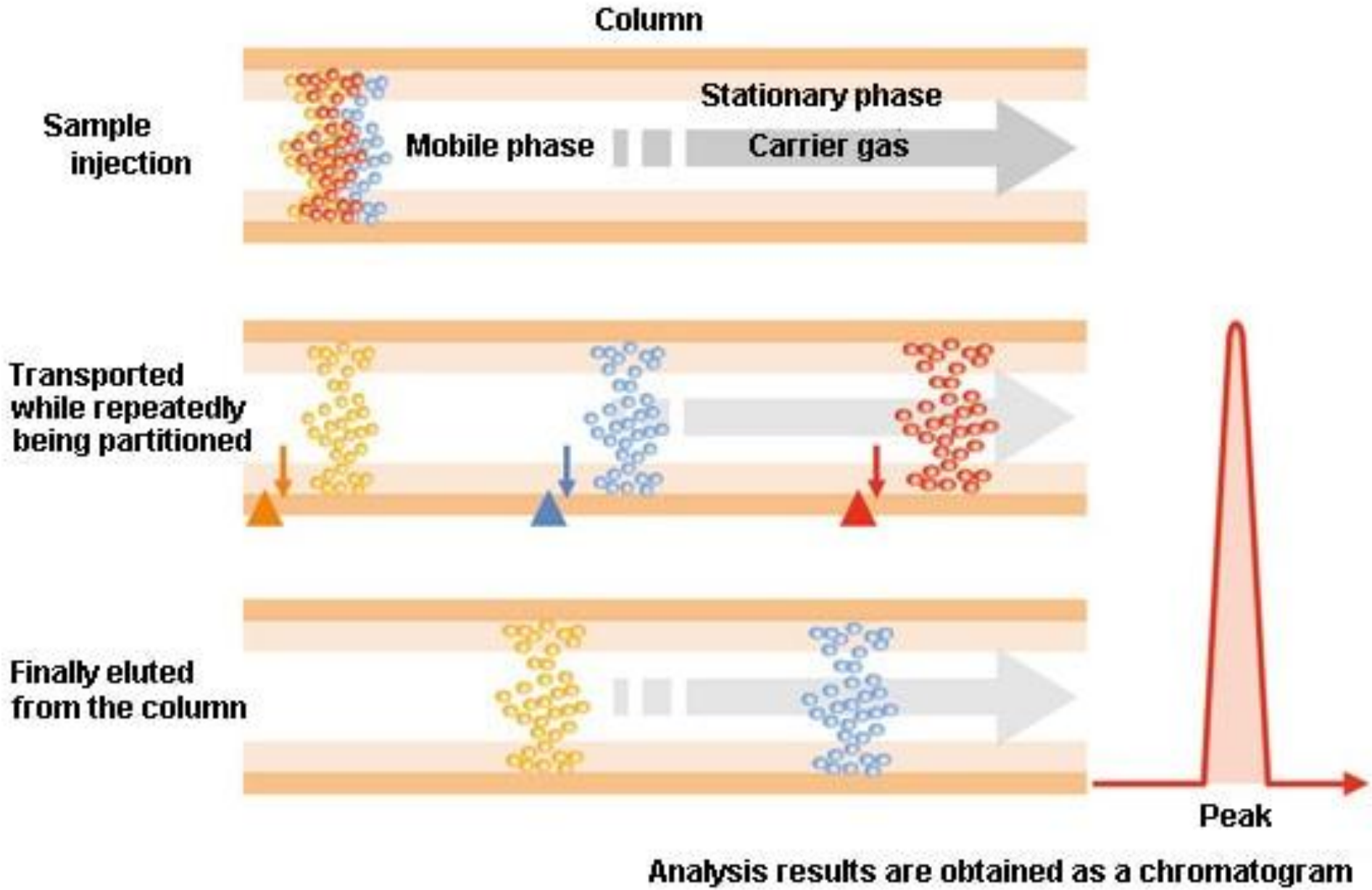
Gas Chromatograph Working Principle



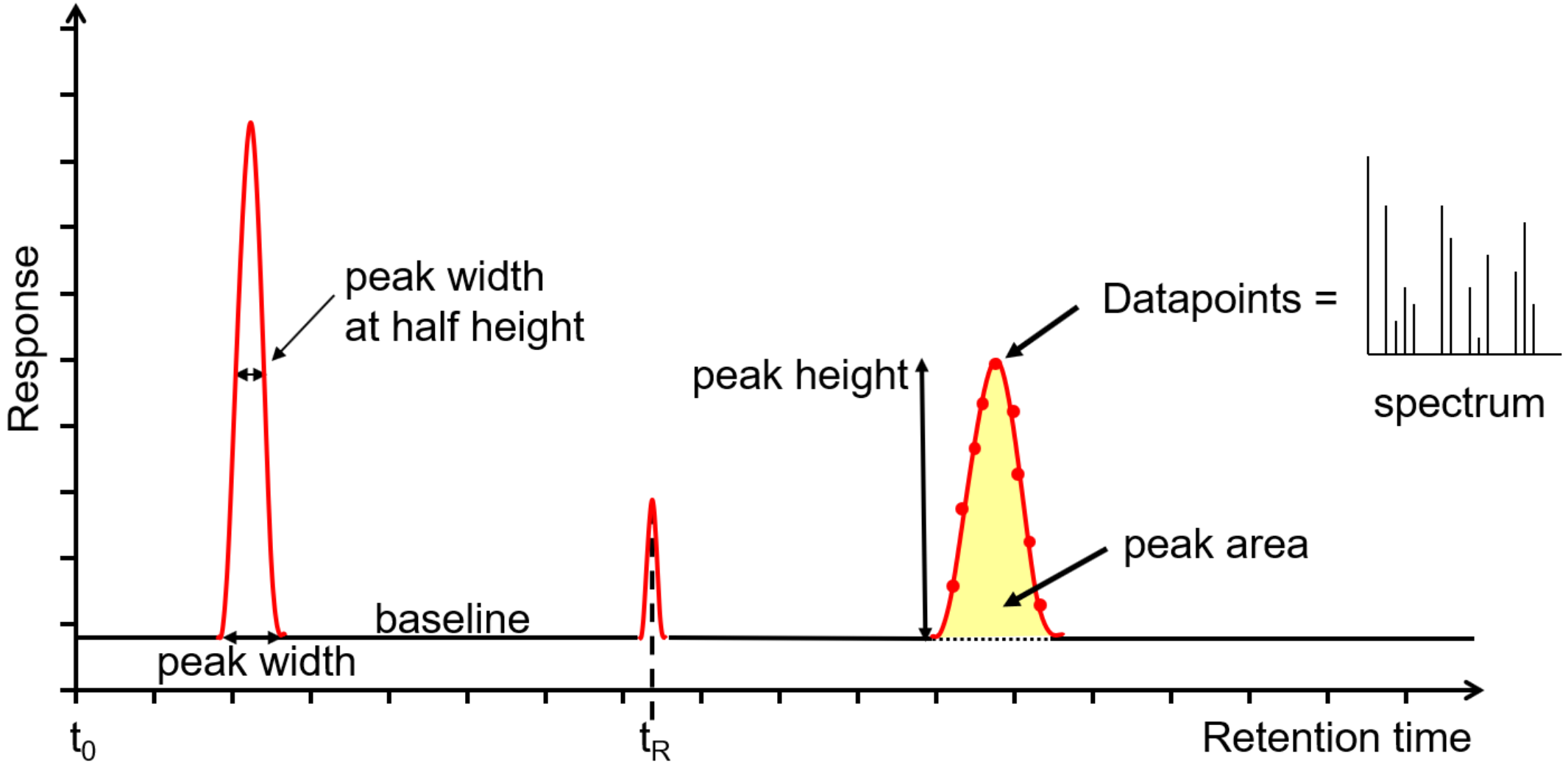
www.InstrumentationTools.com

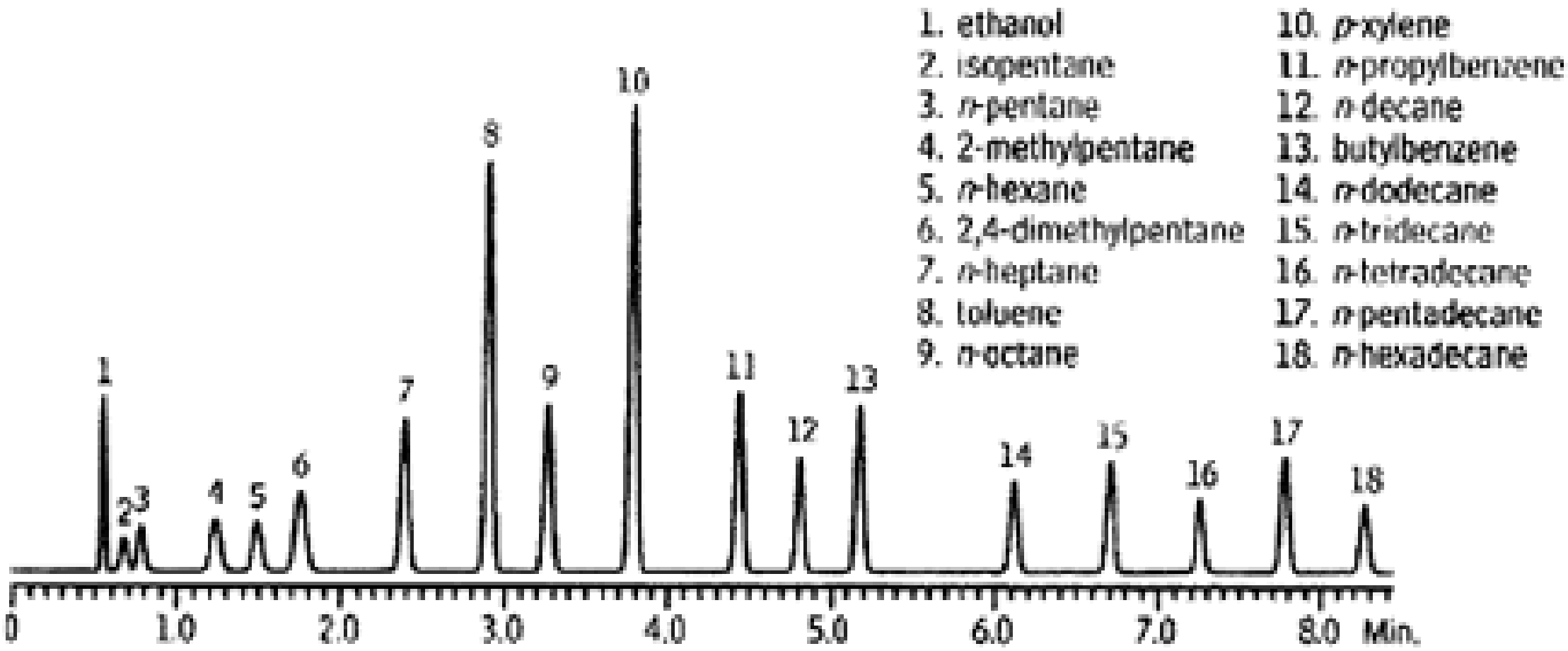
ส่วนประกอบของ GC

- **Carrier gases** หรือแก๊สพา มีหน้าที่นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยัง detector แก๊สที่ใช้งานกับเครื่อง GC เป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น He, H_2, N_2
- **Injector port** เป็นส่วนที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ (inlet) โดยทั่วไปมักจะมีตัวให้ความร้อนติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ
- **Column** เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง โดยทั่วไปมีอยู่ 2 ประเภท คือ packed และ capillary การเลือกใช้คอลัมน์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารผสม
- **Detector** หรือส่วนตรวจวัด เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผล
- **Data system** หรือระบบประมวลผล เป็นส่วนที่ประมวลผลและข้อมูลต่าง ๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งจะคำนวณและรายงานผลเป็นเวลาการหน่วง (Retention time) คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรม (chromatogram)


Column
Sample injection
Mobile phase
Stationary phase
Carrier gas
Transported while repeatedly being partitioned
Finally eluted from the column
Peak
Analysis results are obtained as a chromatogram

โครมาโทแกรม




1. ethanol
2. isopentane
3. n-pentane
4. 2-methylpentane
5. n-hexane
6. 2,4-dimethylpentane
7. n-heptane
8. toluene
9. n-octane
10. p-xylene
11. n-propylbenzene
12. n-decane
13. butylbenzene
14. n-dodecane
15. n-tridecane
16. n-tetradecane
17. n-pentadecane
18. n-hexadecane
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
Min.

Compounds Suitable for GC Analysis

Components that can be analyzed with GC have the following three main features.

- Compounds with a boiling point up to 400°C
- Compounds that are not decomposed at their vaporization temperature
- Compounds that decompose at their vaporization temperature, but always by the same amount. This is called pyrolysis GC.

Compounds unsuitable analyzed with GC

Cannot be analyzed

- Compounds that do not vaporize (inorganic metals, ions, and salts)
- Highly reactive compounds and chemically unstable compounds (hydrofluoric acid and other strong acids, ozone, NOx and other highly reactive compounds)

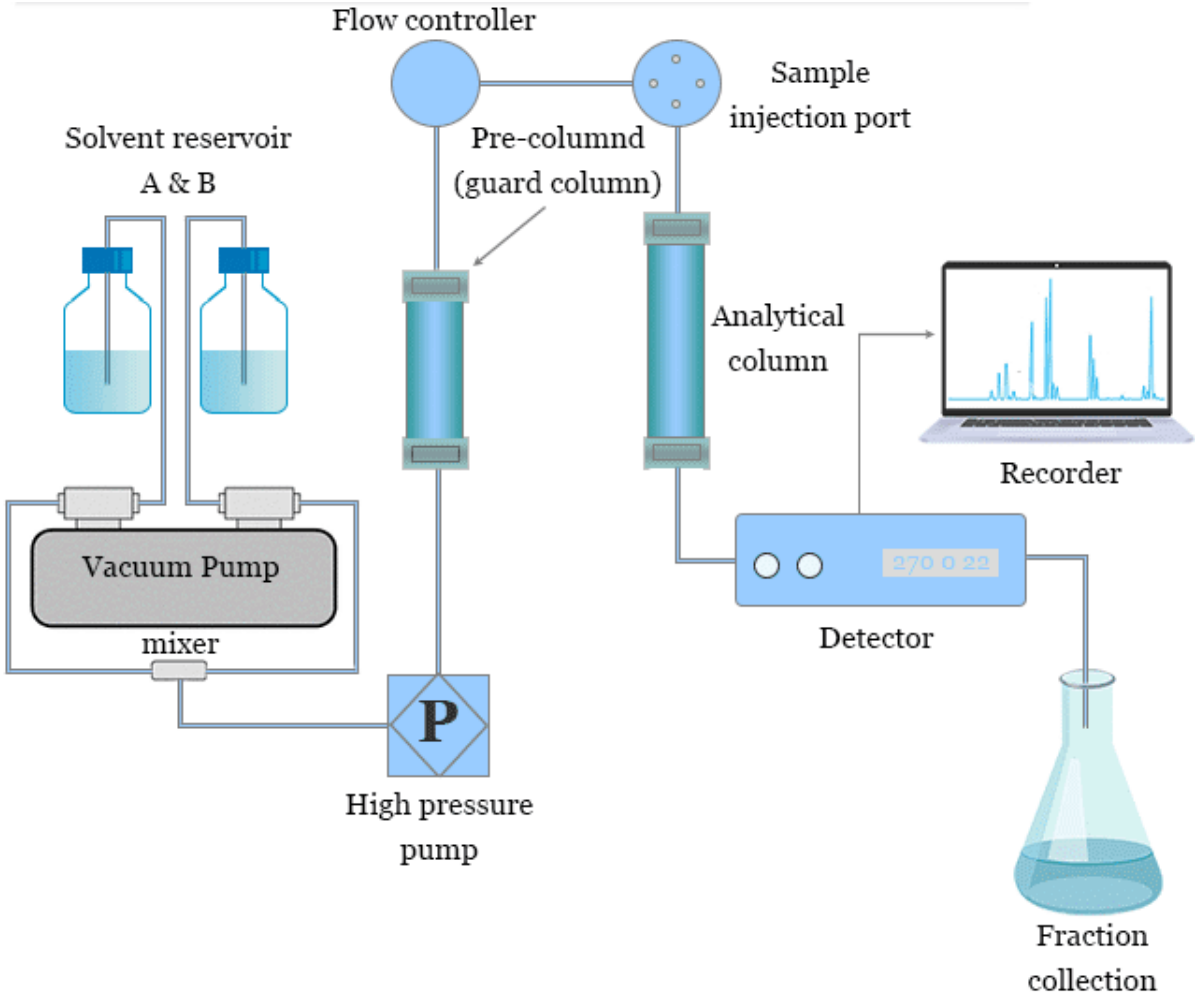
Difficult to analyze

- Highly adsorptive compounds (compounds containing a carboxyl group, hydroxyl group, amino group, or sulfur)
- Compounds for which standard samples are difficult to obtain (Qualitative and quantitative analyses are difficult)

โครมาโทรกราฟีแบบของเหลว : LC

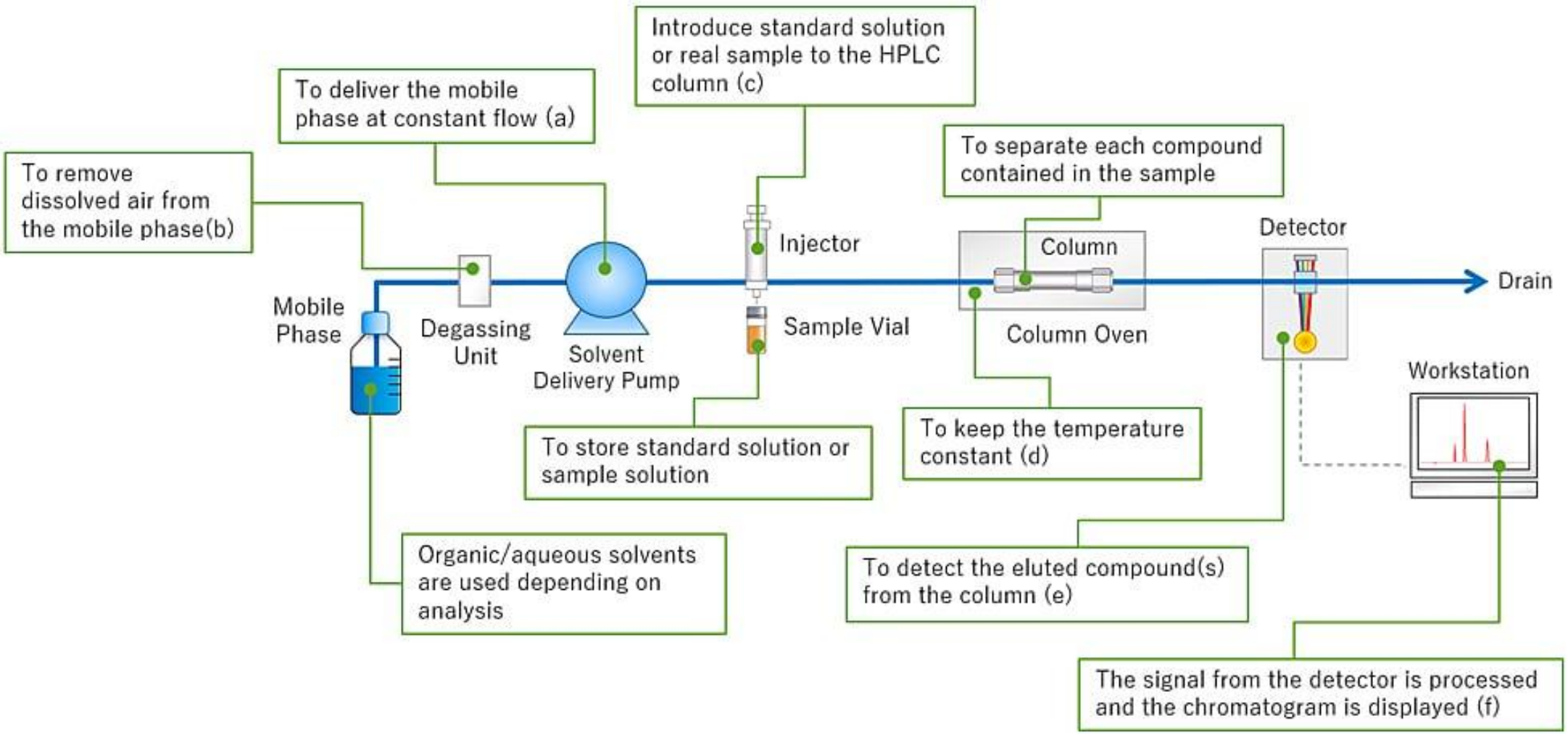
Mobile phase : Liquid (ของเหลว)

- คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว
- ขนาดอนุภาคของวัฏภาคอยู่กับที่มีขนาดเล็กมาก ๆ การไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จึงต้องใช้แรงดันสูงช่วยเพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารและตัวชะ และทำให้การแยกเกิดได้เร็วขึ้น จึงเรียกว่า **โครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (High pressure liquid chromatography; HPLC)**



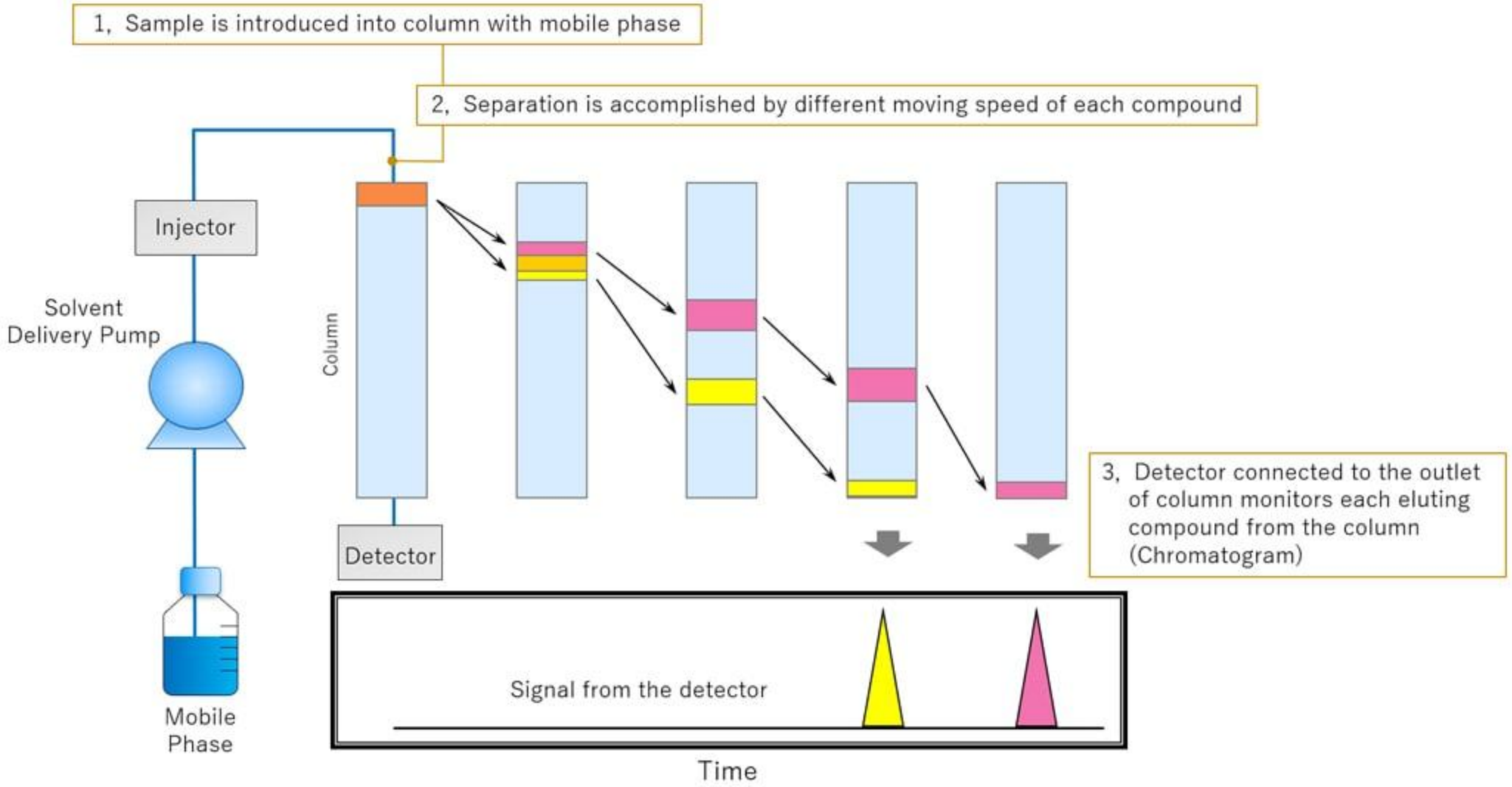
ส่วนประกอบของ HPLC

- **Mobile phase** ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ของเหลว) ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์ เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
- **Degasser** ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศในตัวทำละลาย ไม่ให้มีฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
- **Pump** ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายเข้าสู่ระบบ HPLC
- **Injector** ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC
- **Column** มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ
- **Detector** ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

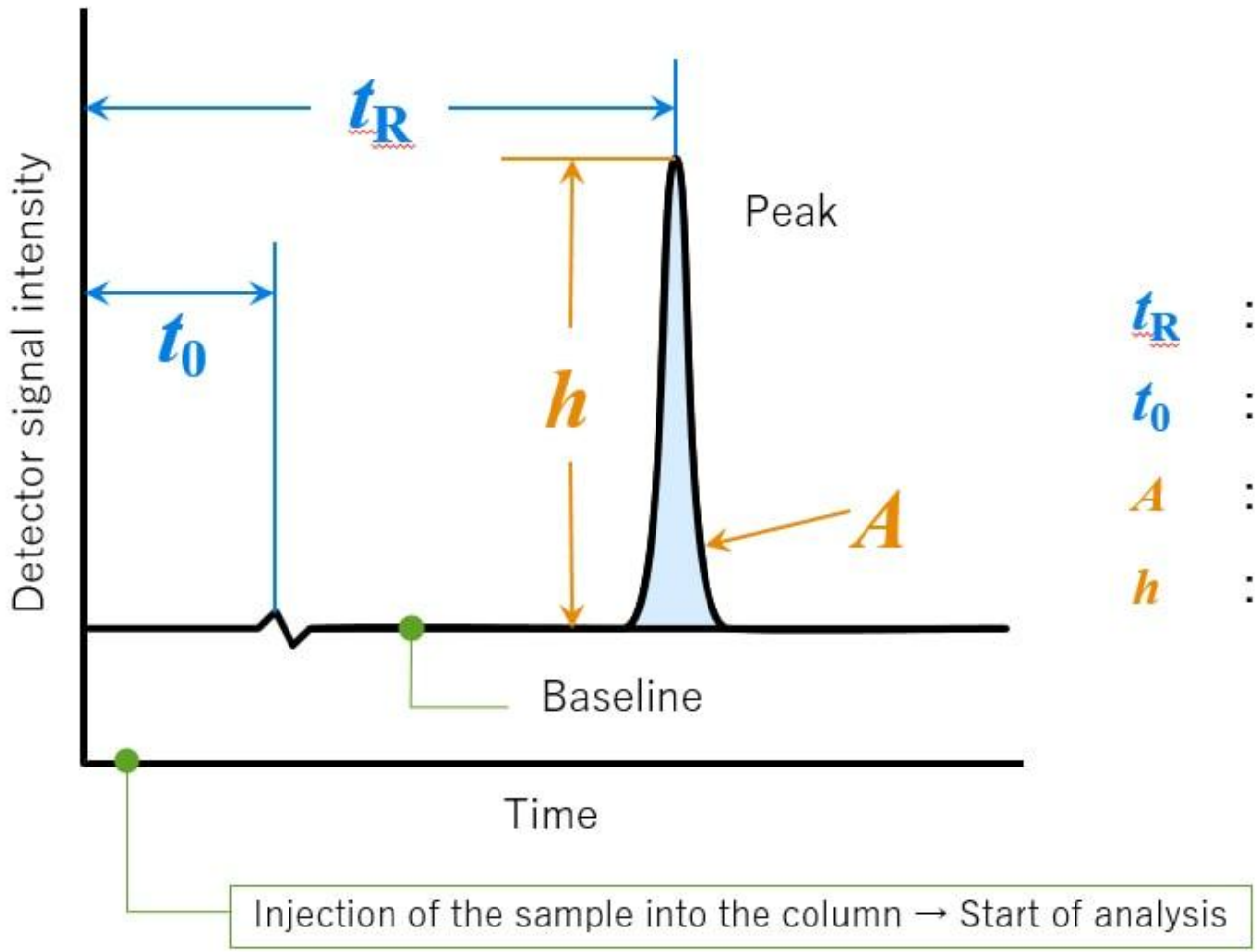


https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html

HPLC Principle



Signal response/Chromatogram

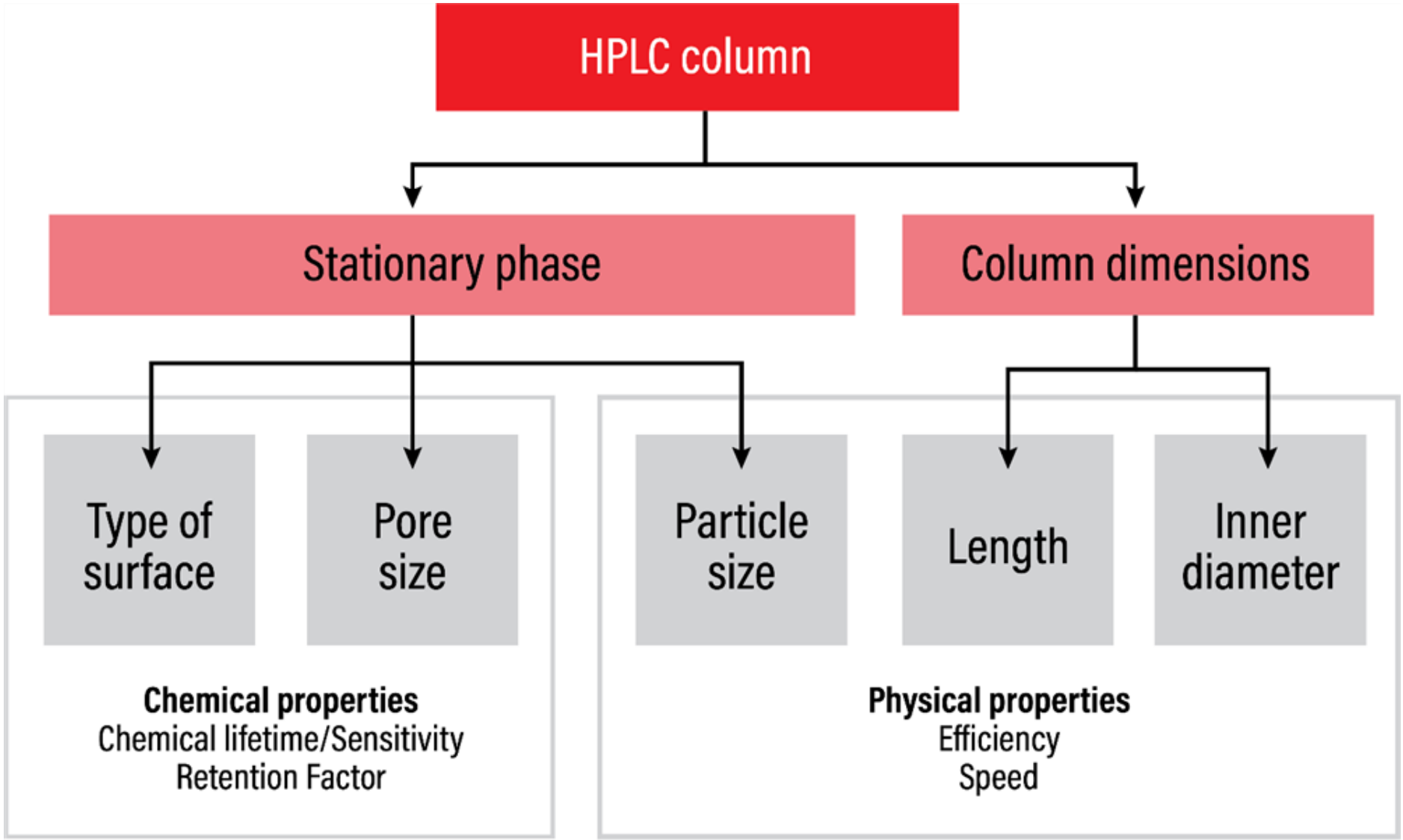


t_R : Retention Time

t_0 : Dead Time

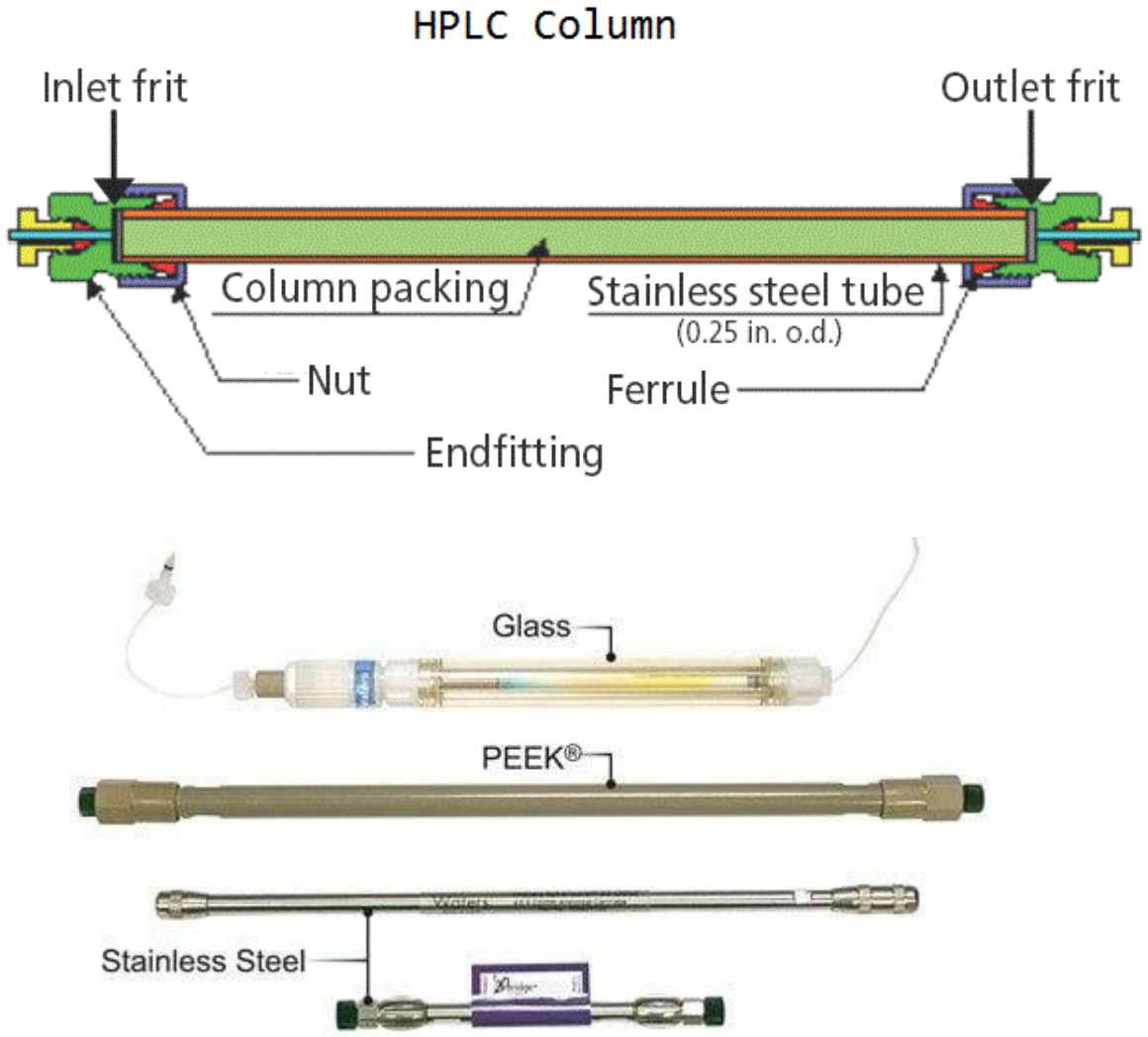
A : Peak Area

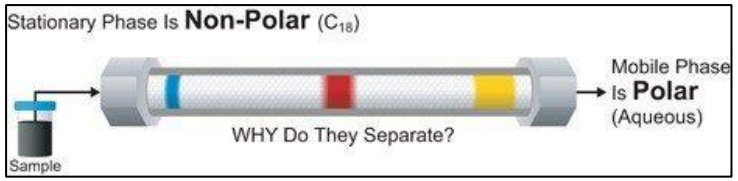
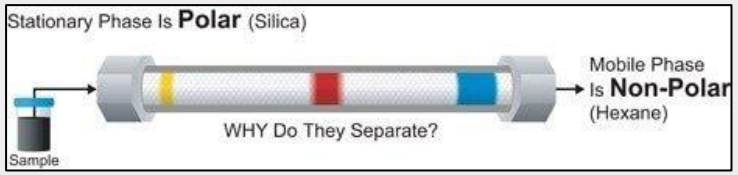
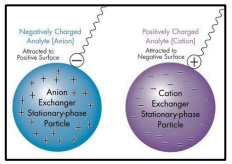
h : Peak Hight


HPLC column
Stationary phase
Column dimensions
Type of surface
Pore size
Particle size
Length
Inner diameter
Chemical properties
Chemical lifetime/Sensitivity
Retention Factor
Physical properties
Efficiency
Speed

HPLC Column Types

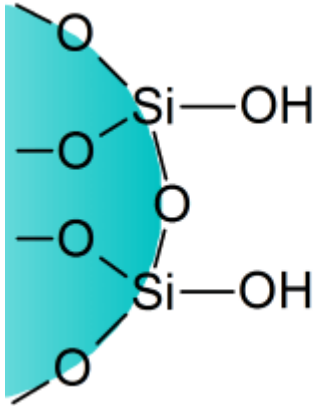
- Reverse-phase column (RPC)
- Normal-phase column (NPC)
- Ion-exchange column (IEC)
- Size-exclusion column (SEC)
- Affinity column (AC)

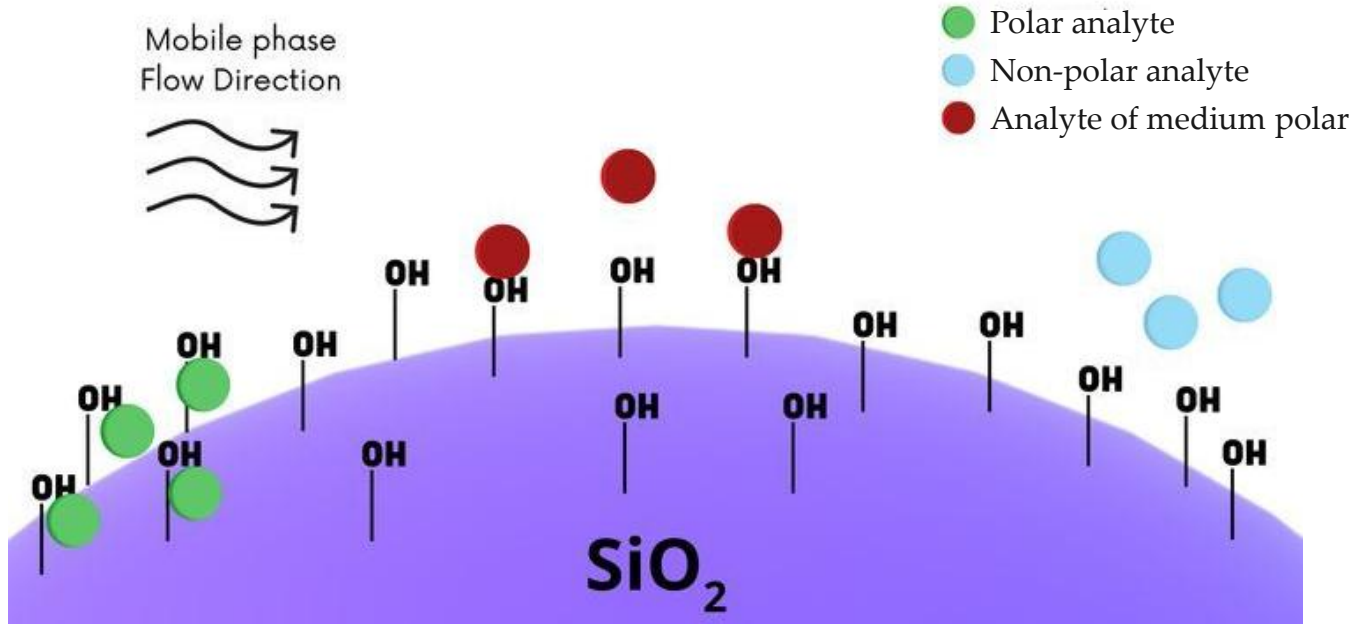


Column Types	Stationary Phase	Mobile Phase	Application
Reverse-Phase	Non-polar 	Polar	Versatile, applicable to a wide range of compounds
Normal-Phase	Polar 	Non-polar	Analysis of polar compounds, natural products
Ion-Exchange	Charged functional groups 	Ions	Analysis of charged biomolecules
Size-Exclusion	Porous	Any compatible solvent	Separation based on size or molecular weight
Affinity	Ligand-specific interaction	Any compatible solvent	Purification and analysis of biomolecules

Normal phase column

- NPC are more polar than the mobile phase, enhancing analyte retention with higher stationary phase polarity and lower mobile phase polarity.
- To separate compounds based on their polarity.
- Polar compounds interact more strongly with the stationary phase, while non-polar compounds interact more strongly with the mobile phase.
- The polar compounds to elute from the column more slowly than the non-polar compounds.

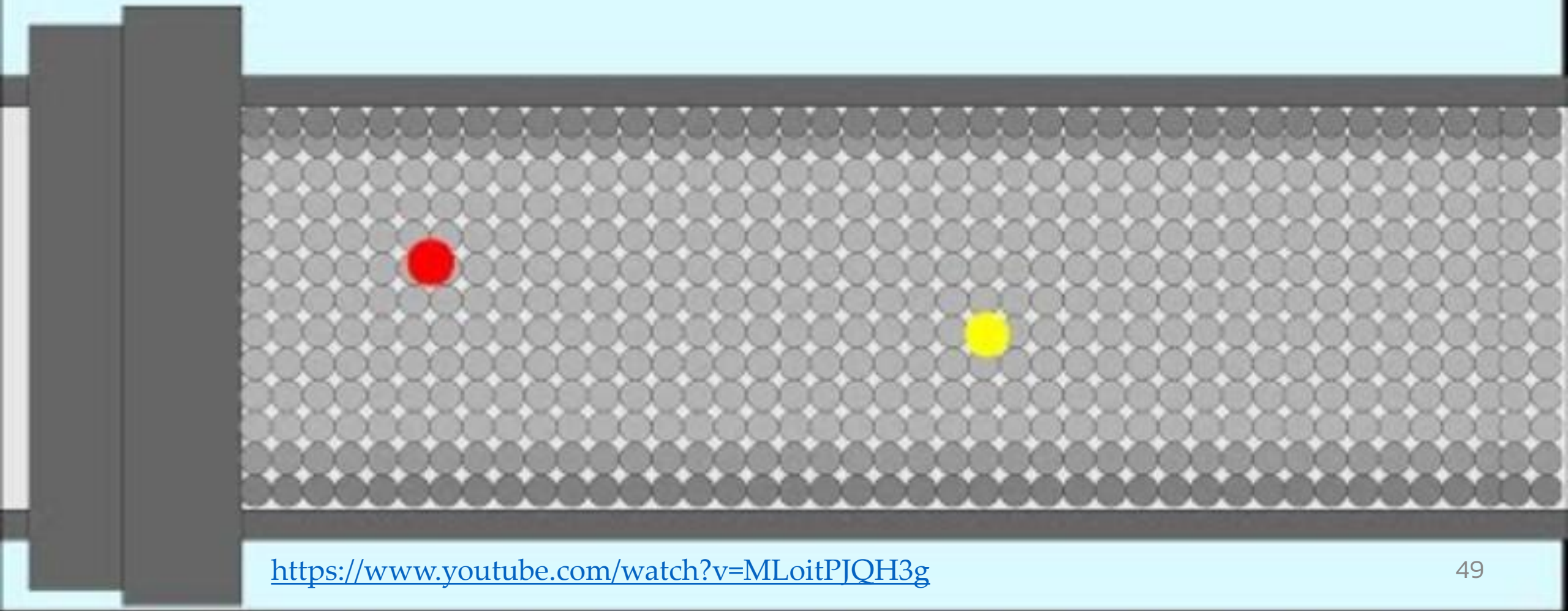




https://learnaboutpharma.com/hplc-columns-definition-principle-types-and-maintenance

- Stationary phases like inorganic adsorbents (silica, alumina) or moderately polar chemically bonded phases (e.g., aminopropyl, nitrophenyl, diol on silica gel).
- Retention increases with higher polarity and more adsorption sites on the column, favoring adsorbents with larger surface areas.
- NPC are used for small molecules, organic acids, drugs, and biomolecules like glycosylated proteins.
- NPC are ideal for compounds soluble in organic solvents and those with structural/stereo isomeric differences.

HPLC - Normal Phase vs Reverse Phase



https://www.youtube.com/watch?v=MLoitPJQH3g

Advantages & Disadvantages

Advantages:

- Very versatile; can be used to separate a wide range of compounds
- High resolution
- Good selectivity

Disadvantages:

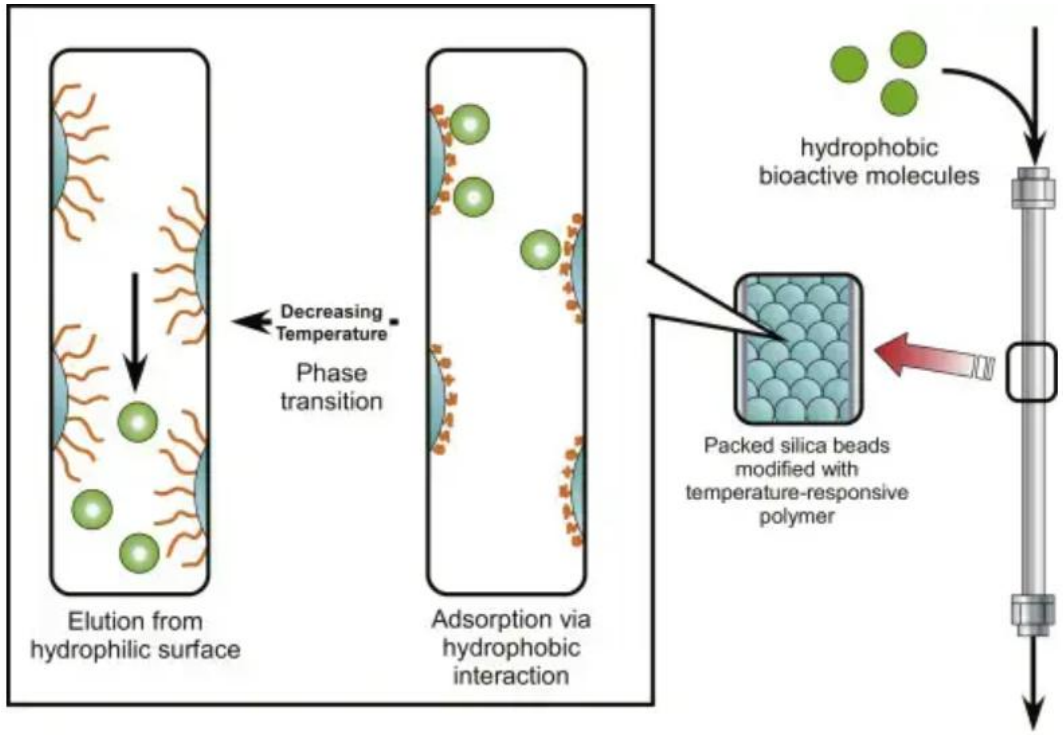
- Can be difficult to use; requires careful control of the MP composition and pH
- Susceptible to column fouling
- Not as compatible with aqueous MP as reverse phase columns

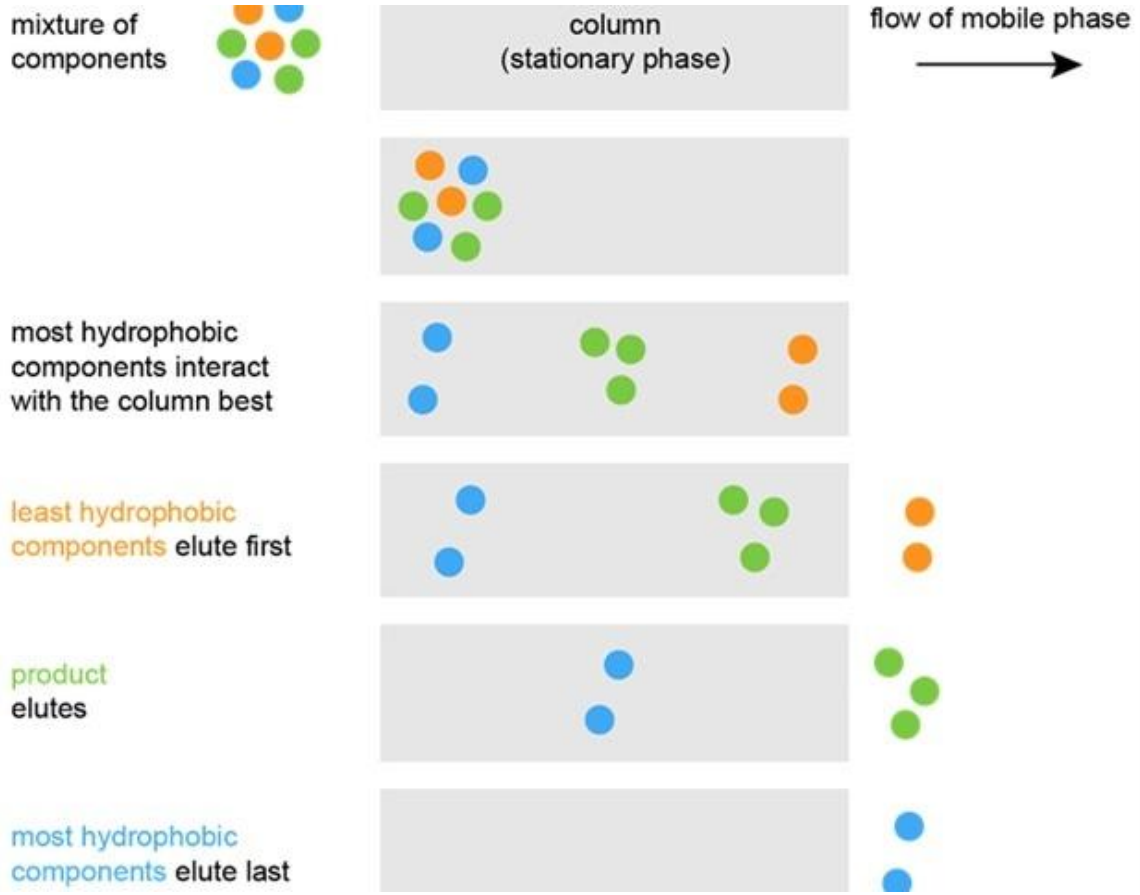
NPC picked-up

- The polarity of the compounds to be separated
- The desired resolution and selectivity
- The compatibility of the column with the mobile phase to be used
- The cost of the column

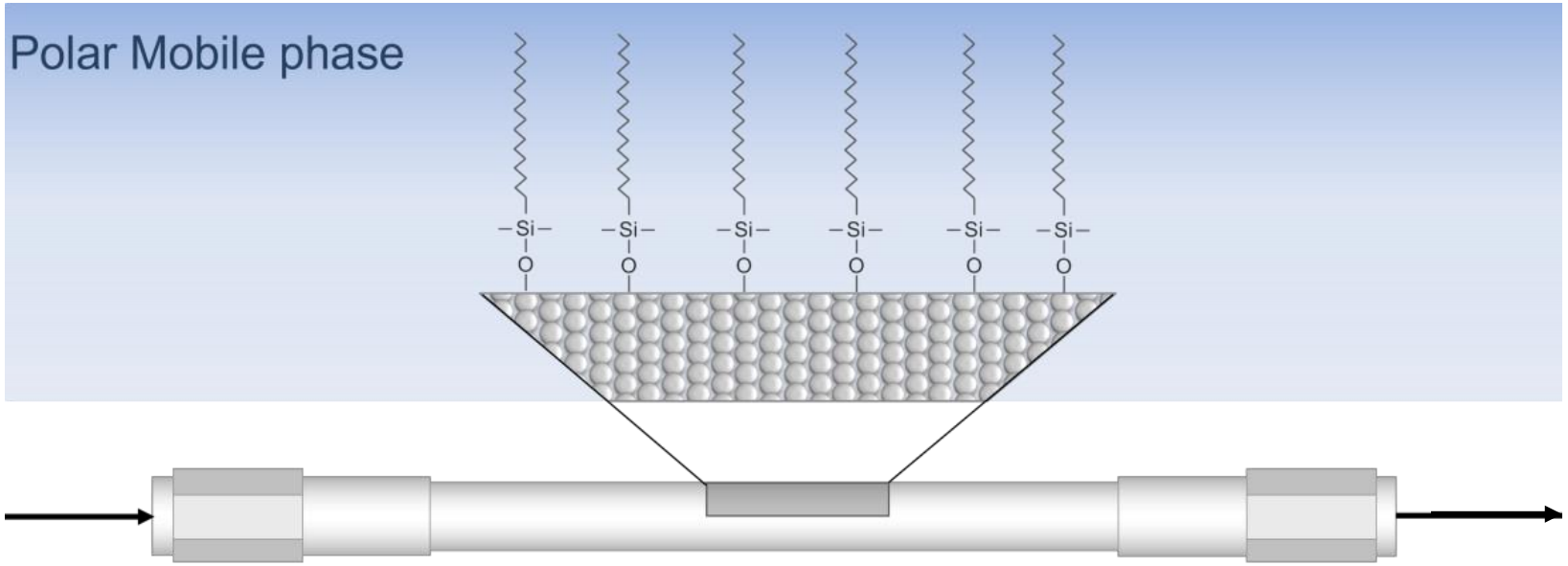
Reverse phase column

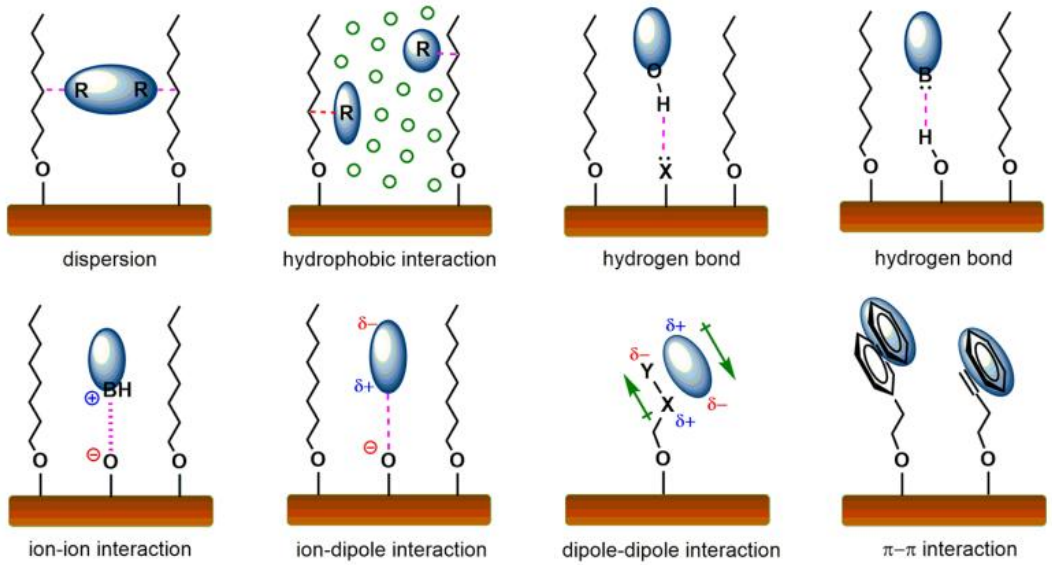
The stationary phase is usually an inert hydrocarbon that is interacting just with hydrophobic solute or molecule, in which selectivity is dominated by solvent effects.

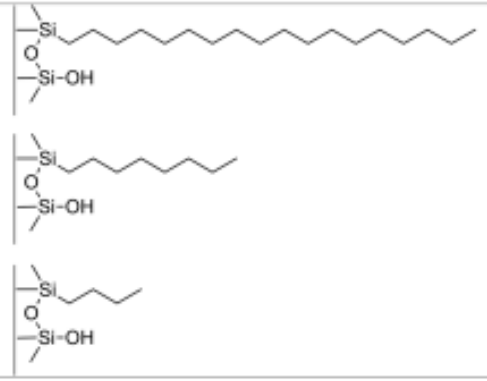
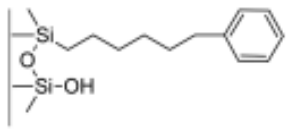
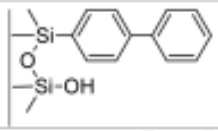
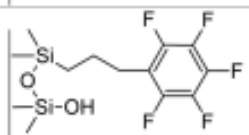
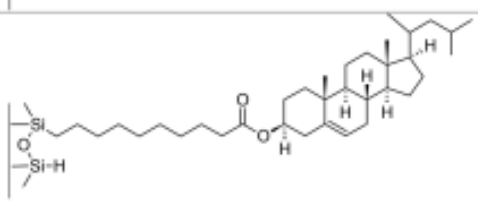
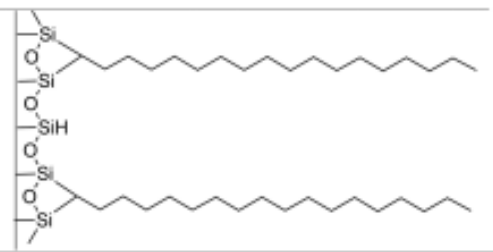


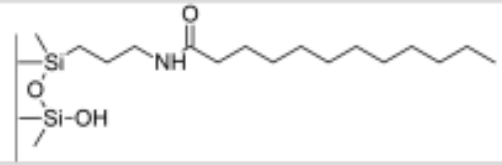
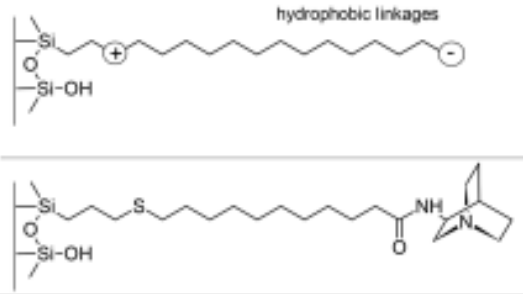
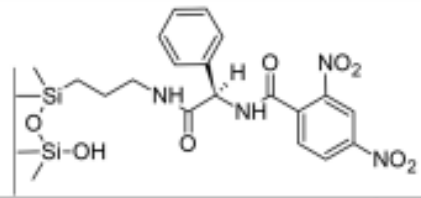
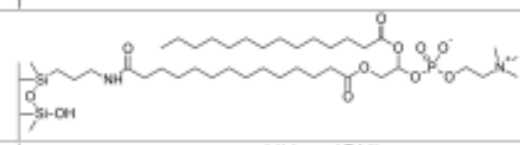
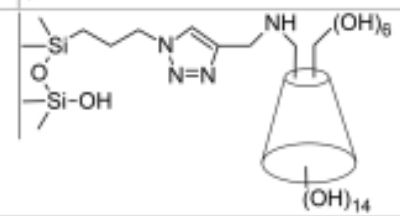
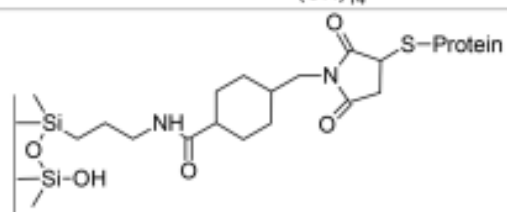


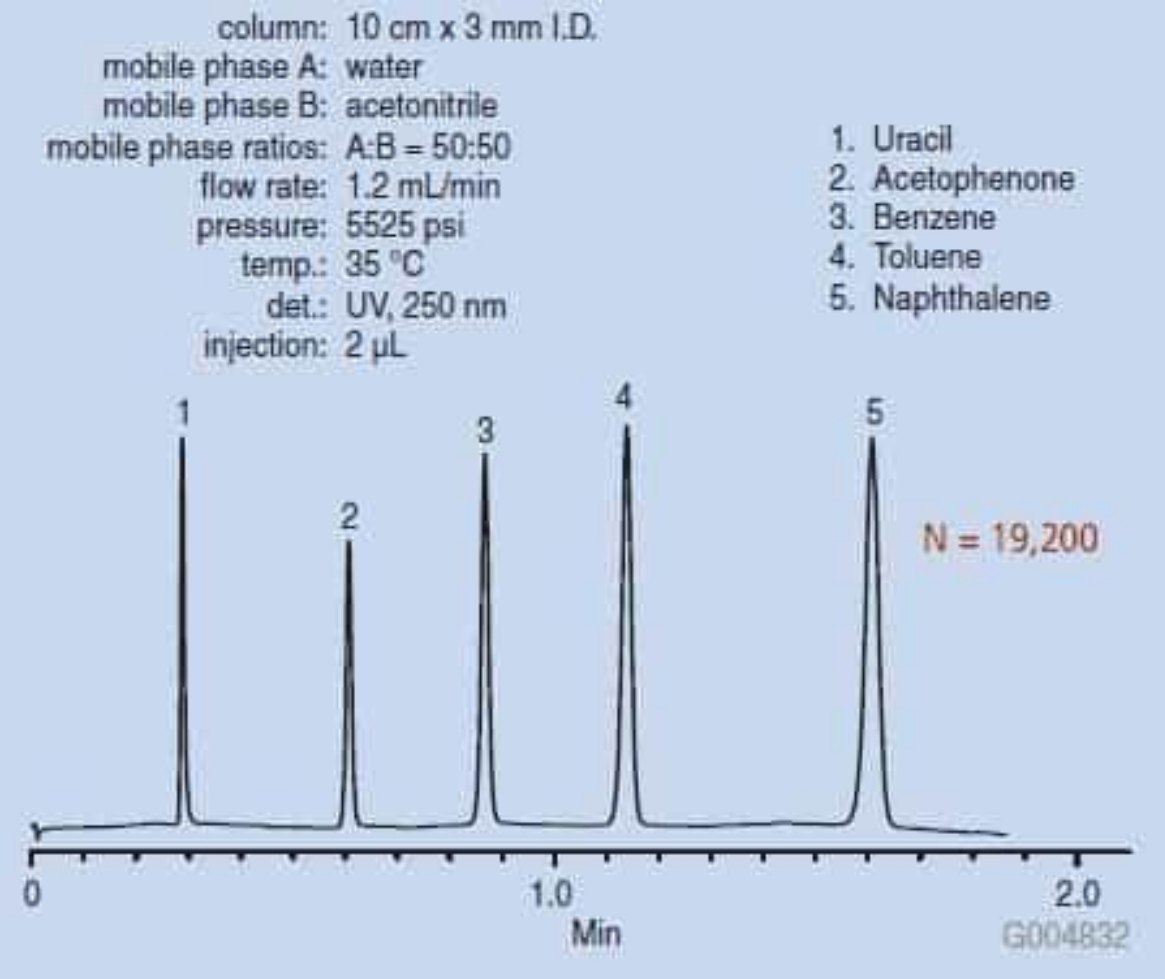
https://biologynotesonline.com/reversed-phase-chromatography

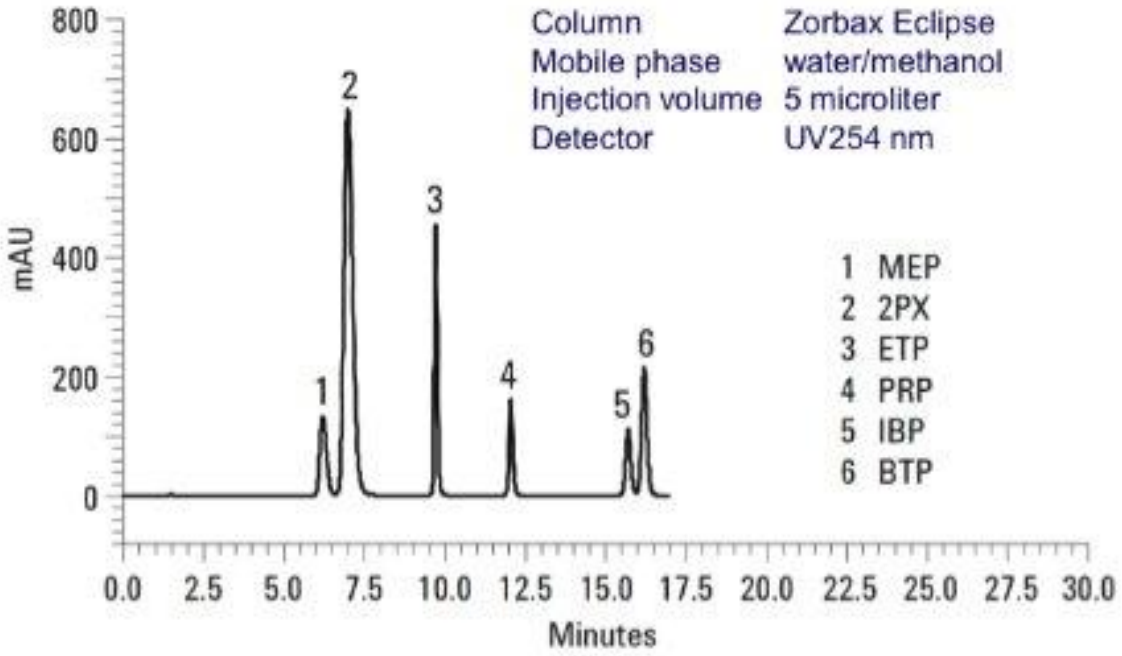

Polar Mobile phase
Si
O
Non-polar Stationary phase
e.g. C18 column


R
dispersion
hydrophobic interaction
H
X
hydrogen bond
hydrogen bond
BH
ion-ion interaction
δ+
δ−
ion-dipole interaction
Y
dipole-dipole interaction
π–π interaction

Stationary phase	Molecular structure[a]	Separation targets
Alkyl-bonded (C18, C8, C4)		Hydrophobic and moderately polar compounds, urinary steroids, polar and non-polar lipids, sulfonic acids
Phenyl-hexyl		Phenolic compounds, hydrocarbons, drug molecules
Biphenyl-silica		Aromatics, mycotoxins
FluoroSep-RP Phenyl		Halogenated aromatics, PAHs, vanillin analogues
Cholesterol hydride		Pharmaceutically related compounds, tetracyclines, steroids, catecholoamines
Bidentate C18 hydride		

Stationary phase	Molecular structure[a]	Separation targets
N-acylamide phase		Estradiol diastereoisomers
Mixed mode		Hydrophilic and hydrophobic analytes, peptides, chlorpyrifos metabolites, markers in urine samples, fungal metabolites
Pirkle-type chiral phase		Drugs, pesticides, alcohols, amino acids
Immobilized artificial membrane, IAM		β-adrenolytic drugs, drug-membrane interactions
Click β-cyclodextrin		Nucleosides, oligosaccharides
Maleimide-modified human serum albumin (HSA) phase		Chiral solutes such as D, L-tryptophan, *R/S*-warfarin, *R/S*-ibuprofen





HPLC chromatogram for analysis of parabens.

Advantages & Disadvantages

Advantages:

- Easy to use; do not require careful control of the mobile phase composition and pH
- Compatible with aqueous mobile phases
- Robust and durable

Disadvantages:

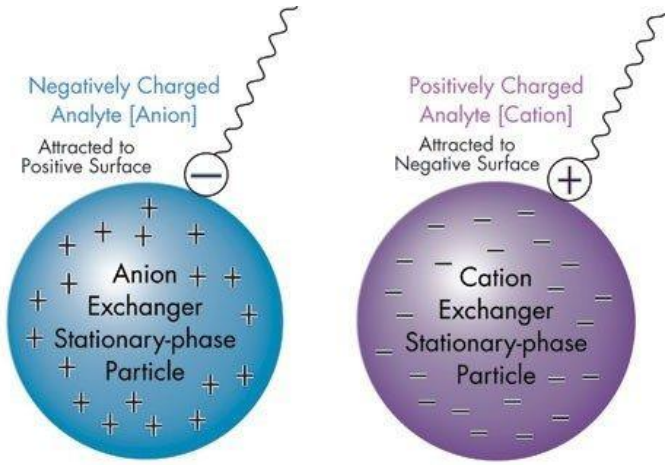
- Not as versatile as normal phase columns; cannot be used to separate all types of compounds
- Lower resolution and selectivity than normal phase columns

NPC&RPC comparison

Property	Normal Phase Columns	Reverse Phase Columns
Polarity of stationary phase	Polar	Non-polar
Polarity of mobile phase	Non-polar	Polar
Separation mechanism	Polarity	Non-polarity
Advantages	Versatile, high resolution, good selectivity	Easy to use, compatible with aqueous mobile phases, robust and durable
Disadvantages	Difficult to use, susceptible to column fouling, not as compatible with aqueous mobile phases	Not as versatile, lower resolution and selectivity
Common applications	Separation of non-polar compounds, enantiomers, preparative HPLC	Separation of polar compounds, proteins and peptides, analytical HPLC
Examples of columns	Silica gel, cyano, amino, diol	C18, C8, C4, phenyl

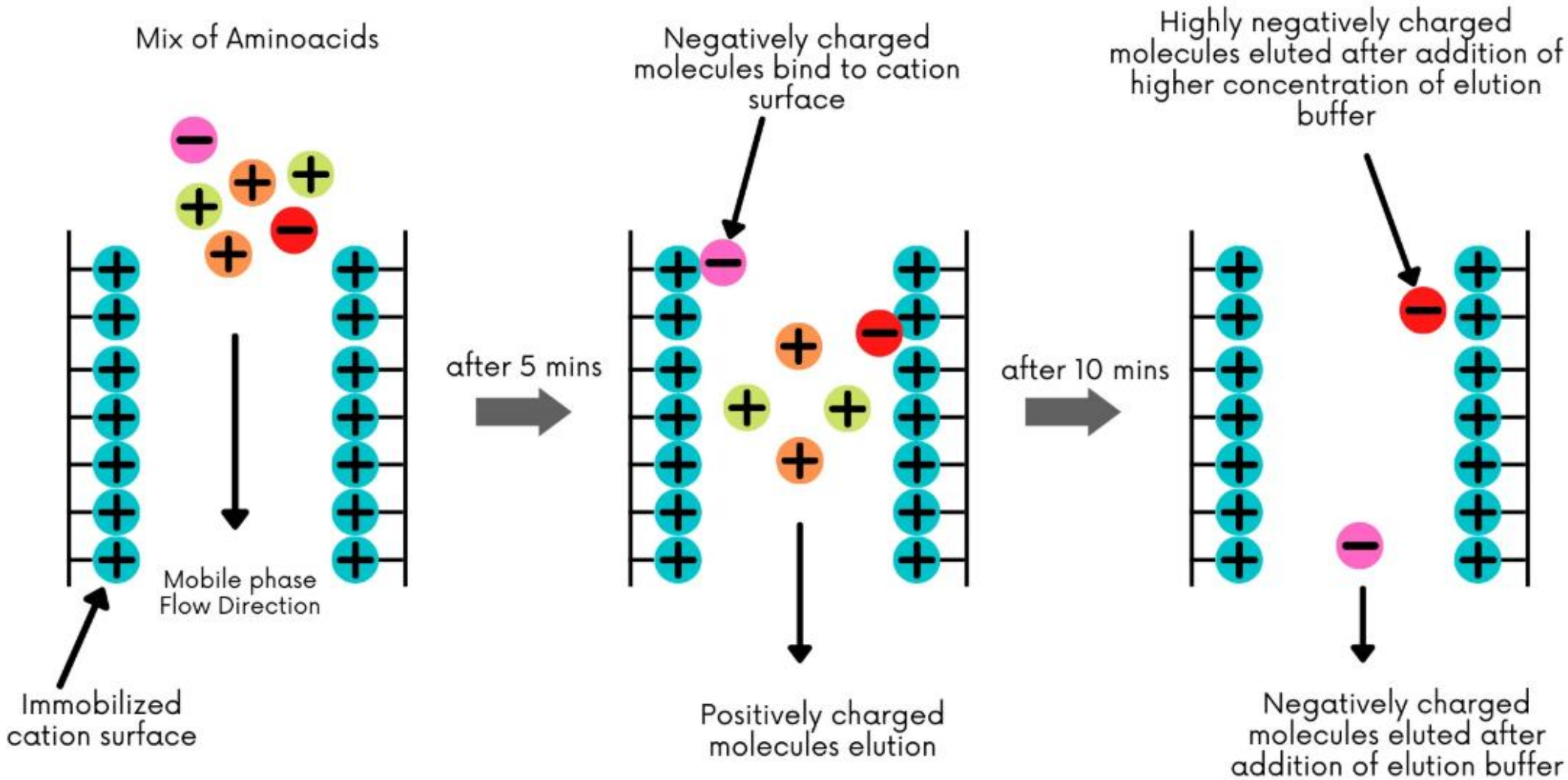
Ion-Exchange Columns

- To separation of molecules due to attractive ionic forces molecules in the analyte and the charged stationary phase.

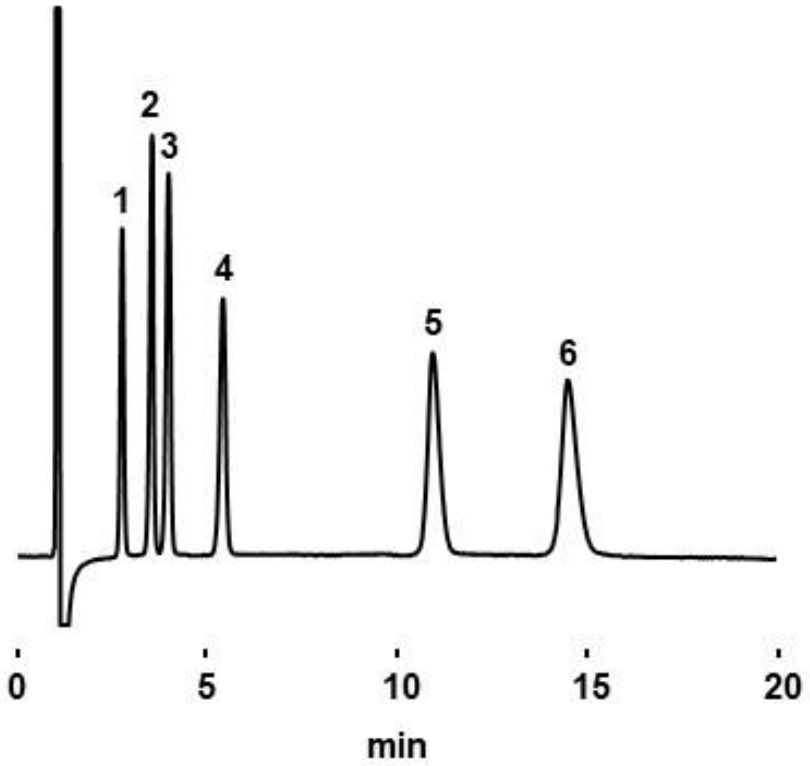


Analyte Type	Weak ACID e.g., pK_a ~ 5		Strong ACID	Weak BASE e.g., pK_a ~ 10		Strong BASE
Charge State vs. pH*	No charge at pH < 3	− [anion] at pH > 7	− [anion] Always Charged	+ [cation] at pH < 8	No Charge at pH > 12	+ [cation] Always Charged
Stationary Phase Particle	Strong Anion Exchanger		Weak Anion Exchanger e.g., pK_a ~ 10		Strong Cation Exchanger	Weak Cation Exchanger e.g., pK_a ~ 5
Charge State vs. pH*	+ Always Charged		+ at pH < 8	No Charge at pH > 12	− Always Charged	No Charge at pH < 3 / − at pH > 7
Mobile Phase pH Range						
to Retain analyte [capture]	pH > 7		pH < 8		pH < 8	pH > 7
to Release analyte [elute]	pH < 3		pH > 12		pH > 12	pH < 3

https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/hplc-separation-modes.html


Mix of Aminoacids
Mobile phase
Flow Direction
Immobilized
cation surface
after 5 mins
Negatively charged
molecules bind to cation
surface
Positively charged
molecules elution
after 10 mins
Highly negatively charged
molecules eluted after addition of
higher concentration of elution
buffer
Negatively charged
molecules eluted after
addition of elution buffer

Column	: Shodex IC SI-90 4E (4.0 mm I.D. x 250 mm)
Eluent	: 1.8 mM Na_2CO_3 + 1.7 mM $NaHCO_3$ aq.
Flow rate	: 1.5 mL/min
Detector	: Suppressed conductivity
Column tamp.	: 30 °C



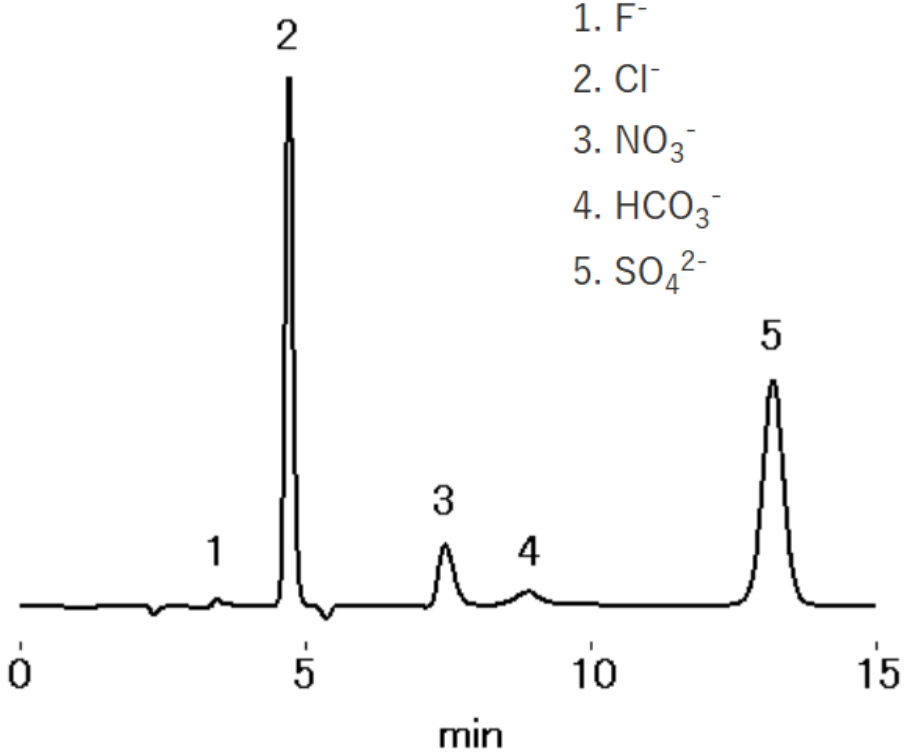
Sample: 10 µL

1. Li^+ (2 mg/L)
2. Na^+ (10 mg/L)
3. NH_4^+ (10 mg/L)
4. K^+ (20 mg/L)
5. Mg^{2+} (10 mg/L)
6. Ca^{2+} (20 mg/L)

Column	: Shodex IC SI-90 4E (4.0 mm I.D. x 250 mm)
Eluent	: 1.8 mM Na_2CO_3 + 1.7 mM $NaHCO_3$ aq.
Flow rate	: 1.0 mL/min
Detector	: Suppressed conductivity
Column temp.	: 25 °C

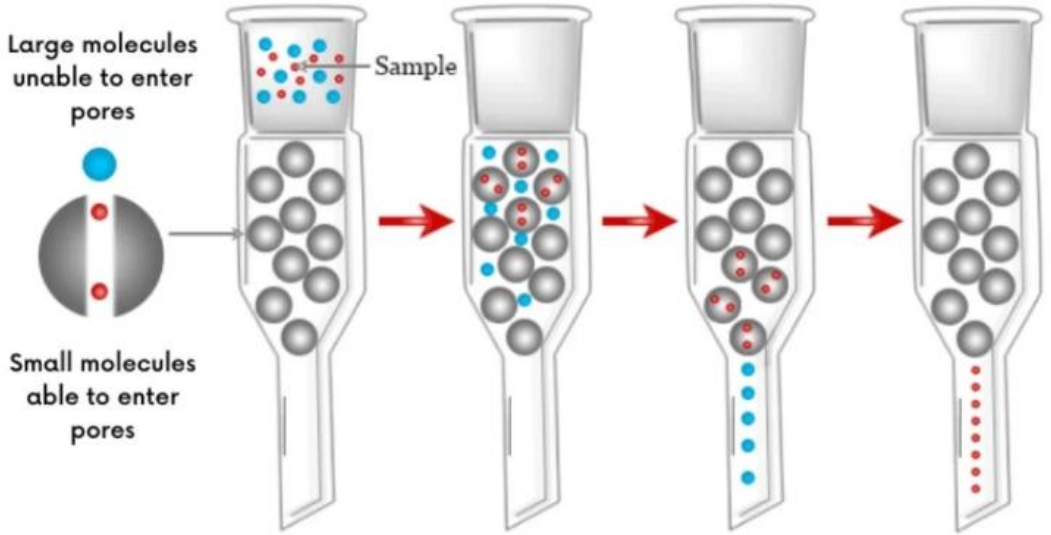
Sample : Mineral water, 20 µL

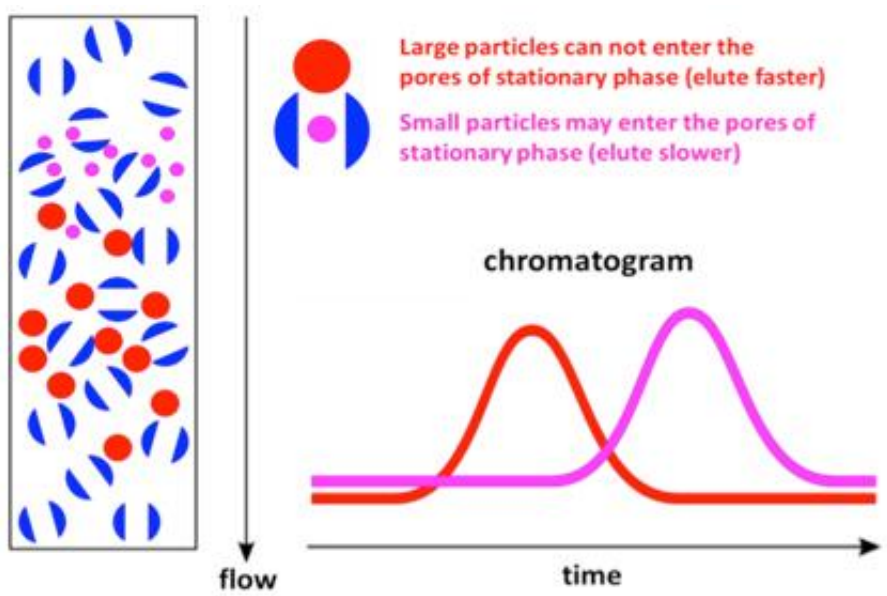
1. F^-
2. Cl^-
3. NO_3^-
4. HCO_3^-
5. SO_4^{2-}

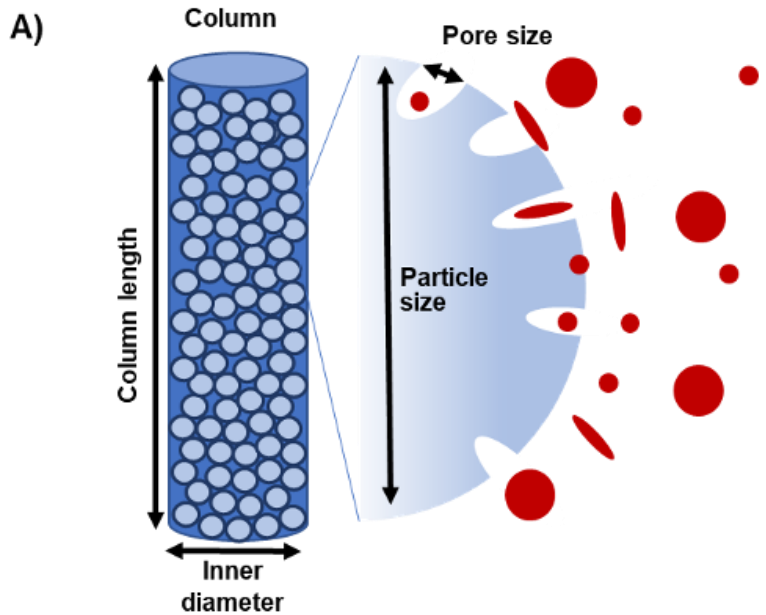


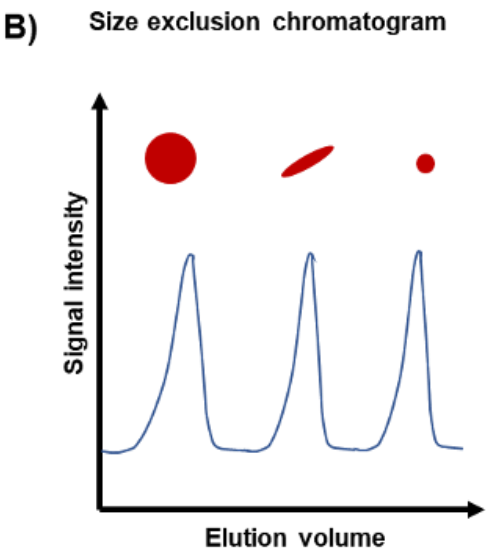
Size-Exclusion Columns

- The combination of polymers like polysaccharides and silica
- Do not reply on interaction with the analyte components but rather utilize sieving effect based on molecular weight of the analyte components.
- The molecules diffusing into the pores and retain.
- Too large molecules to enter the pores pass through the column rapidly, eluting as a single peak.




Large particles can not enter the pores of stationary phase (elute faster)
Small particles may enter the pores of stationary phase (elute slower)
chromatogram
flow
time


A)
Column
Pore size
Column length
Particle size
Inner diameter


B)
Size exclusion chromatogram
Signal intensity
Elution volume

#กิจกรรม work@class

แบ่งกลุ่มทำกิจกรรม 2.2

มอบหมายโจทย์ให้แต่ละกลุ่ม
ระดมสมองแก้ไขโดยวิธีการ
ร่วมแสดงความคิดเห็น

ให้แต่ละกลุ่มนำเสนอ วิธีการแก้ไขโจทย์ปัญหา
1) หลักการสำคัญหรือหลักพื้นฐานที่ถูกต้อง
2) วิธีการคำนวณค่าที่ถูกต้อง
3) วิธีอธิบายเชิงพฤติกรรม (วิธีปฏิบัติ) ที่ถูกต้อง
โดยให้กลุ่มอื่น ๆ รับฟัง และซักถามในข้อที่สงสัย