

C.2.2. KROMATOGRAFI KOLOM

Pengantar

- Kromatografi cair yang dilakukan di dalam kolom besar merupakan metode kromatografi terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar (lebih dari 1 gram) Kadang metode ini disebut : **Kromatografi Cair Preparatif .**
(KCP=PLC)
- Pada kromatografi kolom campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam atau bahkan tabung plastik.

- Pelarut (fase gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan gaya berat atau didorong dengan tekanan
- Pita senyawa linarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda , memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari alas kolom.
- Metode ini merupakan contoh *Kromatografi elusi* karena linarut dielusi dari kolom.

- **Ada empat perubahan utama yang dilakukan pada cara kolom klasik :**
 - 1. Dipakai penjerap yang lebih halus dengan kisaran ukuran mesh lebih sempit → kesetimbangan lebih baik di dalam sistem.**
 - 2. Sistem tekanan biasanya pompa mekanis, dipakai untuk mendorong pelarut melalui penjerap yang halus.**
 - 3. Detektor telah dikembangkan sehingga diperoleh analisis senyawa yang berkesinambungan ketika senyawa itu keluar dari kolom. Data analisis ini dapat dipakai untuk membagi-bagi fraksi ketika keluar, dan jika diperlakukan dengan tepat, dapat memberikan data kuantitatif mengenai banyaknya senyawa yang ada.**
 - 4. Penjerap baru dan cara pengemasan kolom baru dikembangkan sehingga memungkinkan derajat daya pisah yang tinggi tercapai.**

Teknik Kromatografi Kolom

1. Pemilihan sistem
2. Pegemasan kolom
3. Pemasukan cuplikan
4. Pengelusian
5. Pengumpulan fraksi eluat yang keluar dari kolom

1. Pemilihan sistem

Dapat dilakukan tiga cara

a. Menggunakan data KLT

misalnya : campuran di KLT dengan silika gel → didapat pemisahan.

Untuk kromatografi kolom kalau di transfer dari KLT.

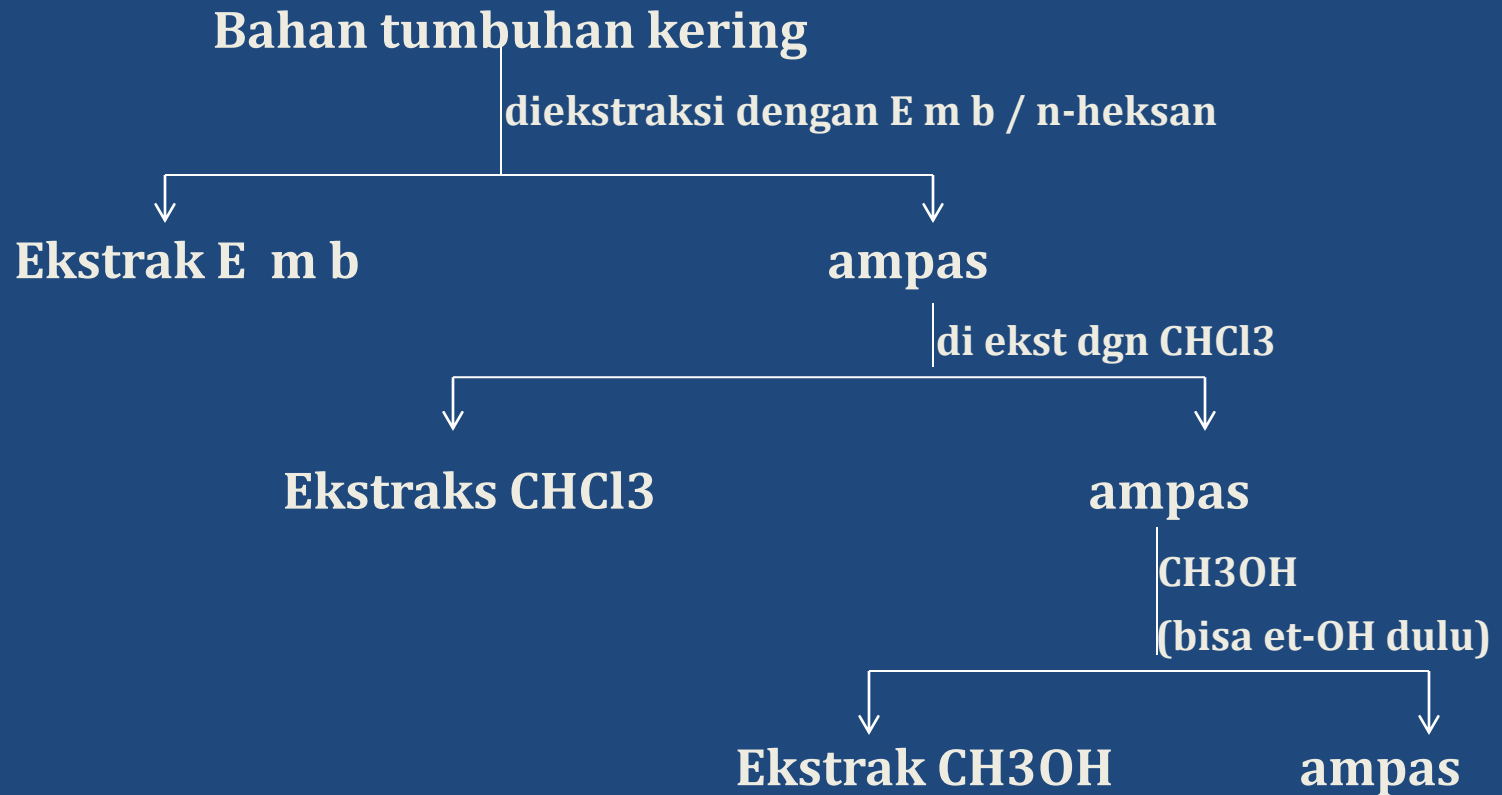
- Senyawa yang akan diambil (bercak besar) , R_f harus $< 0,30$
- adsorben harus mengambil jenis dan pabrik sama (masing - masing pabrik mempunyai spesifikasi sendiri), ukuran $>$ besar dari KLT , kalau terlalu halus ada kemungkinan tidak menetes / lama(kecuali untuk kromatografi cair vakum atau tekan).

b. Dengan data pustaka

Untuk isolasi suatu yang sudah ada di pustaka, cari di pustaka, gunakan cara yang digunakan disana → dapat di modifikasi dengan teori yang sudah di dapat misalnya dengan mengubah kepolaran pengelusi.

c. Untuk campuran dalam bahan alam yang tidak dikenal sama sekali diadakan prekromatografi

1) Pembuatan ekstrak, misal ekstrak si secara sinambung menggunakan berbagai pelarut berturut-turut dari non polar ke polar. Contoh ;



Semua yang di dapat di KLT, untuk memilih sistem eluen untuk kromatografi kolom.

2. Pengemasan kolom

- Kolom : umumnya dari gelas
- Ukuran : umumnya 10 – 100 x Ø kolom

Perbandingan diameter dan panjang kolom tergantung dari sukar atau mudahnya pemisahan suatu campuran.

- Kuantitas adsorben : untuk preparatif secara kasar perbandingan solute : adsorben = 1 : 20 sampai 1 : 50
untuk pemisahan kompleks atau memperoleh komponen murni, solute ; adsorben = 1 : 200 sampai 1 : 2000
- Pemasukan adsorben :
 - a. secara kering : kolom diberi kapas / glass wool, adsorben masukkan pelan-pelan dengan corong sambil di ketok-ketok supaya rata.

b. Secara basah : menggunakan lumpuran adsorben dengan pelarut yang akan digunakan sebagai eluen pertama (keran dibuka, pelarut bisa digunakan lagi untuk membuat lumpuran, selalu harus ada cairan di atas adsorben)

3. Pemasukan cuplikan

- Dalam keadaan biasa , linarut dlarutkan dalam sedikit pelarut (larutan 5% atau lebih), ditambahkan ke bagian atas kolom dan ditambahkan ke bagian atas penjerap. Ditambahkan lagi pelarut, dan kromatogram di kembangkan.**

- **Dalam kondisi ideal** , linarut mudah larut dalam pelarut yang akan dipakai pada kromatografi dan pelarut ini dapat dipakai untuk memasukkan linarut.
- Jika tidak mudah larut dalam pelarut pengelusi , linarut dapat dilarutkan di dalam pelarut yang kurang polar. Pelarut yang lebih polar tidak boleh dipakai karena dapat mengubah kromatografi pada kolom dengan cara yang tidak kita ketahui.
- Jika linarut tidak begitu larut di dalam pelarut pengelusi atau pelarut yang kurang polar, seperti yang sering dijumpai pada campuran yang rumit. Linarut dicampur dengan sedikit penjerap yang kemudian di letakkan pada bagian atas kolom.

4. Pengelusian

- Untuk kolom gaya tarik bumi yang memakai penjerap berukuran 60 -230 mesh (63 - 250 μ m), umumnya laju aliran sekitar 10 – 20 ml/cm³ penampang kolom/jam.
- Untuk partikel yang lebih kecil dari 200 mesh diperlukan semacam pemompaan atau sistem tekanan . Kemudian laju dapat ditingkatkan sampai 2 ml atau lebih per menit, atau sampai batas sistem tekanan.
- Pelarut pengembang harus sedapat mungkin kering dan murni
- Pengelusian dilakukan secara :
 - isokratik,
 - landaian bertahap
 - landaian.

5. Pengumpulan fraksi eluat

Pengumpulan fraksi eluat secara manual atau dengan alat pengumpul fraksi otomatis, yang dapat diatur berdasarkan volume atau waktu.

Kecepatan aliran diatur , jangan terlalu cepat karena pemisahan kurang baik , kalau terlalu lambat → menyebabkan perubahan pada struktur senyawa.

Aplikasi kromatografi kolom adsorpsi :

- Kromatografi kolom terbuka : kolom biasa
- Kromatografi kolom khusus
- Kromatografi kolom kering
- Kromatografi Cair vakum
- Kromatografi cair tekan :
 - tekanan rendah
 - tekanan medium
 - tekanan tinggi

Kromatografi kolom terbuka :

- Pengerjaan sederhana
- Kekurangan :
 - pemisahan lambat
 - adsorpsi solut tidak bolak-balik (tidak dapat digunakan lagi)
 - tidak dapat digunakan partikel sangat kecil (resolusi tinggi- kalau partikel kecil)

Kromatografi kolom kering

- Pengemasan kering
- Cuplikan dimasukkan sebagai :
 - larutan pekat
 - dikeringkan dengan adsorben dengan sedikit penjerap (kalau masih ada pelarut → masukkan eksikator)

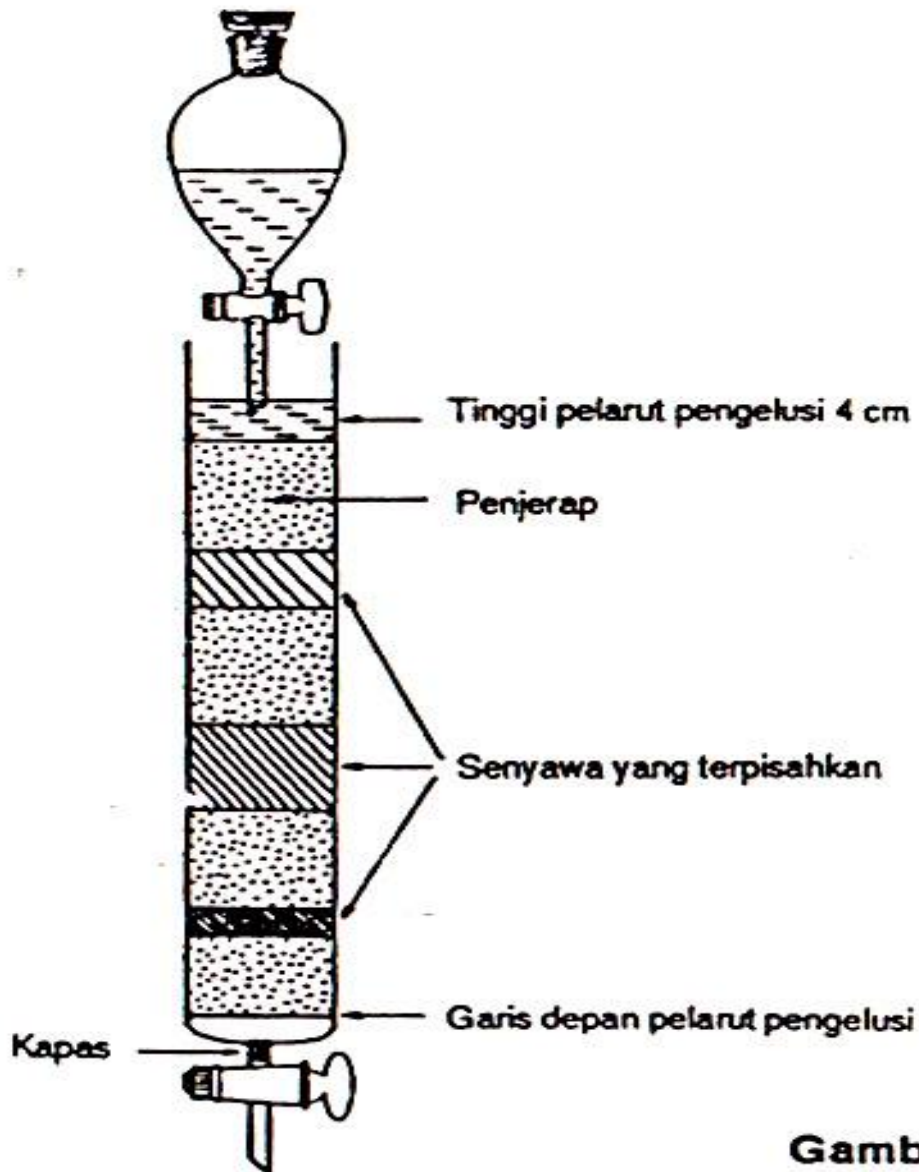
- Pelarut / pengelusi dibiarkan bergerak melalui kolom ke bawah karena gaya kapiler sampai garis depan pengelusi hampir mencapai bagian atas kolom (cairan tidak keluar)

Untuk pemisahan → Isi kolom didorong keluar :

- Untuk zat-zat berwarna : mudah dipotong
- Untuk zat tidak berwarna dapat dideteksi dengan sinar UV : mudah dipotong.
- Untuk zat-zat yang tidak berfluoresensi dan tidak berwarna gunakan
- Selotape yang agak lebar, selotape ditekan-tekan pada silika kemudian ditempelkan pada kaca → semprot dengan reagen , bercak digunakan sebagai pola untuk memotong Si.
- Pita-pita dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian diperiksa dengan KLT.
- Jika memakai kolom aluminium, pemisahan dapat diekstrapolasi dari pelat KLT dengan memakai penjerap yang sama dalam kolom.

- Pada KLT perbandingan adsorben cuplikan 1 : 500 pada kolom 1: 300 samapi 1:100, adsorben di deaktivasi dulu secara tepat.
- Untuk silika gel diberi penambahan air $14 \pm 15\%$
 - Dapat juga digunakan kolom nylon mudah dipotong → hanya
 - Untuk zat berwarna dan dapat dideteksi dengan sinar UV.

Telah dikembangkan juga kromatografi kolom vakum yaitu : Kombinasi cara kromatografi kolom kering dan kromatografi Cair vakum, metode ini pada umumnya digunakan untuk Fraksinasi pendahuluan, misalnya untuk pemisahan ekstrak tumbuhan aktif biologis → potong-potong, lalu tentukan aktivitas biologis nya.



Gambar 4.1 Susunan percobaan kromatografi kolom kering (Dicetak ulang dengan izin dari Loev dan Snader 1965)