
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

Second Semester Examination
Academic Session 2008/2009

April/May 2009

KAT 244 – Separation Methods
[Kaedah Pemisahan]

Duration : 3 hours

[Masa : 3 jam]

Please check that this examination paper consists of **TEN** printed pages before you begin the examination.

Instructions:-

Answer any **FIVE** (5) questions.

Answer to each question on a new page.

You may answer either in Bahasa Malaysia or in English.

If a candidate answers more than five questions, only the answers to the first five questions in the answer sheet will be graded.

1. (a) Compare the principles of the following gas chromatography detectors:

- (i) Thermal conductivity.
- (ii) Flame ionization.
- (iii) Electron capture.

Also compare the above detectors with respect to sensitivity and types of compounds that can be detected.

(12 marks)

(b) How does temperature programming improve separation in gas chromatography?

(4 marks)

(c) In capillary electrophoresis, CE, the typical net mobility, μ_{net} , for a 10 min migration time for a 50 cm capillary column operated at 30,000 V, is about $2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$. Calculate the number of plates for a small ion, Li^+ (diffusion coefficient, $D = 1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) and for a 100,000 MW protein with $D = 3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

(4 marks)

2. The following data are for a liquid chromatographic column:

Length of packing	24.7 cm
Flow rate	0.313 mL/min
Mobile phase volume, V_m	1.37 mL
Stationary phase volume, V_s	0.164 mL

A chromatogram of a mixture of species A, B, C, and D provided the following data:

	Retention Time, min	Bandwidth of Peak (w_b), min
Nonretained	3.1	-
A	5.4	0.41
B	13.3	1.07
C	14.1	1.16
D	21.6	1.72

- (a) Calculate;
- the number of plates, N , from each peak.
 - the mean and the standard deviation for N .
 - the plate height for the column.
- (6 marks)
- (b) From the data above, calculate for species B and C;
- the resolution.
 - the separation factor.
 - the length of the column necessary to separate the two species with a resolution of 1.5.
 - the time required to separate the two species on the column in part (b(iii)).
- (14 marks)

3. (a) Briefly discuss the detection of spots in thin layer chromatography (TLC).

(10 marks)

- (b) Peak areas and relative detector responses are to be used to determine the concentration of the five species in a sample. The area-normalization method is to be used in the calculation. The relative areas for the five gas chromatographic peaks are given below. Also shown are the detector response correction factors. Calculate the percentage of each component in the mixture.

Compound	Relative Peak Area	Detector Response Factor
A	32.5	0.70
B	20.7	0.72
C	60.1	0.75
D	30.2	0.73
E	18.3	0.78

(5 marks)

- (c) For a solute with a distribution ratio of 50.0, show by calculation which is more effective, extraction of 20.0 mL of an aqueous solution with 20.0 mL organic solvent or extraction with two separate 10.0 mL portions of organic solvent.

(5 marks)

4. (a) Three compounds, A, B, and C, exhibit retention factors on a column having only 500 plates of $k_A = 1.40$, $k_B = 1.85$, and $k_C = 2.65$. Can they be separated with a minimum resolution of 1.05?

(8 marks)

-4-

- (b) What is the van Deemter equation? Define terms. How do the Huber and Knox equations differ from the van Deemter equation?
(7 marks)
- (c) Eighty percent of a metal chelate is extracted when equal volumes of aqueous and organic phases are used. What will be the percent extracted if the volume of the organic phase is doubled?
(5 marks)
5. (a) The concentration of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil can be determined by first extracting the PAHs with methylene chloride. The extract is then diluted, if necessary, and the PAHs are separated by HPLC using a UV/Vis or fluorescence detector. Calibration is achieved by using one or more external standards. In a typical analysis, a 2.013 g sample of dried soil is extracted with 20.00 mL of methylene chloride. After filtering to remove the soil, a 1 mL portion of the extract is removed and diluted to 10 mL with acetonitrile. Injecting 5 μ L of the diluted extract into an HPLC gives a signal of 0.217 (arbitrary units) for the PAH fluoranthene. When 5 μ L of a 20.0 ppm fluoranthene standard is analysed using the same conditions, a signal of 0.258 is measured. Calculate the part per million of fluoranthene in the soil.
(5 marks)
- (b) Describe the principles of capillary electrophoresis. What are its advantages?
(6 marks)
- (c) The distribution ratio between 3 M HCl and tri-n-butylphosphate for PdCl_2 is 2.3. What percent PdCl_2 will be extracted from 25.0 mL of a 7.0×10^{-4} M solution into 10.0 mL tri-n-butylphosphate?
(6 marks)
- (d) Why are silica particles endcapped in bonded reversed-phase particles?
(3 marks)
6. (a) Eighty percent of a solute is removed from 50 mL of an aqueous solution by extraction with two 25 mL portions of an organic solvent. What is the distribution ratio of the solute?
(6 marks)

-5-

- (b) Arsenic(III) is 70% extracted from 7 M HCl into an equal volume of toluene. What percentage will remain unextracted after three individual extractions with toluene?
(5 marks)
- (c) Describe the factors that affect the selectivity of ion exchange resins.
(5 marks)
- (d) In what order would $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CH_3CHO , and $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ be eluted from an alumina column using n-hexane as the eluent? Give your reasons.
(4 marks)
7. (a) It is desired to just resolve two gas chromatographic peaks with retention times of 85 and 100 s, respectively, using a column that has an H value of $1.5 \text{ cm plate}^{-1}$ under the operating conditions. What is the length of the column required? Assume the two peaks have the same base width.
(6 marks)
- (b) If the optimum volumetric flow rate for a 4.6 mm i.d. column is 1.5 mL min^{-1} with $5 \mu\text{m}$ particles, what would it be for a 2.1 mm i.d. column with the same particles? How much solvent would be consumed for a 10 min separation for each column?
(5 marks)
- (c) Describe the principle of size exclusion chromatography. What is the exclusion limit?
(5 marks)
- (d) To what types of compounds is supercritical fluid chromatography particularly applicable? Explain.
(4 marks)

TERJEMAHAN

Jawab **LIMA** soalan sahaja.

Jawab tiap-tiap soalan pada muka surat yang baru.

Anda boleh menjawab sama ada dalam Bahasa Malaysia atau Bahasa Inggeris.

Jika calon menjawab lebih daripada lima soalan, hanya lima soalan pertama mengikut susunan dalam skrip jawapan akan diberi markah.

1. (a) Bandingkan prinsip pengesanan kromatografi gas berikut:

- (i) Kekonduksian terma.
- (ii) Pengionan nyala.
- (iii) Penangkapan elektron.

Juga bandingkan pengesanan-pesanan di atas daripada segi kepekaan dan jenis sebatian yang dapat dikesan.

(12 markah)

(b) Dalam kromatografi gas, bagaimanakah pemrograman suhu dapat memperbaiki pemisahan?

(4 markah)

(c) Dalam elektroforesis rerambut, pergerakan bersih tipikal, μ_{net} , bagi masa penghijrahan 10 minit bagi suatu turus rerambut 50 m yang beroperasi pada 30,000 V ialah $2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$. Kira bilangan plat, N , bagi ion kecil, Li^+ (pekali pembauran, $D = 1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) dan bagi suatu protein berjirim molekul 100,000 dengan $D = 3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

(4 markah)

2. Data berikut adalah bagi suatu turus kromatografi cecair:

Panjang padatan	24.7 cm
Kadar alir	0.313 mL/min
Isipadu fasa bergerak, V_m	1.37 mL
Isipadu fasa pegun, V_s	0.164 mL

Kromatogram bagi suatu campuran spesies A, B, C dan D memberikan data seperti berikut:

Spesies	Masa Penahanan (t_R), min	Lebar Jalur Puncak (w_b), min
Tidak ditahan	3.1	-
A	5.4	0.41
B	13.3	1.07
C	14.1	1.16
D	21.6	1.72

- (a) Kira;
- (i) bilangan plat, N, daripada setiap puncak.
 - (ii) purata dan sisihan piawai bagi N.
 - (iii) tinggi plat bagi turus.

(6 markah)

- (b) Daripada data di atas, kira bagi spesies B dan C;

- (i) Bezajelas (resolusi).
- (ii) faktor pemisahan.
- (iii) panjang turus yang diperlukan untuk memisahkan kedua-dua spesies dengan resolusi 1.5.
- (iv) masa yang diperlukan untuk memisahkan kedua-dua spesies pada turus dalam bahagian (b(iii)).

(14 markah)

3. (a) Secara ringkas bincangkan tentang pengesanan bintik dalam kromatografi lapisan nipis.

(10 markah)

- (b) Luas puncak dan gerak balas relatif pengesanan digunakan untuk menentukan kepekatan lima spesies dalam suatu sampel. Kaedah pernormalan puncak digunakan dalam pengiraan ini. Luas puncak relatif bagi lima puncak kromatografi gas diberikan di bawah. Juga ditunjukkan faktor pembetulan gerak balas pengesanan. Kira peratus setiap komponen dalam campuran.

Sebatian	Luas Puncak Relatif	Faktor Pembetulan Gerak Balas Pengesanan
A	32.5	0.70
B	20.7	0.72
C	60.1	0.75
D	30.2	0.73
E	18.3	0.78

(5 markah)

- (c) Bagi suatu zat terlarut yang mempunyai nisbah taburan 50.0, tunjukkan dengan pengiraan yang mana lebih berkesan, pengekstrakan 20.0 mL larutan akueus dengan 20.0 mL pelarut organik atau dua pengekstrakan berasingan dengan 10.0 mL bahagian pelarut organik.

(5 markah)

4. (a) Faktor penahanan k_A , k_B dan k_C bagi tiga sebatian A, B dan C adalah masing-masing 1.40, 1.85 dan 2.65 dalam suatu turus yang mempunyai 500 plat. Adakah sebatian-sebatian ini dapat dipisahkan dengan satu resolusi minimum 1.05?
(8 markah)
- (b) Apakah persamaan van Deemter? Takrifkan sebutan-sebutan dalam persamaan ini. Bagaimanakah persamaan-persamaan Huber dan Knox berbeza daripada persamaan van Deemter?
(7 markah)
- (c) Sebanyak 80% suatu logam kelat dapat diekstrak apabila isipadu fasa akueus dan fasa organik adalah sama. Berapakah peratus pengekstrakan apabila isipadu fasa organik digandakan (2 kali isipadu asal)?
(5 markah)
5. (a) Kepekatan hidrokarbon poliaromatik (PAH) dalam tanah dapat ditentukan dengan mengekstrak PAH dengan metilena klorida. Kemudian ekstrak itu dicairkan, jika perlu, dan PAH dipisahkan menggunakan HPLC dengan pengesan ultralembayung-nampak atau pendarfluor. Tentukan diperolehi dengan menggunakan satu atau lebih piawai luaran. Dalam suatu analisis tipikal, sebanyak 2.013 g sampel tanah kering diekstrak dengan 20.00 mL metilena klorida. Selepas penurasan untuk mengasingkan tanah, sebanyak 1 mL bahagian ekstrak diasingkan dan dicairkan kepada 10 mL dengan asetonitril. Penyuntikan 5 μL ekstrak yang telah dicairkan tadi ke dalam HPLC memberi isyarat 0.217 (unit arbitrari) bagi PAH fluorantena. Apabila 5 μL 20.0 ppm piawai fluorantena dianalisis menggunakan keadaan yang sama, isyarat 0.258 disukat. Kira kepekatan fluorantena di dalam sampel tanah dalam unit bahagian per juta.
(5 markah)
- (b) Terangkan prinsip elektroforesis rerambut. Apakah kelebihanannya?
(6 markah)
- (c) Nisbah taburan bagi PdCl_2 antara larutan 3 M HCl dan pelarut tri-n-butilfosfat ialah 2.3. Berapakah peratus PdCl_2 yang terekstrak daripada 25.0 mL larutan 7.0×10^{-4} M PdCl_2 ke dalam 10.0 mL tri-n-butilfosfat?
(6 markah)
- (d) Mengapakah zarah silika di “endcap” dalam zarah fasa terbalik terikat?
(3 markah)

6. (a) Sebanyak 80% suatu zat terlarut telah dapat dipisahkan daripada 50 mL larutan akueus dengan dua kali pengekstrakan dengan dua bahagian 25 mL pelarut organik. Berapakah nisbah taburan zat terlarut ini? (6 markah)
- (b) Sebanyak 70% arsenik(III) telah diekstrak daripada 7 M HCl ke dalam isipadu sama banyak toluena. Berapa peratuskah yang belum terekstrak selepas tiga kali pengekstrakan dengan toluena? (5 markah)
- (c) Terangkan faktor-faktor yang mempengaruhi kepilihan resin pertukaran ion. (5 markah)
- (d) Apakah urutan $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CH_3CHO , dan $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ yang dielusi daripada turus alumina menggunakan n-heksana sebagai pengelusi? Berikan alasan kamu. (4 markah)
7. (a) Dua puncak kromatografi gas dapat dibezajelaskan dengan sekadar kedua-dua puncak bersentuhan tetapi tidak bertindih dan masa penahanan masing-masing ialah 85 dan 100 s dengan menggunakan suatu turus yang tinggi platnya 1.5 cm/plat di bawah keadaan operasi yang tertentu. Berapakah panjang turus yang digunakan? Anggaphlah kedua-dua puncak mempunyai lebar jalur puncak, w_b , yang sama. (6 markah)
- (b) Jika kadar alir volumetri optimum bagi suatu turus yang mempunyai garispusat dalaman 4.6 mm dengan zarah $5 \mu\text{m}$ ialah 1.5 mL min^{-1} , berapakah kadar alir ini bagi suatu turus yang bergarispusat dalaman 2.1 mm dengan saiz zarah $5 \mu\text{m}$? Berapa banyakkah pelarut yang digunakan (dalam unit mL) bagi pemisahan selama 10 min bagi setiap turus? (5 markah)
- (c) Terangkan prinsip kromatografi penyisihan saiz. Apakah had penyisihan? (5 markah)
- (d) Apakah jenis-jenis sebatian yang sesuai dianalisis menggunakan kromatografi bendalir lampau genting? Terangkan. (4 markah)