

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Meri Susanti
Dachriyanus



Lembaga Pengembangan
Teknologi Informasi dan Komunikasi
Universitas Andalas

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Meri Susanti
Dachriyanus

*Lembaga Pengembangan Teknologi
Informasi dan Komunikasi (LPTIK)
Universitas Andalas*

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Meri Susanti, Dachriyanusus

Perpustakaan Nasional: Katalog dalam Terbitan (KDT)

Hak cipta dilindungi undang-undang

All Right Reserved

ISBN

978-602-5539-02-2

Diterbitkan oleh:

Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi
(LPTIK) Universitas Andalas Lantai Dasar Gedung Perpustakaan
Pusat Kampus Universitas Andalas Jl. Dr. Mohammad Hatta Limau
Manis, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

Web: www.lptik.unand.ac.id

Telp. 0751-775827 - 777049

Email: sekretariat_lptik@unand.ac.id

Hak cipta dilindungi Undang-Undang.

Dilarang memperbanyak sebagian maupun seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit kecuali demi tujuan resensi atau kajian ilmiah yang bersifat nonkomersial.

DAFTAR ISI

| | |
|---|----|
| PENDAHULUAN | |
| 1.1 Sejarah Kromatografi | 1 |
| 1.2 Ruang Lingkup KCKT | 3 |
| Latihan | 5 |
| TEORI KOLOM | |
| 2.1 Profil Kromatogram | 6 |
| 2.2 Waktu retensi atau waktu tambat (<i>Retention Time ; TR</i>) | 7 |
| 2.3 Faktor Kapasitas / factor retensi | 8 |
| 2.4 Selektivitas (α) | 9 |
| 2.5 Efisiensi kolom | 10 |
| 2.6 Persamaan <i>Van Deemter</i> | 12 |
| 2.7 Optimalisasi kinerja kolom | 18 |
| Latihan | 22 |
| TIBE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI | |
| 3.1 Kromatografi Partisi | 24 |
| 3.2 Kromatografi Adsorpsi | 39 |
| 3.3 Kromatografi pertukaran ion | 42 |
| 3.4 Kromatografi Eklusi | 45 |
| Latihan | 48 |
| INSTRUMENTASI KCKT | |
| 4.1 Reservoir fase gerak dan system <i>treatment</i> pelarut | 49 |
| 4.2 Pompa | 55 |
| 4.3 Injektor | 60 |
| 4.4 Kolom | 62 |
| 4.5 Detektor | 66 |
| Latihan | 75 |

| | |
|---|----|
| APLIKASI dan VALIDASI METODA KCKT | |
| 6.1 Analisis dan Metode | 76 |
| 6.2 Kecermatan (<i>Accuracy</i>) | 80 |
| 6.3 Keseksamaan (<i>Precision</i>) | 81 |
| 6.4 Selektivitas (spesifisitas) | 83 |
| 6.5 Batas deteksi / <i>Limits of Detection</i> (<i>LOD</i>) dan Batas kuantitasi / <i>Limits of Quantitation</i> (<i>LOQ</i>) | 83 |
| 6.5 Linieritas dan Rentang | 85 |
| Latihan | 87 |
| Sumber Bacaan | 88 |
| Indeks | |

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

BAB I PENDAHULUAN

Setelah mempelajari Bab ini, mahasiswa memahami sejarah kromatografi, jenis-jenis kromatografi cair, dan aplikasinya dalam

1.1 Sejarah Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia (analit) yang berdasarkan pada perbedaan migrasi/ distribusi masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam (*stationary phase*) dibawah pengaruh fase gerak (*mobile phase*), fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fasa diam dapat berupa zat cair atau zat padat. Kromatografi cair pertama kali diperkenalkan oleh Tswett pada tahun 1903 yang menggunakan kolom kapur untuk memisahkan pigmen dari daun-daun hijau. Pita-pita warna yang dihasilkan pada adsorben menginspirasi istilah kromatografi untuk menggambarkan proses pemisahan yang berasal dari kata Jerman *Chromos* berarti warna dan *grafe* berarti menulis. Untuk masa sekarang pemisahan dan penentuan warna sudah sedikit dilakukan dengan kromatografi modern, meskipun tidak relevan istilah itu masih dipakai untuk menggambarkan seluruh tehnik pemisahan yang menggunakan fasa gerak dan fasa diam.

Wilstater dan Stoll mencoba mengulangi kerja Tswett tetapi gagal. Tiga puluh tahun kemudian Kohn dan kawan-kawan mengulangi sukses kerja Tswett dengan memisahkan lutein dan xanthine dari ekstrak tanaman. Dengan kesuksesan Kohn dan validasi percobaan Tswett membuat sedikit kemajuan

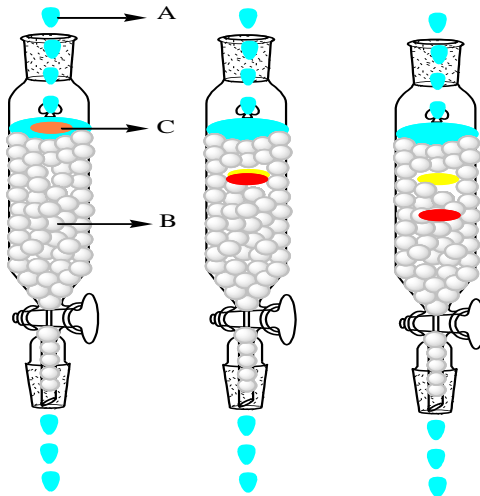
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

kromatografi. Martin dan Syngge tahun 1941 memperkenalkan kromatografi cair-cair dan secara umum mengatur perkembangan kromatografi gas dan kromatografi kertas.

Tahun 1952 Martin dan James mempublikasikan karya pertama mereka tentang kromatografi gas. Pada 1952 sampai akhir 1960 kromatografi gas berkembang dan menjadi era penting perkembangan kromatografi. Selama tahun 60-an dan 70-an dasar teori kolom kromatografi diletakkan yang akan menuntun perkembangan kromatografi cair.

Pada awal penggunaannya kromatografi cair dilakukan dalam kolom kaca bergaris tengah besar pada kondisi atmosfer yang memerlukan waktu analisis panjang dan keseluruhan tatakerja menjemukan. Perhatian makin besar dicurahkan pada pengembangan kromatografi cair sebagai cara yang melengkapi kromatografi gas. Para ilmuwan yakin bahwa efisiensi kolom dapat ditingkatkan dengan pengurangan ukuran partikel fase diam. Pada akhir tahun 1960an teknologi untuk menghasilkan kemasan dengan partikel berdiameter 3 – 10 um telah berkembang. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT/HPLC) atau *High Pressure Liquid Chromatography* berkembang dari usaha tersebut. Sekarang kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik pemisahan yang lebih baik dimana banyak keputusan telah dibuat dan aplikasi jauh lebih banyak dibandingkan dengan kromatografi gas.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 1. Kromatografi cair dengan kolom konvensional; (A) fase gerak (B) fase diam dan (C) campuran solute (Sumber : Wikibook.org)

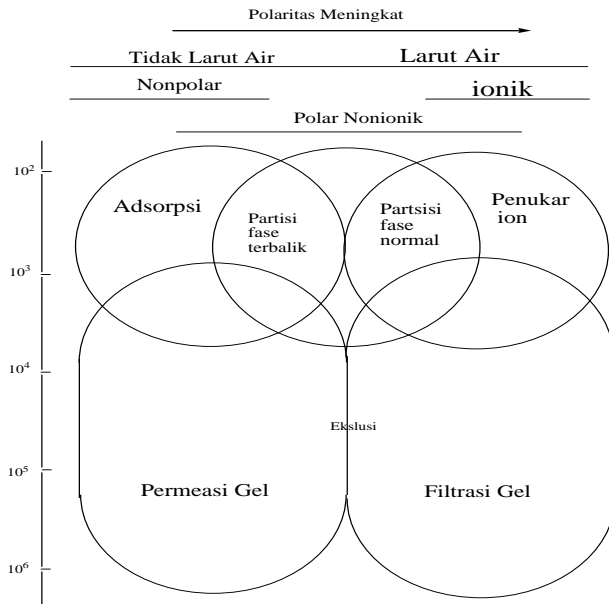
1.2 Ruang Lingkup KCKT

KCKT dapat dipandang sebagai pelengkap Kromatografi gas (KG), keduanya dapat digunakan untuk menghasilkan efek pemisahan yang sama baiknya. Bila derivatisasi diperlukan dalam KG, namun pada KCKT zat-zat yang tidak diderivatisasi masih dapat dianalisis. Untuk zat-zat yang labil pada pemanasan atau tidak menguap, KCKT adalah pilihan utama.

Keunggulan metoda ini dibanding metoda pemisahan lainnya terletak pada ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi serta cocok untuk memisahkan senyawa-senyawa *nonvolatile* yang tidak tahan pada pemanasan. Peningkatan kecepatan dan efisiensi pemisahannya terkait dengan peningkatan performa kolomnya yang menggunakan kolom dengan ukuran

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

dimensi dan partikel yang jauh lebih kecil dari kolom yang dipakai pada kromatografi kolom konvensional, sehingga agar fase gerak dapat mengalir pada kolom, fase gerak dipompa dengan tekanan tinggi. Di samping itu, kinerja tingginya dalam analisis didukung dengan adanya berbagai sistem deteksi dengan kepekaan tinggi yang dapat diintegrasikan dengan sistem kromatografinya.



Gambar 2. Aplikasi kromatografi cair dalam analisis (Sumber: Skoog, 1998)

Berbagai prinsip pemisahan pada kromatografi cair kinerja tinggi memungkinkan pemanfaatan metoda ini dalam berbagai analisis. Bahan-bahan dengan bobot molekul lebih dari 10.000 biasanya dipisahkan dengan kromatografi ekklusi, sedangkan untuk senyawa ionik dengan bobot molekul rendah kromatografi penukar ion lebih sering digunakan.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Senyawa non ionic polar dipisahkan dengan metoda partisi. Kromatografi adsorpsi sering digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa nonpolar.

Latihan

1. Jelaskan definisi dari kromatografi.
2. Ceritakan sejarah penemuan dan perkembangan kromatografi.
3. Jelaskan jenis-jenis kromatografi cair dan perbedaan masing-masingnya.
4. Jelaskan keunggulan KCKT jika dibandingkan metoda pemisahan lainnya
5. Tuliskan senyawa yang cocok dipisahkan untuk masing-masing kromatografi berikut beserta alasannya:
 - a. Partisi- cair
 - b. Partisi fase terbalik
 - c. Prtukaran ion
 - d. Permiasi gel
 - e. Adsorpsi- cair
 - f. Filtrasi gel

BAB II TEORI KOLOM

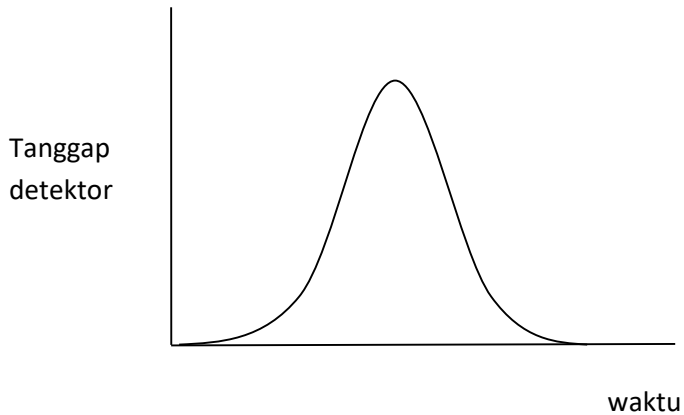
Setelah mempelajari Bab ini mahasiswa diharapkan memahami istilah-istilah dalam pemisahan menggunakan metoda kromatografi serta variable yang mempengaruhi efisiensi analisis kualitatif dan kuantitatif dengan kromatografi.

2.1 Profil Kromatogram

Kromatogram KCKT merupakan hubungan antara waktu sebagai absis dan tanggap detektor sebagai ordinat pada sistem koordinat Cartesian, dimana titik nol dinyatakan sebagai saat dimulainya injeksi sampel. Molekul-molekul sampel yang diinjeksikan menuju kolom analisis tidak akan berkumpul pada suatu titik secara serempak dalam waktu yang sama. Demikian pula tiap-tiap molekul analit akan mengalami hambatan fase diam di dalam kolom dengan waktu yang berbeda. Oleh karena itu semua molekul analit tidak serempak keluar dari kolom.

Molekul analit akan keluar dari kolom secara acak dan demikian pula respon detektor terhadap analit yang keluar dari kolom tersebut tidak serempak terhadap semua molekul. Sebagai akibat kenyataan tersebut maka profil kromatogram akan melebar secara ideal membentuk kurva Gauss.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

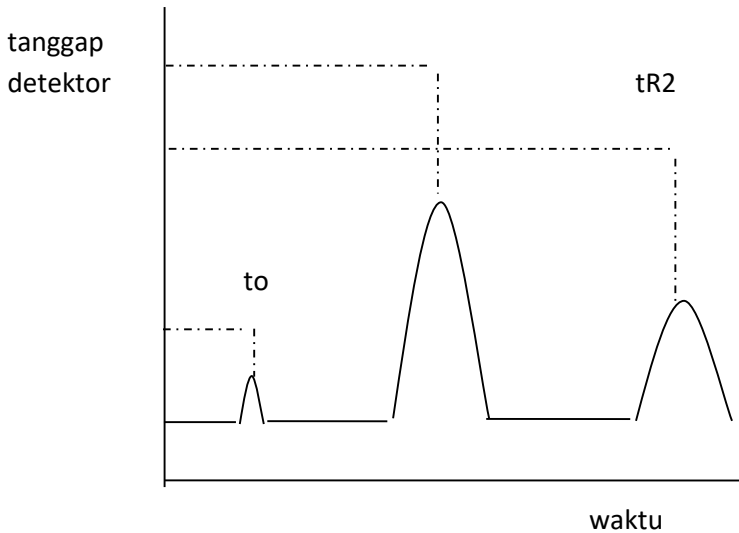


Gambar 3. Bentuk kromatogram KCKT

2.2 Waktu retensi atau waktu tambat (*Retention Time ; TR*)

Selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor disebut sebagai waktu retensi (*retention time*) atau waktu tambat. Waktu retensi analit yang tertahan pada fase diam dinyatakan dengan t_R , sedangkan waktu retensi analit yang tidak tertahan pada fase diam atau sering disebut sebagai waktu retensi pelarut pengelusi dinyatakan sebagai t_0 atau t_M .

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 4. Perhitungan waktu retensi kromatogram; t_0 adalah waktu retensi pelarut pengelusi, t_{R1} & t_{R2} adalah waktu retensi analit 1 dan analit 2

Waktu retensi analit dikurangi dengan waktu retensi pelarut pengelusi atau pelarut pengelusi campur disebut sebagai waktu retensi terkoreksi yang dinyatakan sebagai tR' .

$$tR' = tR - tM$$

Waktu retensi yang dinyatakan dalam satuan (menit) memberikan arti yang sangat penting dalam analisa kualitatif dengan KCKT.

2.3 Faktor Kapasitas / factor retensi

Faktor kapasitas merupakan ciri khas suatu analit pada kondisi tertentu, yaitu pada komposisi fase gerak, suhu dan jenis kolom (panjang kolom, diameter

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

kolom dan ketebalan lapisan film) tertentu. Meskipun suatu puncak kromatogram dapat diidentifikasi melalui waktu retensinya namun akan lebih baik bila diidentifikasi dengan menggunakan faktor kapasitas karena harga waktu retensi dapat berubah-ubah sesuai dengan panjang kolom dan kecepatan alir fase geraknya.

Faktor kapasitas dapat memberikan gambaran dimana puncak-puncak analit terelusi secara relatif terhadap puncak fase geraknya. Faktor kapasitas k' dinyatakan sebagai berikut:

$$k' = \frac{(tR - t_0)}{t_0}$$

Dimana; $tR - t_0$: waktu retensi terkoreksi
 t_0 : waktu retensi fase gerak

Harga faktor kapasitas k' yang baik adalah berkisar antara 2 dan 10. Bila harga k' kecil berarti analit ditahan sedikit oleh kolom dan terelusi dekat dengan puncak fase gerak. Ini menghasilkan pemisahan yang kurang bagus. Harga k' yang besar (misalnya 20 – 30 menit) menunjukkan pemisahan yang baik tetapi menyebabkan waktu analisis terlalu lama.

2.4 Selektivitas (α)

Kemampuan fase diam untuk memisahkan 2 komponen (komponen 1 dan komponen 2), dimana komponen 2 sangat tertahan dibandingkan komponen 1 ditentukan oleh partisi atau rasio relatifnya, sehingga tergantung pada factor kapasitasnya pada fase diam

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

tertentu. Selektivitas (α) merupakan nilai retensi relative tiap komponen oleh fase diam.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Sehingga

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

Selektivitas untuk pasangan puncak yang bersebelahan merupakan fungsi jenis fase diam yang digunakan, fase gerak dan suhu kolom, dan harus dioptimasi terutama untuk komponen yang paling sukar terpisah selama elusi. Supaya pemisahan terjadi, maka nilai α harus lebih besar dari 1.

2.5 Efisiensi kolom

Terdapat dua cara yang paling lazim digunakan dalam mengukur efisiensi kolom kromatografi yaitu jumlah pelat teori (N) dan jarak setara pelat teori (JSPT)

2.5.1 Jumlah Pelat Teori (N)

Jumlah pelat teori (N) adalah banyaknya distribusi keseimbangan dinamis yang terjadi di dalam suatu kolom. Jumlah pelat teori digunakan untuk mengetahui keefisienan kolom.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad \text{atau} \quad N = 5,54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

Dimana

tR : waktu retensi analit
W : lebar pada dasar puncak

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

$W_{1/2}$: lebar pada setengah tinggi puncak

Persamaan ini membandingkan lebar puncak dengan lamanya komponen berada dalam kolom. Jadi kolom yang efisien mencegah pelebaran pita dan atau menghasilkan puncak yang sempit. Dalam proses pemisahan diharapkan untuk menghasilkan harga N yang sebesar-besarnya. Pada umumnya efisiensi kolom KCKT meningkat dengan semakin kecilnya ukuran partikel yang ada di dalam kolom.

2.5.2 Jarak Setara Pelat Teori (JSPT)

JSPT disebut juga TSPT (Tinggi Setara Pelat Teori) secara internasional dikenal sebagai HETP (*High Equivalent of Theoretical Plate*) atau disingkat dengan huruf H saja. JSPT adalah panjang kolom kromatografi (mm) yang diperlukan sampai terjadinya satu kali keseimbangan distribusi dinamis molekul analit dalam fase gerak dan fase diam. Harga H berkaitan dengan jumlah pelat teori menurut persamaan :

$$JSPT = H = HETP = \frac{L}{N}$$

Dimana

L : panjang kolom (mm)

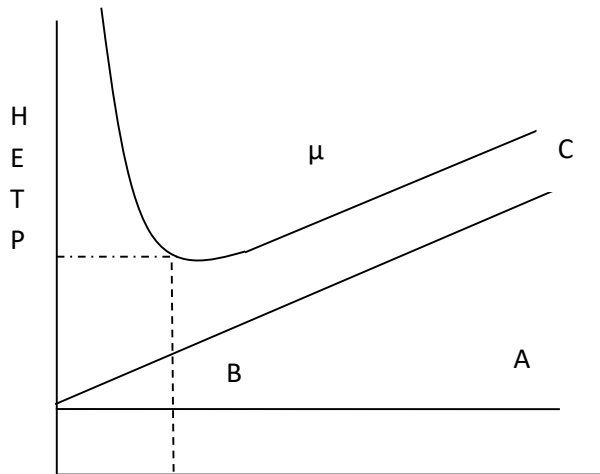
N : jumlah pelat teori

Kolom untuk kromatografi cair berkecepatan tinggi biasanya mempunyai tinggi pelat dalam rentang 0,01 sampai 1,0 mm.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.6 Persamaan Van Deemter

Van Deemter mengemukakan suatu persamaan hubungan antara JSPT terhadap laju aliran fase gerak (μ). Hubungan antara JSPT (H) terhadap laju aliran μ digambarkan oleh *Van Deemter* sebagai grafik yang mendekati parabola atau elips.



Gambar 5. Kurva Hukum Van Deemter

$$H = A + \frac{B}{u} + C.u$$

A : difusi alih masa atau difusi pusaran (*eddy difussion*)

B : difusi linarut

C : tahanan alih masa

μ : kecepatan alir fase gerak

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pada kurva diatas akan didapatkan laju aliran fase gerak yang optimal (μ optimal) sehingga didapatkan harga JSPT (H) yang minimal. Secara umum Van Deemter mengemukakan suatu persamaan sebagai berikut :

A. Difusi alih masa (*eddy difussion*)

Kecepatan zat cair yang bergerak melalui penampang garis tengah kolom dapat berbeda secara berarti, tergantung pada struktur penyangga padat dalam kolom. Dalam kolom yang kemasannya penyangganya tidak baik, beberapa molekul akan bergerak lebih cepat dengan melewati alur yang lebih terbuka atau alur yang tahanannya lebih rendah dan ini disebut penyaluran atau pengkanalan. Molekul lainnya dapat berdifusi ke daerah lainnya yang tak bergerak dan tertinggal di belakang, ini disebut difusi pusaran. Secara ideal, molekul linarut harus bergerak melalui kemasannya melalui alur yang berliku-liku dan menghindari kedua pengaruh diatas.

Kecepatan rata-rata linarut menentukan waktu retensinya. Pelebaran pita disebabkan oleh kecepatan aliran yang berbeda ketika melalui kolom. Peranan difusi pusaran ditunjukkan pada persamaan :

$$H_p = 2.\lambda.dp$$

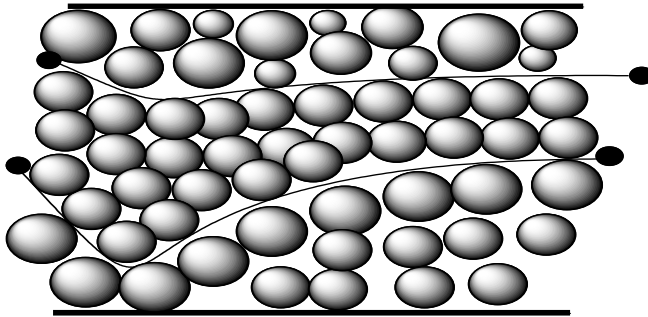
Dimana

H_p : tinggi pelat yang setara dengan pelat teori yang disebabkan oleh keragaman dalam laju aliran melalui kolom.

dp : garis tengah partikel

λ : tetapan yang harganya mendekati 1

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 6. Keragaman kecepatan aliran zona (Sumber: Johson, 1977)

Harga H_p dapat diperkecil dengan menggunakan partikel yang sebaran ukurannya sempit dan dengan cara mengemas kolom secara baik. Dengan tingkat teknologi masa sekarang harga H_p adalah 10 – 50% dari harga total H . H_p dapat diminimumkan dengan memakai partikel bergaris tengah kecil.

B. Difusi linier

Difusi merupakan gejala molekul untuk terdispersi atau bercampur. Dalam hal ini, molekul yang semula membentuk pita yang sempit berdifusi ke dalam pelarut sekelilingnya dan melebarkan profil pita. Pada prinsipnya, difusi sepanjang sumbu kolom yang panjang dapat terjadi baik dalam fase diam maupun dalam fase gerak, tetapi karena lajunya dalam fase diam begitu kecil, faktor ini dapat diabaikan. Pelebaran pita yang disebabkan oleh difusi memanjang cuplikan di dalam fase gerak dinyatakan dengan persamaan berikut :

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

$$H_d = 2 \cdot \gamma \cdot D_m / \mu$$

Dimana

D_m : koefisien difusi linarut dalam fase gerak

μ : kecepatan aliran dalam cm/detik

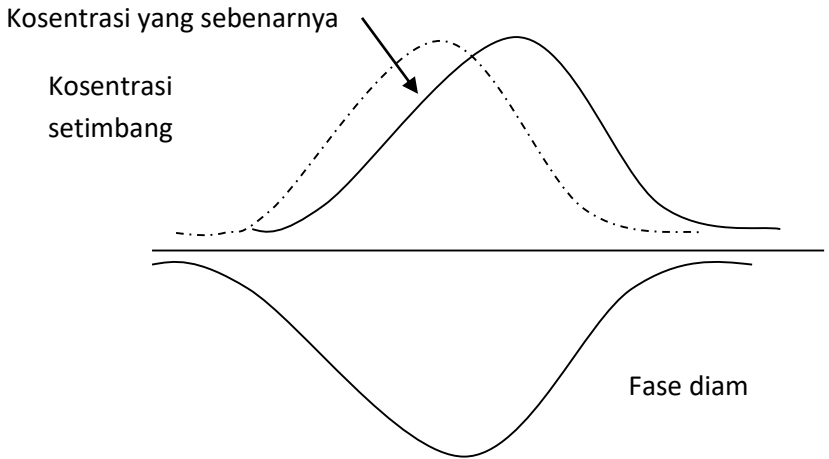
H_d menyatakan besarnya sumbangan kepada JSPT yang disebabkan oleh difusi memanjang molekul linarut. Faktor kelikuan yang dinyatakan dengan γ , dan ini berkaitan dengan derajat kemasam kolom dalam membatasi difusi. Pemakaian partikel kecil yang seragam untuk kemasam kolom akan memperkecil faktor kelikuannya karena difusi dihambat. Laju aliran yang tinggi akan memperkecil waktu huni di dalam kolom dan ini pun memperkecil H_d . Akan tetapi, pada laju aliran yang tinggi ini terjadi pelebaran pita yang disebabkan oleh alih massa. Pelebaran pita yang disebabkan oleh difusi molekul jarang menjadi faktor penting dalam menurunkan keefisienan kolom Kromatografi Cair. Pelebaran pita yang disebabkan oleh difusi memanjang molekul pada umumnya kurang dari 10% (dan sering lebih kecil dari 1%) harga total JSPT, kecuali pada μ yang rendah.

C. Tahanan alih masa

Laju pergerakan molekul cuplikan dalam fase diam dan fase gerak, biasanya disebut kinetika alih massa, dapat menjadi penyebab pelebaran pita yang dominan dan karena itu menentukan keefisienan kolom. Secara ideal, setiap molekul linarut yang berantaraksi dengan kemasam kolom dialihkan secara

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

terus menerus ke dalam fase diam dan ke luar fase diam seperti gambar berikut.



Gambar 7. Penggambaran pengaruh alih massa (Sumber: Johnson,1977)

Ketika berada dalam fase diam, molekul itu ditahan dan tertinggal di belakang pusat pita ketika pusat pita itu bergerak terus ke ujung kolom. Ketika berada dalam fase gerak, molekul bergerak bersama-sama dengan fase gerak. Kecepatannya lebih besar daripada pusat pita karena kecepatan aliran selalu lebih besar daripada kecepatan pita. Peralihan acak keluar-masuk fase diam dan fase gerak ini menyebabkan dispersi dalam puncak kromatografi karena sejumlah molekul secara kebetulan bergerak di depan molekul rata-rata dan molekul lainnya bergerak lebih lambat dari molekul rata-rata seperti dilukiskan pada Gambar 6. Jika tidak ada aliran, pita mempunyai konsentrasi kesetimbangan, seperti yang ditunjukkan dengan garis putus-putus di atas bidang temu dan garis utuh di bawah bidang temu. Akan tetapi karena dalam fase gerak ada aliran, konsentrasi linier yang

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

sebenarnya di dalam fase gerak selalu berada dalam kesetimbangan dengan konsentrasi dalam fase diam yang didampinginya. Dispersi atau pengenceran puncak kromatografi diminimumkan dengan cara memilih kondisi demikian rupa sehingga ketidaksetimbangan diperkecil dan laju pertukaran dimaksimumkan.

Fase diam dan fase gerak keduanya berperan dalam menentukan laju alih massa. Sesuai dengan itu, ada dua suku yang menjadi penyebab dispersi daerah; satu suku untuk fase diam dan suku yang lain untuk fase gerak. Pelebaran pita yang disebabkan oleh fase diam (H_s) dinyatakan dengan persamaan :

$$H_s = \frac{Q \cdot R \cdot d^2 \cdot \rho}{D_s}$$

Dimana

Q : faktor konfigurasi yang bergantung pada bentuk genangan fase diam dan faktor lain

R : tetapan yang bergantung pada laju perpindahan nisbi linarut dalam fase gerak

d : tebal lapisan fase diam

D_s : koefisien difusi linarut dala fase diam

μ : kecepatan aliran zat cair melalui kolom

Pelebaran pita yang disebabkan oleh fase diam dapat diminimumkan dengan membuat kemasam kolom pelikel. Caranya terutama dengan meminimumkan tebal lapisan fase diam. Selain itu pelebaran pita dapt dikurangi dengan memperbaiki keefisienan kolom dengan menggunakan fase diam

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

yang viskositasnya rendah, dan karena itu koefisien difusi linarut menjadi lebih besar.

Dengan berkembangnya kemasan kolom lapis tipis, atau kemasan pelikel, pengaruh nisbi H_s menurun yaitu dari suku yang menentukan keefisienan menjadi suku yang kecil artinya. Fase gerak menjadi memainkan peranan penting dalam menentukan pelebaran pita sebuah puncak, seperti ditunjukkan pada persamaan berikut :

$$H_m = \omega \cdot dp^2 \cdot \mu / D_m$$

Dimana

dp : garis tengah partikel

D_m : koefisien difusi linarut dalam fase gerak

μ : kecepatan aliran

Sumbangan H_m terhadap tinggi pelat sangat penting, merupakan 30 – 70% dari pelebaran pita keseluruhan. Ini dapat diminimumkan dengan memperkecil garis tengah partikel. Harga H_m dapat diperkecil pula dengan memperbesar koefisien difusi linarut dalam fase gerak dengan cara memakai pelarut yang berviskositas rendah dan atau dengan cara melakukan kromatografi pada suhu yang dinaikkan .

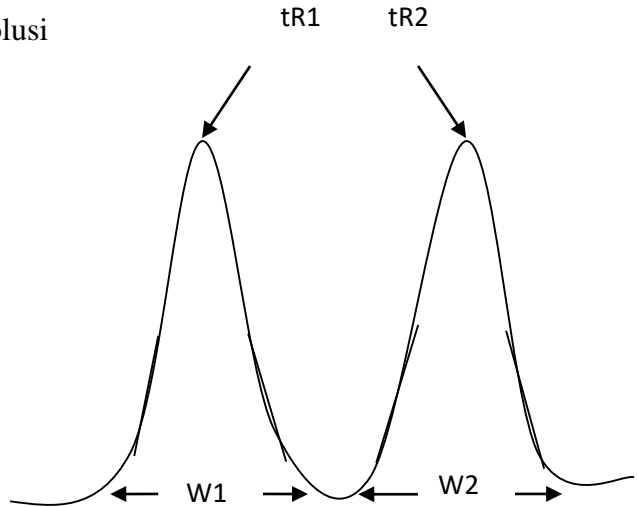
2.7 Optimalisasi kinerja kolom

Suatu pemisahan menggunakan metoda kromatografi dioptimalisasi dengan memvariasikan kondisi percobaan sampai komponen-komponen

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

dalam campuran terpisah dengan baik dengan waktu analisis yang singkat.

2.7.1 Resolusi



Gambar 8. Pemisahan dua analit

Tujuan kromatografi ialah memisahkan komponen cuplikan dalam waktu yang masuk akal, menjadi pita atau puncak ketika cuplikan itu bergerak melalui kolom.

Daya pisah R antara dua puncak dapat diukur secara kuantitatif sebagai berikut :

$$R = \frac{(tR2 - tR1)}{0,5(W2 + W1)}$$

Dimana

tR : waktu retensi komponen

W : lebar alas puncak

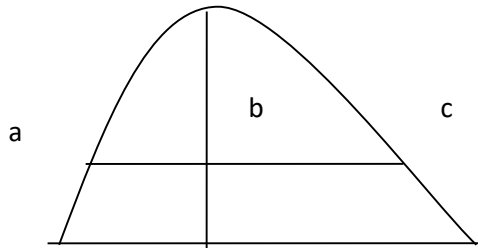
Pemisahan dua puncak dengan $R \geq 1,5$ merupakan harga resolusi ideal, dimana dua puncak terpisah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

secara sempurna. Bila pada suatu analisis diperoleh $R < 1,5$ maka untuk meningkatkan harga R oleh fase diam dapat dilakukan dengan menggunakan kolom yang lebih panjang sehingga menambah jumlah pelat teoritis.

2.7.2 Faktor Simetri

Faktor simetri atau tailing faktor yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris



Gambar 9. Pegukuran Kesimetrisan Puncak Kromatogram

$$TF = \frac{bc}{ac}$$

Untuk kromatogram yang memberikan harga $TF = 1$ berarti kromatogram tersebut benar-benar simetris. Harga $TF > 1$ berarti kromatogram tersebut mengekor (tailing), makin besar harga TF makin tidak efisien kolom yang dipakai. Bila harga $TF < 1$ berarti kromatogram mengandung (fronting). Jadi harga TF dapat digunakan sebagai pedoman untuk melihat efisiensi kolom kromatografi.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Contoh Soal

Senyawa A dan B diketahui memiliki waktu retensi 16,40 dan 17,63 menit pada pemisahan menggunakan kolom dengan panjang 30 cm. Suatu senyawa yang tidak tertahan pada fase diam melintasi kolom selama 1,30 menit. Lebar puncak A dan B berurutan adalah 1,11 dan 1,21 menit. Hitunglah nilai dari

- Resolusi (R)
- Jumlah pelat teoritis (N)
- Jarak setara pelat teori (JSPT)
- Panjang kolom yang diperlukan untuk memberikan pemisahan yang baik ($R = 1,5$)

Jawab

$$\begin{aligned} \text{a. } R &= \frac{2 \{ (tR)_B - (tR)_A \}}{W_A + W_B} \\ &= \frac{2 (17,63 \text{ menit} - 16,40 \text{ menit})}{(1,11 \text{ menit} + 1,21 \text{ menit})} = 1,06 \\ \text{b. } N &= 16 \left(\frac{tR}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{16,40 \text{ menit}}{1,11 \text{ menit}} \right)^2 = \\ &3,49 \times 10^3 \end{aligned}$$

dan

$$\begin{aligned} N &= 16 \left(\frac{tR}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{16,40 \text{ menit}}{1,11 \text{ menit}} \right)^2 \\ &= 3,40 \times 10^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Nrata - rata} &= \left(\frac{3,49 \times 10^3 + 3,40 \times 10^3}{2} \right) \\ &= 3,44 \times 10^3 \end{aligned}$$

$$\text{c. } JSPT = \frac{L}{N} = \frac{30,0 \text{ cm}}{3,44 \times 10^3} = 8,7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

d. k' dan α tidak berubah dengan peningkatan N dan L.

sehingga :

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

$$\frac{(R)_1}{(R)_2} = \frac{\sqrt{N1}}{\sqrt{N2}} \quad \frac{1,06}{1,5} = \frac{\sqrt{3,44 \times 10^3}}{\sqrt{N2}}$$

$$N2 = 3,44 \times 10^3 \left(\frac{1,5}{1,06}\right)^2 = 6,9 \times 10^3$$

$$L = N \times JSPT \\ = 6,9 \times 10^3 \times (8,7 \times 10^{-3} \text{ cm}) = 60 \text{ cm}$$

e. $N = 16 \left(\frac{16,40 \text{ menit}}{1,11 \text{ menit}}\right)^2 = 3,49 \times 10^3$

Latihan

1. Jelaskan alasan kenapa kromatogram solute yang dipisahkan dengan KCKT berbentuk kurva gauss
2. Berikan definisi dari beberapa istilah berikut
 - a. Waktu retensi
 - b. Factor kapasitas
 - c. Pelat teoritis
 - d. Difusi eddy
 - e. Resolusi
 - f. Faktor simetri
3. Jelaskan alasan kenapa factor kapasitas lebih tepat digunakan untuk identifikasi puncak analit dibanding waktu retensi
4. Jelaskan variable-variabel yang berpengaruh terhadap pelebaran pita pada kromatogram dan bagaimana cara mencegah pelebaran pita!
5. Berikut ini adalah data dari pemisahan dengan kromatografi cair

| | |
|----------------|------------------|
| Panjang kolom | 24,7 cm |
| Kecepatan alir | 0,313 mL / menit |

Kromatogram yang diperoleh dari pemisahan campuran zat A,B, C dan D adalah sebagai berikut :

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

| | Waktu retensi (menit) | Lebar dasar puncak (W) menit |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Senyawa yang tidak ditahan kolom | 3,1 | - |
| A | 5,4 | 0,41 |
| B | 13,3 | 1,07 |
| C | 14,1 | 1,16 |
| D | 21,6 | 1,72 |

Hitunglah :

- Jumlah pelat teoritis pada masing-masing puncak
- Nilai tengah dan standar deviasi untuk N
- Jarak setara pelat teori untuk tiap puncak
- Waktu retensi masing-masing puncak
- Resolusi
- Panjang kolom yang dibutuhkan untuk memperoleh $R > 1,5$

BAB III TIPE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Setelah mempelajari Bab ini mahasiswa diharapkan memahami tentang kromatografi partisi, kromatografi adsorpsi, kromatografi penukar ion dan kromatografi

3.1 Kromatografi Partisi

Kromatografi partisi merupakan prinsip kromatografi yang paling luas pemanfaatannya dalam KCKT dibanding empat tipe lainnya. Pada awalnya, kromatografi partisi digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa non-ionik dan senyawa polar dengan bobot molekul sedang ($BM < 3000$). Sekarang, dengan semakin berkembangnya metoda derivatisasi dan pasangan ion maka prinsip kromatografi partisi juga telah digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa ionic.

Kromatografi partisi dapat dibedakan ke dalam dua kategori; kromatografi partisi cair-cair dan kromatografi fase terikat. Perbedaan ke dua teknik ini terletak pada metoda pengikatan fase diam pada partikel penyangga kemasan kolom. Kromatografi partisi cair-cair, fase diam diikatkan pada permukaan kemasan secara fisika, sedangkan pada kromatografi partisi fase terikat (*bonded phase*) fase diam terikat secara kimia.

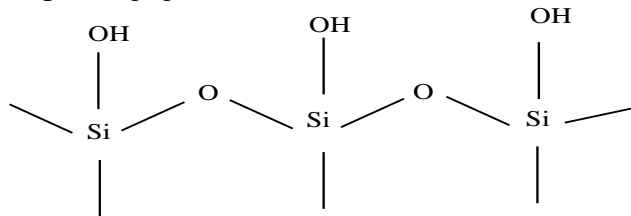
Pada awalnya kromatografi partisi hanya tipe cair-cair, tapi sekarang metoda fase terikat lebih banyak digunakan karena kekurangan dari sistem cair-cair. Salah satu kekurangannya adalah kemungkinan untuk terkikisnya fase diam oleh aliran fase gerak.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Masalah kelarutan fase diam oleh fase gerak juga menjadi penghalang penggunaan kemasan fase cair untuk elusi gradient.

Kolom kromatografi fase terikat

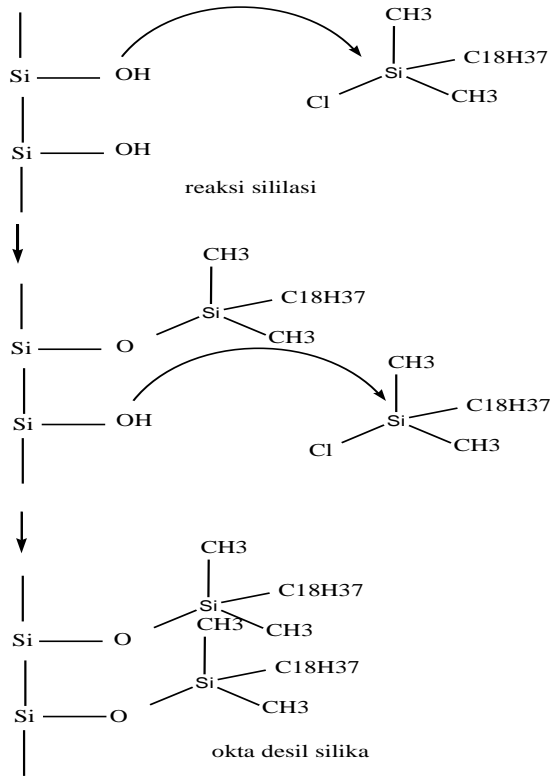
Penyangga yang digunakan pada kemasan fase terikat biasanya adalah padatan bulat berpori dengan ukuran seragam yang terbuat dari silica, diameter padatan biasanya 3, 5 atau 10 um. Permukaan penyangga dipenuhi silica terhidroksilasi (silica yang telah dipanaskan dengan HCl 0.1M selama 1-2 hari) yang merupakan gugus silanol reaktif.



Gambar 10. Permukaan penyangga berupa silica yang mengandung gugus silanol

Penyiapan kolom fase terikat dimulai dengan tahap yang disebut sililasi, pada tahap ini silika terhidroksilasi direaksikan dengan chlorodimethylalkylsilane. Variasi panjang rantai dan gugus fungsi pada alkil menghasilkan berbagai tipe kolom fase terikat. Jika reaksi dihentikan pada tahap ini maka akan diperoleh kolom dengan 10% gugus silanol bebas (gugus Si-OH) karena halangan sterik. Kolom akan bekerja dengan baik untuk pemisahan senyawa asam atau netral tetapi akan memberikan pemisahan yang kurang baik untuk amina dan basa.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 11. Tahap reaksi penyiapan fase diam fase terikat

Untuk meningkatkan kinerja kolom maka diperlukan reaksi lanjutan yang melibatkan reaksi antara silanol bebas (residu silanol) dengan senyawa yang lebih kecil (misalnya; klortrimetilsilane). Setelah perlakuan ini silanol bebas hanya tertinggal <1%.

Kemasan Fase Normal (*Normal Phases*) dan Fase Terbalik (*Reverse phases*)

Kromatografi partisi dapat dibedakan berdasarkan pada kepolaran relatif fase diam dan fase gerak. Pada masa awal, penggunaan kromatografi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

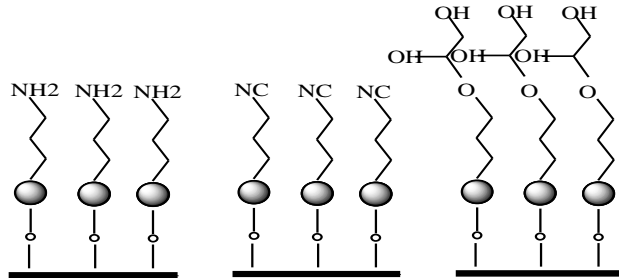
cair menggunakan fase diam yang sangat polar seperti air atau trietilenglikol yang terikat pada partikel silica atau alumina; fase gerak adalah pelarut yang relative kurang polar seperti heksan atau iso propil eter. Tipe kromatografi ini dikenal sebagai kromatografi fase normal.

Pada kromatografi fase terbalik, fase diam adalah senyawa non polar (biasanya suatu hidrokarbon) dan fase gerak pelarut yang relative lebih polar seperti air, methanol atau asetonitril. Pada kromatografi fase normal, senyawa yang kurang polar dielusi lebih awal karena senyawa non polar paling baik kelarutannya dalam fase gerak. Peningkatan kepolaran fase gerak dapat memperpendek waktu elusi. Sebaliknya, pada kromatografi fase terbalik senyawa-senyawa polar akan terelusi lebih awal, dan peningkatan kepolaran fase gerak akan memperbesar waktu elusi.

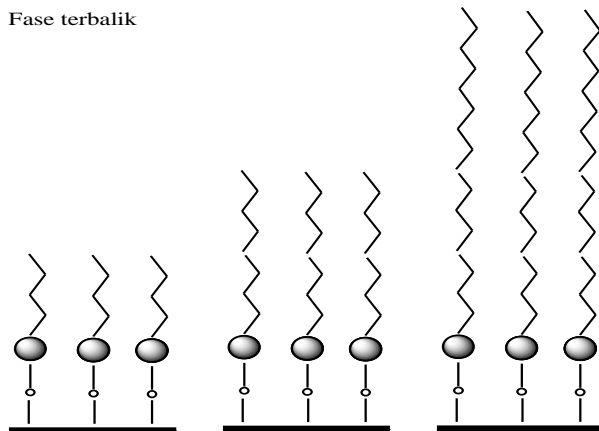
Kemasan fase terikat dikelompokkan sebagai fase terbalik ketika pelapis yang diikatkan memiliki sifat nonpolar dan sebagai fase normal ketika pelapis mengandung gugus fungsi polar. Pada umumnya kromatografi cair kinerja tinggi memiliki kolom dengan kemasan fase terbalik. Gugus R pada pelapis siloksan adalah rantai C_8 (n-oktil) atau rantai C_{18} (n-oktildesil)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Fase Normal



Fase terbalik



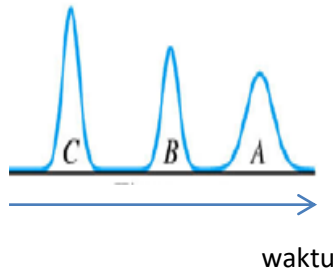
Gambar 12. Kolom fase normal(fase diam relative polar) dan kolom fase terbalik (fase diam relative kurang polar)

Sebagian besar penggunaan kromatografi fase terbalik menggunakan fase gerak sangat polar seperti larutan air yang mengandung beberapa pelarut organik dengan konsentrasi tertentu seperti methanol, asetonitril, atau tetrahydrofuran. Pada kondisi ini, pH perlu dijaga agar tidak lebih dari 7,5 karena kondisi ini dapat memicu terjadinya hidrolisis siloksan yang dapat merusak kemasan.

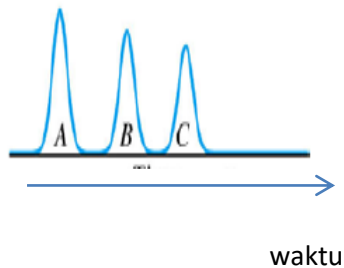
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Di pasaran kemasan fase terikat normal, R dalam struktur siloksan adalah suatu gugus fungsi polar seperti ciano ($-C_2H_4CN$), diol ($-C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$), amino ($-C_3H_6NH_2$) dan dimetilamin ($C_3H_6N(CH_3)_2$). Fase gerak yang digunakan sebagai pengelusi biasanya adalah pelarut nonpolar seperti etileter, kloroform dan n-heksana.

Kromatografi fase norma
Fase gerak dengan kepolaran rendah

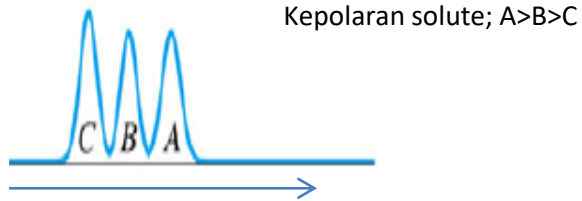


Kromatografi fase terbalik
Fase gerak dengan kepolaran tinggi

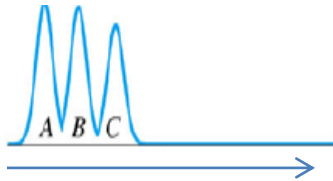


Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Fase gerak dengan kepolaran menengah



Fase gerak dengan kepolaran menengah

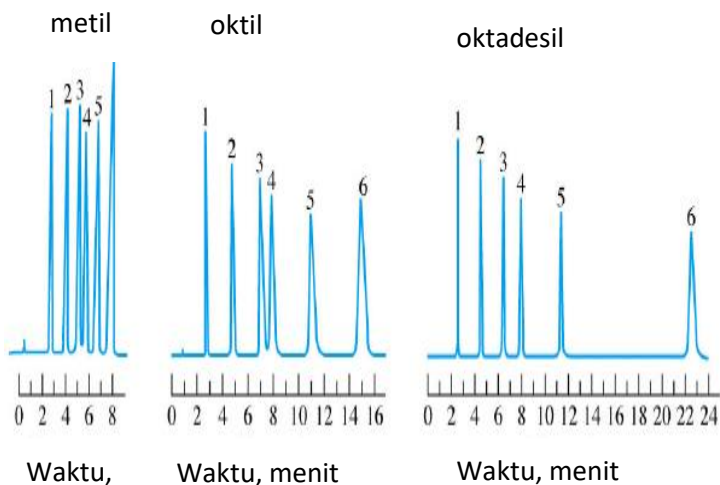


Gambar 13. Hubungan antara kepolaran dan waktu elusi pada kromatografi fase normal dan kromatografi fase terbalik (Sumber : Skoog, 1998)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Identifikasi Puncak

1. Urasil
2. Fenol
3. Asetofenon
4. Nitrobenzene
5. Metil benzoate
6. toluen



Gambar 14. Pengaruh panjang rantai pada performa dari kemasan kolom siloksan fase terbalik. Fase gerak; 50/50 metanol/air. Kecepatan aliran 1 mL/menit (Sumber: Skoog, 1998)

Kromatografi Pasangan-ion

Kromatografi pasangan ion adalah suatu tipe kromatografi partisi fase terbalik yang digunakan untuk pemisahan dan penentuan senyawa-senyawa ionic. Fase gerak terdiri dari larutan buffer yang mengandung pelarut organik seperti methanol atau asetonitril dan suatu pasangan ion yang memiliki

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

muatan ion berlawanan dengan analit. Analit akan bergabung dengan pasangan ion dalam fase gerak membentuk pasangan ion yang netral. Senyawa netral yang terbentuk akan ditahan pada kemasan fase diam. Elusi pasangan ion dilakukan dengan larutan methanol dalam air atau larutan air dari pelarut organic lainnya.

Penggunaan kromatografi pasangan ion sering tumpang tindih dengan kromatografi penukar ion. Beberapa masalah dapat dipecahkan dengan kedua metoda ini akan tetapi penukaran ion tidak sebaik dengan kromatografi pasangan ion untuk pemisahan campuran-campuran yang bersifat asam, basa dan yang bersifat netral di bawah lingkungan tertentu. Senyawa-senyawa ionik dapat dipisahkan dengan fase terbalik asalkan sampel-sampel ini hanya mengandung asam-asam atau basa-basa lemah yang terdapat dalam bentuk tidak terdisosiasi (bentuk molekul utuh) sebagaimana ditentukan dengan pemilihan pH yang tepat yang dikenal dengan penekanan ion. Kromatografi pasangan ion merupakan perluasan prinsip ini. Suatu senyawa ionik organic ditambahkan ke fase gerak dan membentuk pasangan ion dengan komponen analit yang bermuatan berlawanan. Dalam kenyataannya, senyawa ini adalah garam akan tetapi tingkah laku kromatografinya adalah serupa dengan molekul organic non-ionik.

Sampel⁺ + ion pasangannya → pasangan (sampel⁺ion pasangan⁻)

Sampel⁻ + ion pasangannya → pasangan (sampel⁻ion pasangan⁺)

Keuntungan kromatografi pasangan ion untuk senyawa-senyawa ionik adalah sebagai berikut :

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. System fase terbalik dapat digunakan untuk pemisahan
2. Campuran asam, basa, netral dan juga molekul-molekul amfoter (yang mempunyai satu gugus anionic dan satu gugus kationik) dapat dipisahkan
3. Kromatografi pasangan ion juga merupakan pilihan yang baik jika pKa analit serupa
4. Selektifitas dapat dipengaruhi oleh pemilihan pasangan ion yang bermuatan berlawanan

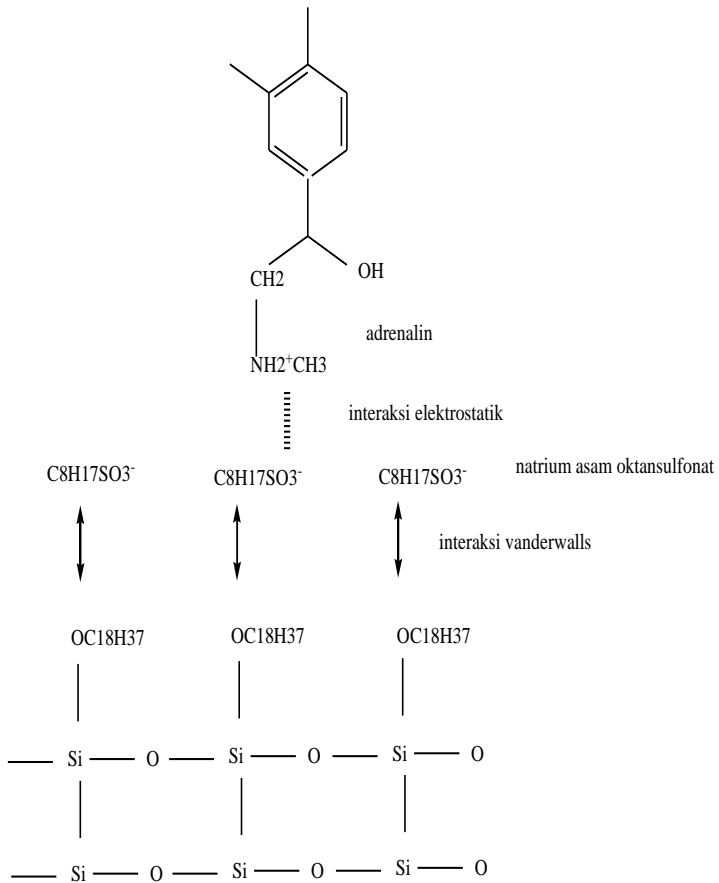
Berikut ini merupakan contoh penggunaan kromatografi pasangan ion.

Penentuan injeksi adrenalin dengan kromatografi menggunakan reagen pasangan ion anionic

Injeksi anestesi local sering mengandung adrenalin dengan konsentrasi rendah. Adrenalin dapat dianalisis dengan kromatografi normal, misalkan pada silica gel, akan tetapi biasanya memerlukan kondisi basa kuat yang mana pada kondisi ini gugus katekol dalam adrenalin bersifat tidak stabi. Adrenalin tidak tertahan dalam fase terbalik sehingga akan terelusi pada waktu retensi fase gerak (t_R). Satu teknik yang umum digunakan untuk analisis adrenalin dan amina-amina yang sangat larut air lain adalah kromatografi pasangan ion. Kromatografi pasangan ion dapat dilihat sebagai pembentukan kolom penukaran ion secara *in situ*. Natrium asam otasulfonat (SOSA) ditambahkan ke fase gerak (misal buffer natrium fosfat 0,1 M – methanol dengan perbandingan 9:1 yang mengandung SOSA 0,02%), SOSA terpartisi ke dalam fase diam lipofilik dan akan menjenuhkannya. Fase diam akan mampu menahan adrenalin melalui interaksi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

elektrostatik. Elusi terjadi melalui penggantian adrenalin dari pasangan ionnya dengan ion natrium, dan dengan berpindahnya (migrasi) pasangan ion sendirinya dalam fase gerak.



Gambar 15. Interaksi adrenalin dengan reagen pasangan ion yang dilapiskan pada permukaan ODS (Sumber: Gandjar 2012)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi dengan fase diam kiral

Pada pertengahan 1960, ahli kimia mulai menggunakan fase diam kiral pada kromatografi gas dan kromatografi cair untuk memisahkan isomer optik aktif (enansiomer). Walaupun digunakan pada kromatografi gas, tapi terbukti lebih cocok pada kromatografi lapis tipis kinerja tinggi atau kromatografi cair kinerja tinggi karena perbedaan konstanta distribusi suatu diastereomer menjadi kecil pada kenaikan suhu kolom kromatografi gas. Lebih jauh lagi, temperature kolom yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya rasemisasi dari fase diam kiral.

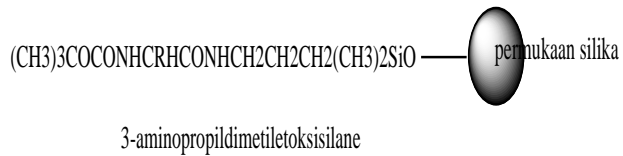
Terdapat 5 tipe fase diam kiral yang biasa digunakan pada kromatografi cair :

1. Fase diam kiral protein

Protein merupakan suatu polimer dengan BM besar yang tersusun oleh unit-unit kiral (L-asam amino). Sebagai suatu polimer kiral, maka protein akan dapat mengikat molekul enantiomer.

Fase diam kiral protein merupakan fase diam kiral yang pertama dikembangkan dan telah digunakan secara luas untuk pemisahan analit kiral. Fase diam ini menggunakan protein alam yang diikatkan pada matrik silica. Beberapa protein yang banyak digunakan pada fase diam kiral protein adalah *al acid glycoprotein* (AGP), *bovine serum albumin* (BSA) atau *ovomucoid* (OVM) yang dibuat dari putih telur. Selain itu suatu enzim (*cellohydrobiolase*) juga telah digunakan sebagai fase diam.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

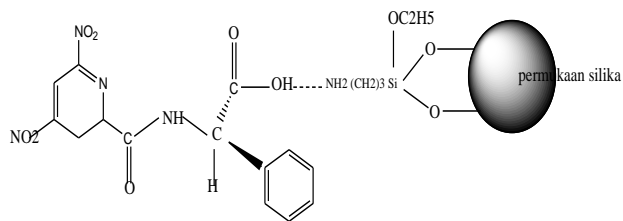


Gambar 15. Bentuk fase diam kiral protein

2. Fase diam kiral tipe *Pirkle*

Suatu senyawa kiral dengan BM kecil diikatkan pada silica, biasa disebut dengan fase *Pirkle*. Terdapat berbagai tipe dari fase diam ini yang telah digunakan untuk pemisahan senyawa kiral. Sebagai contoh adalah (R) dan (L) dinitrobenzoylphenylglycine yang diikatkan pada silica, fase diam ini sangat cocok untuk pemisahan 1- naptylmethylamide ibuprofen.

Pada tipe *Pirkle* senyawa kiral terikat secara kovalen terhadap permukaan silica, sehingga sebagai fase gerak dapat digunakan berbagai jenis pelarut, walaupun demikian tipe ini lebih cocok jika digunakan pelarut fase normal.



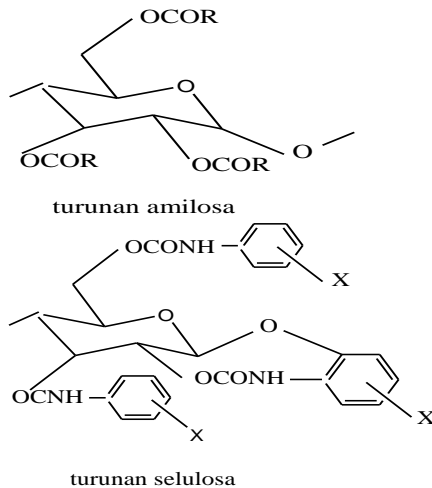
Gambar 16. Bentuk fase diam kiral tipe Parkle (dinitrobenzoylphenylglycine yang terikat pada silika)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3. Turunan Polimer selulosa / turunan polimer amilosa

Turunan polimer selulosa atau amilosa dilapiskan pada permukaan silica. Perbedaan dasar dari dua polimer ini terletak pada strukturnya, selulosa memiliki struktur linear sedangkan amilosa memiliki struktur helik. Selulosa dan amilosa keduanya sama-sama memiliki 5 unit pusat kiral. Untuk kepentingan ini, selulosa dan amilosa diderivatisasi menggunakan (3,5) - dimethylphenyl karbamat atau metylbenzil karbamat.

Karena polimer ini hanya dilapiskan dan tidak terikat secara kimia dengan silica maka pelarut yang bisa digunakan sebagai fase gerak sangat terbatas, biasanya adalah pelarut polar (campuran alcohol)

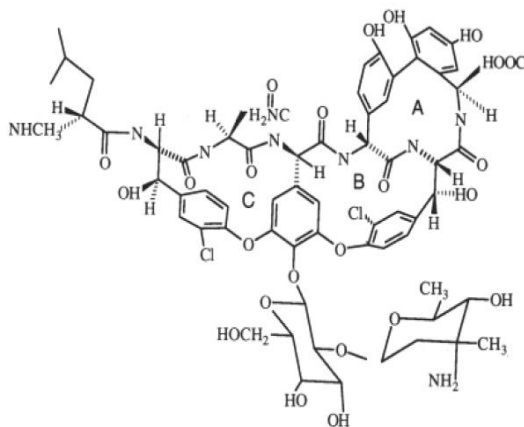


Gambar 17. Turunan amilosa dan selulosa

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4. Glikoprotein makrosiklik

Penggunaan glikoprotein makrosiklik sebagai fase diam kiral pertama kali diperkenalkan oleh Amstrong. Salah satu metoda yang digunakan untuk membuat fase diam ini adalah dengan mengikat vancomycin secara kovalen pada permukaan silica. Tipe fase diam kiral ini stabil dalam fase gerak yang mengandung (0-100%) pelarut organik.

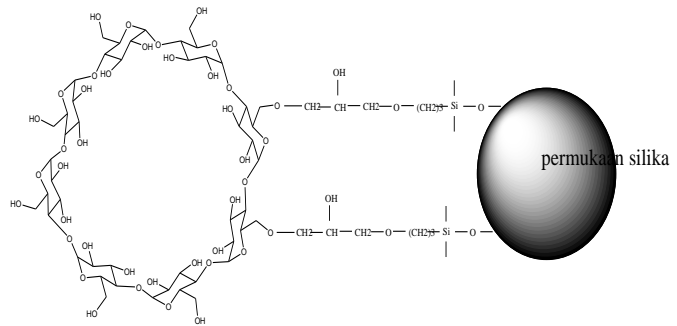


Gambar 18. Struktur vancomycin (Sumber: Beesley, 1998)

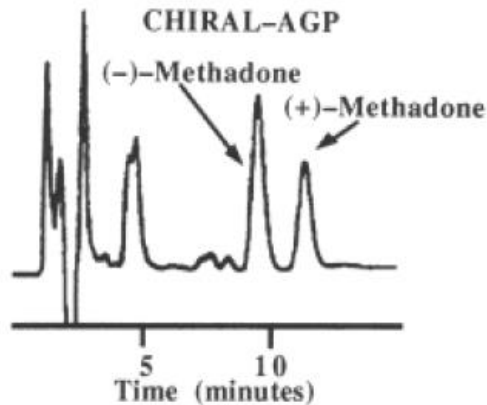
5. Siklodekstrin

Siklodekstrin merupakan molekul kiral yang memiliki 6 atau lebih residu glukosa dalam strukturnya. Untuk membuat tipe fase diam kiral siklodekstrin, molekul siklodekstrin diikatkan secara kimia pada permukaan silica.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 19. Fase diam kiral siklodekstrin



Gambar 20. Pemisahan enansiomer (-) methadone dan (+) methadone dengan fase diam kiral protein (Sumber: Beesley, 1998)

3.2 Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi adsorpsi atau kromatografi cair-padat adalah bentuk klasik dari kromatografi cair yang pertama diperkenalkan oleh Tswett pada awal abad 20. Pada saat sekarang ini, kromatografi adsorpsi telah diadaptasi dan menjadi bagian yang penting dari metoda KCKT. Fase diam yang digunakan pada

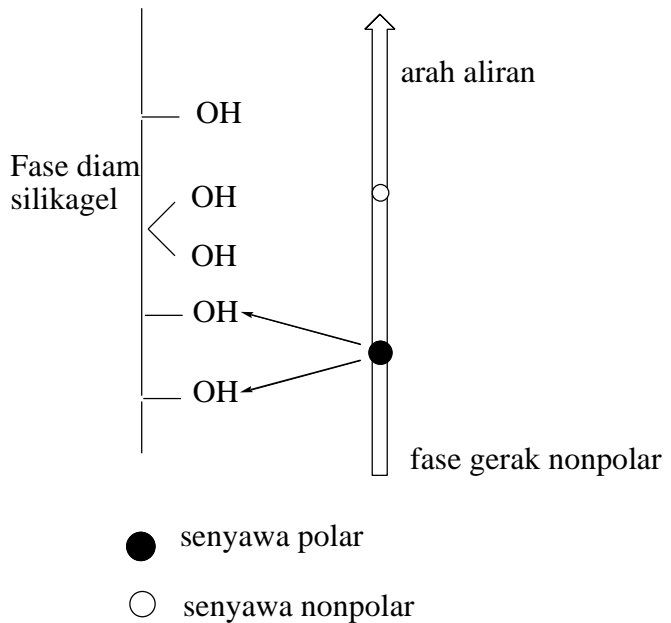
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

KCKT cair-padat adalah silica dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silica sebagai fase diamnya. Pada silica dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solute. Gugus silanol pada silica mempunyai reaktivitas yang berbeda, karenanya solute dapat terikat secara kuat sehingga dapat menyebabkan puncak yang berekor (*tailing*). Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silica atau alumina berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misal n-heksana ditambah dengan methanol.

Penambahan air atau pelarut polar lain harus dipertimbangkan secara matang. Jika terlalu sedikit yang ditambahkan maka kemungkinan belum mampu mengelusi solute, akan tetapi jika terlalu banyak akan menyebabkan kolom menjadi kurang aktif. Untuk memperoleh waktu retensi yang reproduisible, air yang ada di fase gerak dan ada di dalam penyerap harus dijaga konstan karena jika penyerap atau fase gerak menyerap air dari udara akan dapat menyebabkan waktu retensinya bergeser.

Pemilihan fase gerak pada kromatografi adsorpsi ini terbatas jika detector yang digunakan adalah spektrofotometer UV. Hal ini terkait dengan adanya nilai pemenggalan UV (*UV cut off*) pelarut-pelarut yang digunakan sebagai fase gerak. Solut-solut akan tertahan karena adanya adsorpsi pada permukaan gugus aktif silanol dan akan terelusi sesuai dengan urutan polaritasnya.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 21. Pemisahan pada kromatografi adsorpsi

Jenis KCKT ini kurang luas penggunaannya. Secara umum, kromatografi adsorpsi sangat cocok digunakan untuk pemisahan sampel yang larut dalam pelarut non polar dan sukar larut dalam pelarut air. Suatu kelebihan utama dari kromatografi adsorpsi yang tidak diberikan oleh metoda lainnya adalah kemampuannya membedakan antara campuran isomer struktur dan analit dengan gugus fungsi berbeda. Serangkaian senyawa yang homolog tidak dapat dipisahkan dengan kromatografi adsorpsi ini karena pada bagian solute yang nonpolar tidak dapat berinteraksi dengan permukaan adsorben yang polar

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3.3 Kromatografi pertukaran ion

Kromatografi Pertukaran ion adalah suatu metoda pemurnian menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Fase diam tersebut merupakan suatu matriks yang kuat (rigid), yang permukaannya mempunyai muatan, dapat berupa muatan positif maupun negatif. Mekanisme pemisahan berdasarkan pada daya tarik elektrostatik.

Metode ini banyak digunakan dalam memisahkan molekul protein (terutama enzim). Molekul lain yang umumnya dapat dimurnikan dengan menggunakan kromatografi pertukaran ion ini antara lain senyawa alkohol, alkaloid, asam amino, dan nikotin.

Kebanyakan mekanisme penukaran ion sederhana:



Dimana: X adalah ion analit

Y adalah ion fasa gerak

Pada kromatografi penukar anion ion analit X^- bersaing dengan ion fasa gerak Y^- , terhadap bagian ionik pada penukar ion R. Pemisahan ion sederhana berdasarkan pada perbedaan kekuatan interaksi ion terlarut dengan resina. Jika senyawa terlarut berinteraksi lemah dengan adanya ion fasa gerak, ion terlarut keluar awal pada kromatogram, sedangkan senyawa terlarut yang berinteraksi kuat dengan resina, berarti lebih kuat terikat dan keluar belakangan.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

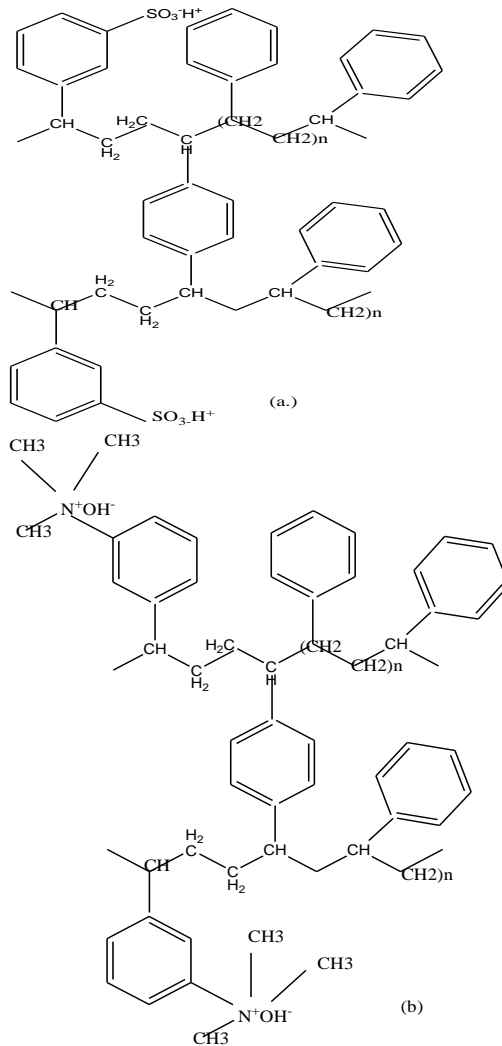
Fase diam

Ada banyak macam penukar ion, tetapi penukar ion polistiren resin merupakan penukar ion yang paling luas penggunaannya. Resina polistiren kering cenderung mengembang jika dimasukkan dalam pelarut. Air berpenetrasi ke dalam resin dan hidrasi, membentuk larutan sangat pekat dalam resin. Tekanan osmosa cenderung menekan air lebih banyak ke dalam resin dan padatan itu mengembang, jadi volumenya bertambah. Jumlah air yang diambil resina tergantung pada ion penukar dari resin dan menurun dengan bertambahnya jumlah ikatan silang. Resina penukaran ion juga mengembang dalam pelarut organik, tetapi pengembangannya lebih kecil daripada dalam air.

Fase Gerak

Kebanyakan pemisahan kromatografi penukar ion dilakukan dalam media air sebab sifat ionisasi dari air. Dalam beberapa hal, digunakan pelarut campuran seperti air, alkohol dan juga pelarut organik. Kromatografi penukar ion dengan fase gerak media air, retensi puncak dipengaruhi oleh kadar garam total atau kekuatan ionik dan oleh pH fasa gerak. Kenaikkan kadar garam dalam fasa gerak menurunkan retensi senyawa cuplikan. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan ion cuplikan bersaing dengan ion fasa gerak untuk gugus penukar ion pada resin.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 22. (a). Resin penukar kation bersifat asam kuat (mengandung gugusan HSO_3) (b). Resin penukar anion (Sumber: Gandjar, 2012)

3.4 Kromatografi Eklusi

Kromatografi eksklusi adalah suatu kromatografi kolom yang proses pemisahannya didasarkan atas ukuran partikel solute. Kromatografi eksklusi dapat digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dari senyawa lain yang mempunyai berat molekul lebih rendah atau tinggi, atau untuk memisahkan molekul-molekul yang mempunyai berat molekul sama tetapi diameter berbeda.

Sebagai fase diam pada kromatografi eksklusi digunakan partikel-partikel yang mempunyai pori dengan berbagai macam ukuran. Partikel solute yang besar dari pori tidak akan dapat memasuki pori dan akan ke luar sebagai puncak yang pertama pada kromatogram. Sedangkan solute yang mempunyai diameter efektif lebih kecil dari diameter pori akan memasuki pori dan akan muncul lebih lambat pada kromatogram.

Dua tipe bahan sebagai fase diam yang digunakan dalam kromatografi ini ialah gel dari senyawa organik (polimer, dan silica gel yang mudah berinteraksi dengan polimer. Fase diam yang lebih banyak digunakan adalah senyawa kopolimer dari stiren dan divinilbenzen yang tidak disertai gugus ionik sulfonat dan amina seperti pada fase diam penukar ion.

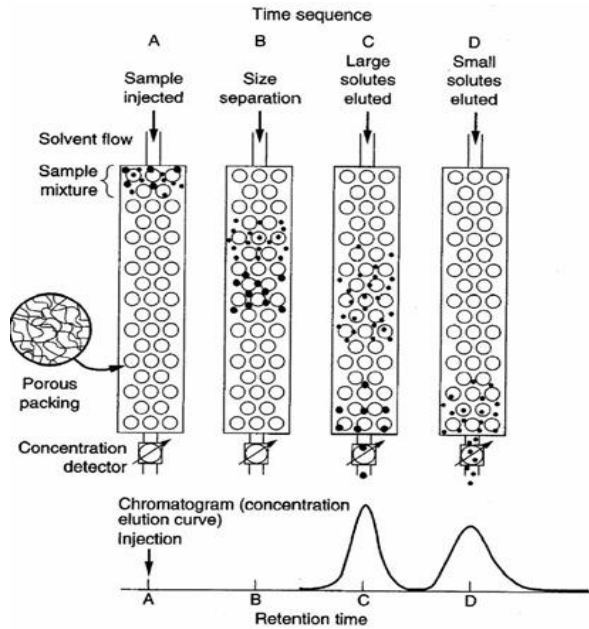
Porositas yang terjadi tergantung pada terjadinya interaksi silang antara dua senyawa tersebut. Berdasar atas struktur tersebut maka fase diam bersifat hidrofobik, akan tetapi dengan memasukkan gugus sulfonat, atau poliakrilik, maka fase diam akan menjadi hidrofilik sehingga dapat juga digunakan untuk memisahkan molekul yang larut dalam air seperti polisakarida. Berikut adalah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

beberapa fase diam yang dapat digunakan pada kromatografi eksklusi.

1. Sphadex, umumnya digunakan untuk pemisahan protein. Bahan disintesis dari polisakarida seperti dekstran. Adanya residu gugus hidroksil menyebabkan dekstran menjadi polar, sehingga dapat direaksikan dengan epiklorhidin $\text{CH}_2(\text{O})\text{CHCHCl}_2$. Polimer yang terjadi dapat dikontrol dengan penambahan asam.
2. Bio-Gel, golongan yang bersifat inert dinamakan Bio-Gel P, yang dibuat dengan kopolimerisasi dari akrilamida dan N-N' metil bis-akrilamid. Senyawa ini tidak larut dalam air maupun beberapa pelarut organik.
3. Agarosa digunakan untuk pemisahan senyawa berbobot molekul > 500.000 , dinamakan juga Bio-Gel A. Dibuat dari poligalaktopiranososa, sehingga agak lunak dan tidak tahan tekanan tinggi.
4. Stiragel, digunakan untuk pemisahan senyawa yang tidak larut sama sekali dalam air dan menggelembung (swelling) dalam pelarut organik. Stiragel dibuat dari polistiren yang tahan pada suhu di atas 150°C . Berat molekul senyawa yang dapat dipisahkan antara $16.000 - 40.000$ dalton.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 23. Skema pemisahan analit berdasarkan ukuran molekulnya dengan kromatografi eksklusi, A = waktu injeksi sampel , B = terjadinya pemisahan di dalam kolom berdasarkan ukuran molekul, C = analit dengan ukuran besar keluar lebih duluan, D = analit dengan ukuran molekul kecil lebih lama berada dalam kolom (Sumber: Johnson, 1977)

Kromatografi eksklusi dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan pada fase geraknya yaitu; kromatografi gel filtrasi (bila fase gerak air) dan kromatografi permiasi gel (bila fase gerak adalah pelarut organik).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Latihan

1. Tuliskan definisi dari beberapa istilah berikut:
 - a. Kemasan fase terikat
 - b. Kemasan fase terbalik
 - c. Kemasan fase normal
 - d. Kromatografi pasangan ion
 - e. Kromatografi kiral
2. Jelaskan tipe kromatografi cair dan prinsip pemisahan dari masing-masing tipe tersebut
3. Bagaimana pembagian dari kromatografi partisi berdasarkan pada tipe kemasan kolom dan jelaskan kenapa system cair-cair tidak dapat digunakan pada elusi system gradient
4. Sebutkan fase diam yang biasa digunakan pada kromatografi partisi fase normal, partisi fase terbalik, penukar ion dan eksklusi
5. Tentukan tipe kromatografi yang cocok untuk memisahkan campuran berikut:
 - a. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ dan $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 - b. Ba^{2+} dan Sr^{2+}
 - c. $\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}$ dan $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$
 - d. glukosida dengan BM besar

BAB IV INSTRUMENTASI KCKT

Setelah mempelajari Bab ini diharapkan mahasiswa dapat memahami instrumentasi, persyaratan fase gerak, sistem elusi, penyiapan kolom, dan detector pada KCKT

Kolom kromatografi pada KCKT biasanya dikemas menggunakan partikel berukuran sangat kecil (2 sampai 10 μm), sehingga untuk memudahkan aliran eluent diperlukan pompa dengan tekanan sampai ribuan pounds per inci. Sebagai konsekuensinya, peralatan yang dibutuhkan cenderung lebih rumit dan lebih mahal dibandingkan dengan peralatan pada kromatografi jenis lainnya.

4.1 Reservoir fase gerak dan system *treatment* pelarut

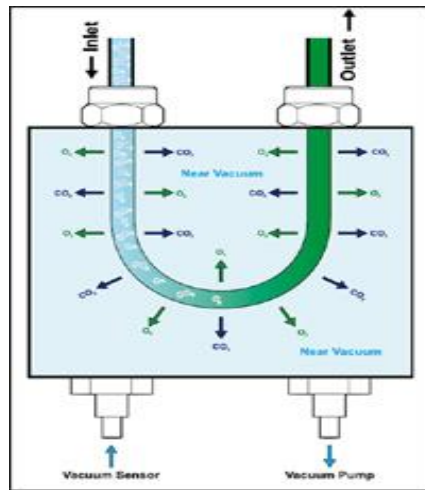
Peralatan KCKT modern dilengkapi dengan satu atau beberapa reservoir pelarut yang terbuat dari kaca atau stainless steel yang mampu memuat 200 sampai 1000 mL pelarut. Reservoir dilengkapi dengan suatu alat *degasser* yang dapat menghilangkan gas terlarut pada fase gerak (biasanya oksigen dan nitrogen) yang mengganggu analisis karena dapat membentuk gelembung pada kolom dan system detector. *Degasser* terdiri dari suatu pompa vakum, system destilasi, alat pemanas dan suatu system pengaduk pelarut.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 24. Seperangkat alat KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

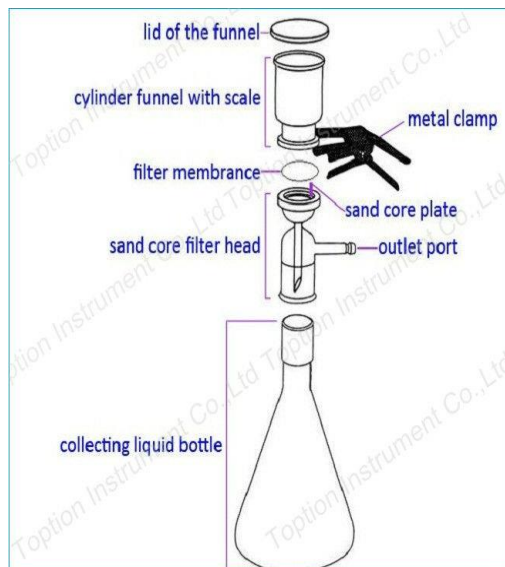


Gambar 25. Prinsip kerja degasser dan alat degasser

Reservoir juga dilengkapi dengan penyaring milipore yang mampu menyaring partikel-partikel halus pada pelarut. Hal ini penting karena partikel halus dapat menimbulkan kerusakan (menyumbat) system injector, pompa dan juga kolom. Biasanya sebelum dimasukkan ke dalam reservoir pelarut fase

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

gerak disaring dengan penyaring milipore dalam kondisi vakum.



Gambar 26. Seperangkat alat penyaring

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk KCKT fase normal (fase diam KCKT lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk KCKT fase terbalik (fase diam kurang polar dibanding fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut.

Pemilihan fase gerak didasarkan pada kriteria berikut :

1. Viskositas.
Pelarut dengan viskositas rendah menghasilkan tekanan yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut dengan viskositas tinggi pada suatu kecepatan alir tertentu. Viskositas rendah juga memungkinkan kromatografi yang lebih cepat karena perpindahan masa berlangsung lebih cepat. Viskositas (dinamik) suatu pelarut dinyatakan dalam milipascal detik (mPa s)
2. Transparansi terhadap UV
Jika detector yang digunakan adalah detector UV, maka fase gerak harus transparan secara sempurna pada panjang gelombang yang digunakan. Sebagai contoh etil asetat tidak sesuai untuk deteksi di 254 nm karena etil asetat tidak sepenuhnya transparan sampai panjang gelombang 275 nm (kurang dari 10% absorpsi). Transparansi garam-garam buffer, reagen-reagen pasangan ion, dan bahan-bahan tambahan lain juga harus dipertimbangan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3. Indeks bias
Jika detector yang digunakan adalah detector indeks bias, maka perbedaan indeks bias antara pelarut dengan sampel harus besar.
4. Titik didih
Titik didih fase gerak yang rendah diperlukan jika eluat akan dilakukan pemrosesan lebih lanjut supaya memudahkan dalam penguapannya. Di satu sisi, pelarut-pelarut dengan tekanan uap yang tinggi (yang berarti titik didihnya tinggi) pada suhu kamar cenderung menimbulkan gelembung-gelembung uap dalam detektor
5. Kemurnian
Tidak adanya senyawa lain yang mengganggu analisis
6. Lambam (inert)
Fase gerak tidak boleh bereaksi dengan campuran analit. Jika sampel yang dianalisis sangat peka terhadap oksidasi, maka fase gerak dapat ditambah senyawa-senyawa antioksidan seperti 2, 6-di-ter-buti-p-kresol (BHT) dengan konsentrasi 0,05%. BHT dapat dihilangkan secara cepat dari eluen dengan penguapan, akan tetapi BHT menyerap di daerah UV di bawah 285 nm
7. Toksisitas
Penggunaan pelarut toksik harus dihindarkan. Pelarut-pelarut terklorinasi dapat melepaskan gas fosge yang sangat toksik.
8. Harga

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran buffer dengan methanol atau campuran air dengan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran hidrokarbon dengan pelarut yang terklorinasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alcohol.

4.2 Pompa

Berbagai pompa tersedia untuk kromatografi cair. Semuanya dirancang untuk mendorong berbagai pelarut melalui kolom yang dikemas rapat. Karena tekanan kolom terhadap aliran tinggi maka pompa harus bekerja pada tekanan tinggi, sering kali lebih besar dari 1000 psi.

Beberapa persyaratan sistem pompa KCKT :

1. Mamberikan tekanan yang tinggi
2. Bebas dari pulsa
3. Memberikan kecepatan aliran 0,1 – 10 ml/menit
4. Aliran terkontrol dengan reproduibilitas kurang dari 0,5%
5. Tahan karat, oleh karena itu seal pompa terbuat dari bahan baja atau teflon
6. Dapat memberikan aliran sistem isokratik maupun gradient

Terdapat 2 jenis pompa yang banyak digunakan dalam KCKT

1. Pompa tekanan tetap (*constant pressure*)
 - a. Pompa tekanan langsung

Pada pompa jenis ini, gas bertekanan tinggi didesak ke dalam bagian atas pompa. Gas ini mendesak eluen dalam tabung ke atas. Pompa tekanan langsung adalah jenis pompa yang paling murah. Kekurangan utamanya ialah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

bahwa gas melarut dalam pelarut. Jika pelarut yang jenuh mencapai detektor, banyaknya gas yang terlarut dalam pelarut lebih besar daripada banyaknya gas yang setimbang pada tekanan detektor. Hal ini sering sekali menyebabkan terjadinya gelembung gas dalam sel detektor, yang menimbulkan noise yang berlebihan pada detektor. Karena adanya masalah yang berkaitan dengan gas yang terlarut dalam eluen, tekanan kerja maksimum pompa tekanan langsung biasanya sekitar 1000 psi.

b. Pompa tekanan tetap menengah

Pompa ini lebih mahal sedikit daripada pompa tekanan langsung, tetapi banyak dipakai pada kromatografi cair. Pompa ini tidak dapat membentuk elusi gradient. Sebaliknya pompa ini mampu menghasilkan laju aliran yang sangat tinggi yang diperlukan dalam pemakaian preparatif.

2. Pompa pendesakan tetap (*constant displacement*)

a. Pompa bolak-balik (*reciprocating pump*)

Keuntungan utama pompa bolak-balik adalah harganya murah. Selain itu tendon pelarut dapat lebih besar dari pada tendon pelarut yang terdapat pada pompa tekanan tetap atau pompa semprit pendesakan tunggal. Akan tetapi pompa bolak balik mempunyai beberapa kekurangan. Pompa ini tampaknya mudah berongga (atau hilang tenaganya) jika memakai pelarut yang mudah menguap. Hal ini dapat membatasi kegunaannya dengan pelarut seperti metilena klorida, etil eter atau pentana. Masalah lain pada pompa bolak-balik

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

adalah jika pengedap torak aus, partikel bahan pengedap dapat masuk ke katup pengendali. Selain itu pendenyutan yang disebabkan oleh pompa bolak-balik terdeteksi sebagai garis alas yang berubah-ubah.

- b. Pompa pendesakan tunggal (pompa syringe)
Pompa syringe menghasilkan aliran pelarut yang seragam melalui kolom dan ke detektor, dan ini menghasilkan noise terendah pada detektor yang peka terhadap aliran. Selain itu pompa dapat dengan mudah digunakan pada sistem gradien.

Sistim Elusi KCKT

Sistim pompa KCKT sudah diprogram untuk dapat melakukan elusi dengan satu macam pelarut atau lebih. Terdapat dua sistem elusi pada KCKT yaitu :

1. Sistim elusi isokratik

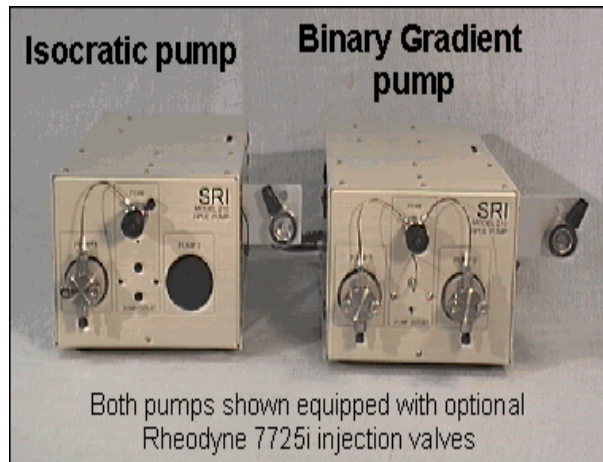
Elusi isokratik didefinisikan sebagai suatu system elusi dimana kekuatan fase gerak dibuat tetap dari awal sampai akhir analisis. Pada sistim ini elusi dilakukan dengan satu macam pelarut pengembang atau lebih dari satu macam pelarut pengembang dengan perbandingan yang tetap. Misalnya metanol : air = 50% ; 50% v/v.

2. Sistim elusi gradien

Elusi gradient didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Sistem elusi gradient dapat mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat dalam kolom. Pada sistim ini elusi dilakukan dengan pelarut pengembang campur yang

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

perbandingannya berubah dalam waktu tertentu. Misalnya metanol : air = 40% : 60% v/v dengan kenaikan kadar metanol 8% setiap menit. Gradien dapat dihentikan sejenak atau dilanjutkan.

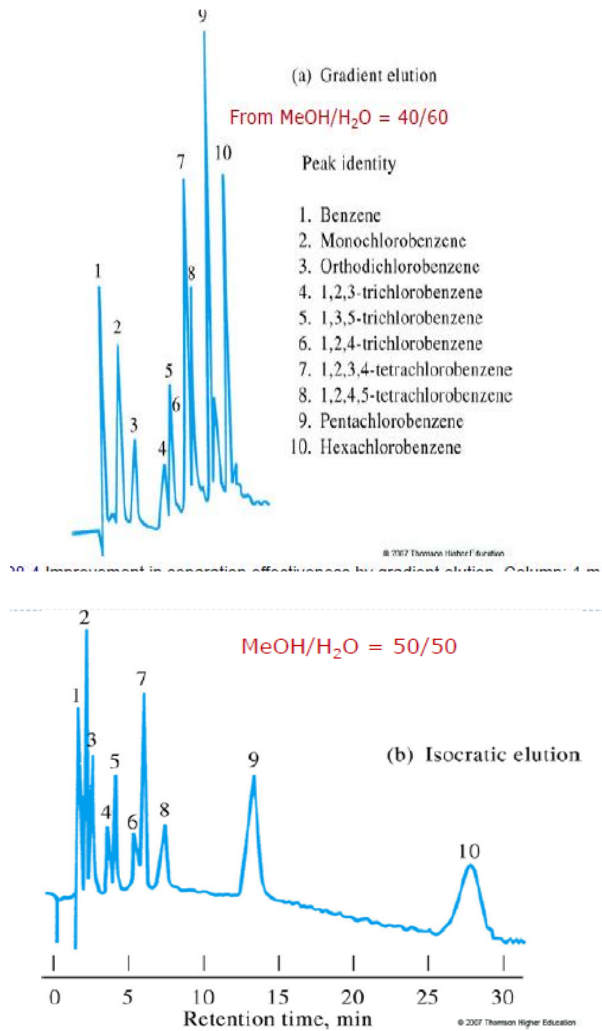


Gambar 27. Pompa isokratik dan gradient

Keuntungan elusi gradient adalah sebagai berikut:

1. Mempersingkat total waktu analisis
2. Meningkatkan resolusi persatuan waktu tiap senyawa
3. Memberikan peak yang tajam (ramping)
4. Meningkatkan sensitivitas

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 28. Pola kromatogram pemisahan campuran benzene terklorinasi dengan pelarut isopropanol (a) dengan system elusi gradient dan (b) elusi isokratik menggunakan kolom Permaphase® ODS (Sumber: Skoog, 1998)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4.3 Injektor

Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda KCKT merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat. Kedaan ini akan menjadi suatu keharusan jika yang dituju adalah analisis kuantitatif dengan KCKT. Terdapat tiga tipe dasar injector yang bias digunakan dalam KCKT.

4.3.1 Injektor septum

Penyuntikan cuplikan dengan memasukkan cuplikan itu ke dalam syringe dan menusukkan jarum syringe melalui septum elastomer merupakan cara penyuntikan pada kolom yang paling sederhana. Injektor septum pada kromatografi cair merupakan injektor paling murah, tetapi memerlukan perhatian yang lebih. Septum berkontak dengan pelarut bertekanan tinggi, karena itu kita harus memilih bahan septum yang tidak termakan oleh pelarut.

4.3.2 Penyuntikan aliran henti

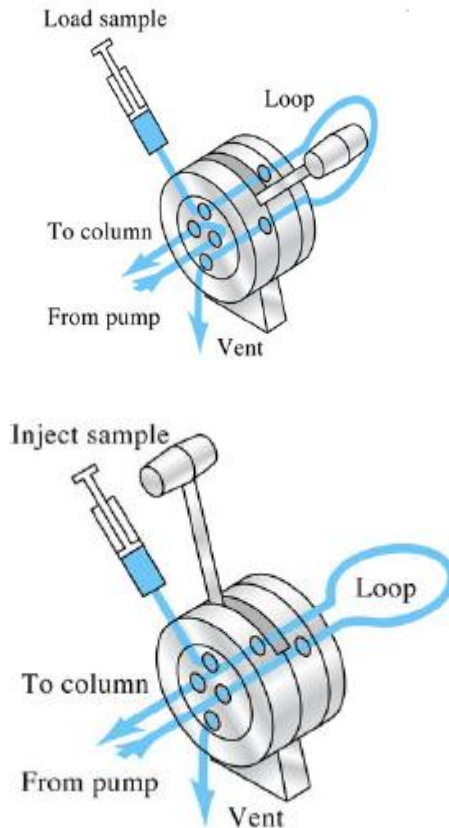
Penyuntikan pada bagian atas kolom menghasilkan kromatografi yang sangat efisien. Injektor aliran henti dirancang untk memungkinkan penempatan cuplikan langsung pada bagian atas (pangkal) kolom. Volum penyuntikan harus kecil untuk mencegah agar proses kromatografi tidak dimulai dengan pita yang lebar.

4.3.3 Katup kitar atau pipa dosis (*loop valve*)

Prinsip kerja katup kitar, dimana pada saat awal sampel akan masuk memenuhi volume loop terlebih dahulu dan akhirnya segera masuk menuju kolom pemisahan dengan volume yang tidak berkurang sedikitpun. Pada saat sampel diinjeksikan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

maka sampel tidak langsung masuk ke dalam kolom, tapi akan memenuhi pipa dosis, terlebih dahulu. Pipa dosis ini mempunyai ukuran volum yang bermacam-macam dari 5 ul – 2000ul. Volum sampel yang diinjeksikan sebaiknya 5 kali dari volum pipa dosisnya.



Gambar 29. Loop sampel untuk HPLC

Autoinjektor

Autoinjektor mempunyai cara kerja yang hampir sama dengan cara kerja sistem injeksi dengan menggunakan pipa dosis. Keuntungan sistem ini adalah volume yang

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

diinjeksikan tidak akan berkurang selama proses injeksi dan mampu memisahkan sampel-sampel dalam jumlah yang banyak dan waktu yang singkat.

4.4 Kolom

Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen – komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Kolom KCKT dibuat dalam bentuk lurus yang dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga H minimal.

Kolom umumnya dibuat dari stainless steel, dengan bentuk lurus dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar. Kolom dapat dipanaskan agar dihasilkan pemisahan yang lebih efisien, akan tetapi suhu di atas 60° jarang digunakan, karena dapat menyebabkan terjadi penguraian fase diam ataupun penguapan fase gerak pada suhu yang lebih tinggi tersebut. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan (Liquid Solid Chromatography, LSC; Liquid Liquid Chromatography, LLC; Ion Exchange Chromatography, IEC, Exclusion Chromatography, EC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 30. Kolom KCKT

Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu

1. Kolom analitik

Kolom analitik digunakan untuk penentuan jenis dan jumlah analit yang diperiksa. Ditinjau dari ukurannya (panjang dan diameternya) kolom KCKT dibagi menjadi beberapa bagian sebagaimana terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Macam-macam kolom KCKT

| Jenis kolom | Panjang (cm) | Diameter (mm) | dp (um) |
|-------------------|--------------|---------------|---------|
| Konvensional | 10 – 20 | 4,5 | 10 |
| <i>Microbore</i> | 10 | 2,4 | 5 |
| <i>High Speed</i> | 6 | 4,6 | 3 |

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kolom mikrobor/High Speed mempunyai 3 keuntungan yang utama dibanding dengan kolom konvensional, yaitu:

1. Jumlah fase gerak yang dibutuhkan pada pemisahan menggunakan kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fase gerak lebih kecil (10 -100 $\mu\text{l}/\text{menit}$).
2. Aliran fase gerak yang lebih kecil membuat kolom mikrobor lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.
3. Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat, karenanya jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

Meskipun demikian, dalam prakteknya, kolom mikrobor ini tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin.

Adapun tujuan kolom dibuat dengan diameter internal sangat kecil (kolom mikro) adalah sebagai berikut:

1. Kepekaan menjadi lebih teliti
2. Mencegah difusi fase gerak
3. Memperluas kemampuan detector
4. Sampel yang dianalisis sedikit

Sedangkan tujuan kolom dibuat pendek (high speed) adalah:

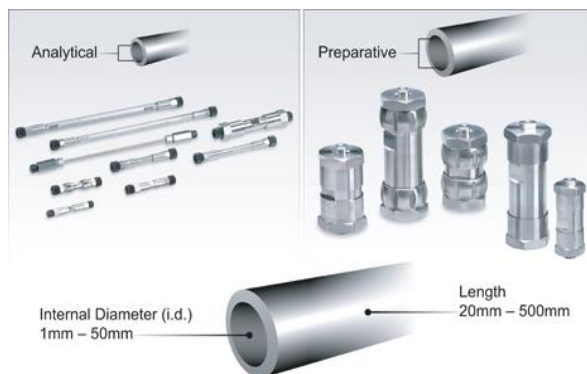
1. Menghasilkan resolusi yang baik
2. Memperkecil harga diameter rata-rata partikel fasa diam
3. Waktu retensi (t_R) menjadi singkat

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kolom mikro / high speed dengan $dp = 5$ dan $dp = 3$ harus diperhatikan lebih teliti dibandingkan dengan kolom konvensional $dp = 10$, sebab sela-sela partikel lebih mudah tertutup oleh kotoran. Jadi harus seringkali dicuci dan kemurnian fase gerak harus dijaga.

2. Kolom Preparatif

Kolom preparative digunakan untuk memisahkan komponen-komponen analit dalam jumlah besar. Biasanya pada kromatografi preparative kita dapat mengumpulkan tiap-tiap eluate yang keluar dari kolom. Karena sampel yang dipisahkan pada kromatografi preparative biasanya dalam jumlah yang relative lebih besar, maka kolom preparative biasanya juga memiliki diameter dalam dan panjang relative lebih besar dari kolom analitik. Umumnya kolom preparative memiliki diameter dalam 6 mm atau lebih dan panjang 25-100 cm



Gambar 31. Perbedaan diameter dan panjang dari kolom analitik dan kolom preparative

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kolom pelindung/ *guard column* (pre-kolom)

Kolom pelindung merupakan suatu kolom dengan ukuran pendek (5 cm), yang dikemas dengan kemasan yang sama dengan kolom analitik. Kolom pelindung diletakkan pada bagian hulu kolom analitik. Kolom pelindung dapat memperpanjang umur dari kolom analitik, adanya bahan-bahan yang dapat terikat secara irreversible pada kolom analitik dapat menyebabkan kolom analitik tidak dapat digunakan lagi, dengan adanya kolom pelindung maka senyawa – senyawa tersebut diikat oleh kolom pelindung sehingga tidak masuk ke dalam kolom analitik. Kolom pelindung juga dapat membantu penjenuhan fase diam oleh fase gerak, sehingga dapat mencegah pengikisan fase diam oleh fase gerak.



Gambar 32. Kolom pelindung (*guard column*)

4.5 Detektor

Suatu detektor dibutuhkan pada KCKT untuk mendeteksi adanya komponen analit (analisis

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

kualitatif) yang berhasil dielusi dari dalam kolom dan menentukan kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor pada KCKT dikelompokkan dalam 2 golongan yaitu :

1. Berdasarkan pengukuran diferensial suatu sifat yang dimiliki baik oleh molekul sampel maupun fase gerak (bulk property detector).

Detektor ini dapat dibedakan menjadi:

- a. Detektor Indeks Bias
Detektor indeks bias merupakan detektor yang juga luas penggunaannya setelah detektor ultraviolet. Dasarnya ialah pengukuran perbedaan indeks bias fase gerak murni dengan indeks bias fase gerak yang berisi komponen sampel, sehingga dapat dianggap sebagai detektor yang universal pada HPLC. Detektor ini kurang sensitif dibanding dengan detektor ultraviolet dan sangat peka terhadap perubahan suhu.
 - b. Detektor konduktivitas
 - c. Detektor tetapan dielektrika
2. Berdasar pengukuran suatu sifat yang spesifik dari molekul sampel (disebut solute property detector) seperti penyerapan sinar UV, fluoresensi dll.

Secara umum detektor yang ideal untuk kromatografi cair harus memiliki semua karakteristik berikut :

- a. Memiliki sensitifitas yang memadai. Kisaran umum sensitifitas berkisar dari 10^{-8} hingga 10^{-15} gram zat terlarut per pembacaan
- b. Stabil dan memiliki keterulangan yang baik
- c. Respon yang linear terhadap kenaikan konsentrasi
- d. Waktu respon yang singkat
- e. Kemudahan pada penggunaan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

- f. Memiliki volume internal yang kecil untuk mengurangi pelebaran puncak

4.5.1 Detektor UV-Vis

Detektor UV merupakan detector yang paling banyak digunakan sebagai detektor pada HPLC. Detektor UV memiliki sensitivitas dan reliabilitas yang baik serta cocok digunakan pada banyak golongan analit, meskipun faktanya detector UV kurang sensitive terhadap senyawa-senyawa non polar dan senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor. Pada umumnya analit menyerap sinar UV pada panjang gelombang 200-350^oA, analit ini biasanya memiliki satu atau lebih ikatan rangkap (elektron π) atau semua analit yang memiliki electron sunyi (olefin, aromatik dan semua senyawa yang mengandung gugus fungsi -CO, -CS,N=O dan N=N)

Hubungan antara kosentrasi analit dan besarnya sinar yang ditransmisikan sel diberikan oleh hukum Beer

$$I_T = I_0 e^{-kLc}$$

Dimana :

I_0 = Intensitas sinar datang

I_T = Intensitas sinar yang diteruskan

L = panjang sel

c = kosentrasi analit

k = konstanta ekstingsi Molar analit untuk panjang gelombang tertentu UV

atau

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

$$\ln I_T = \ln I_0 - kLc$$

Sehingga

$$I_T = I_0 10^{-kLc}$$

Dari persamaan diatas terlihat bahwa sensitivitas detector ditentukan oleh besarnya koefisien ekstingsi molar analit pada panjang gelombang yang digunakan. Sehingga kosentrasi minimum yang masih bisa dideteksi (LOD) dapat berubah sesuai dengan panjang gelombang sumber sinar yang digunakan. Sensitivitas detector juga ditentukan oleh panjang sel yang digunakan. Tetapi penambahan panjang sel tidak bisa dilakukan untuk meningkatkan sensitivitas, karena sel yang panjang akan berakibat terjadinya pelebaran puncak yang berlebihan sehingga akan menurunkan resolusi.

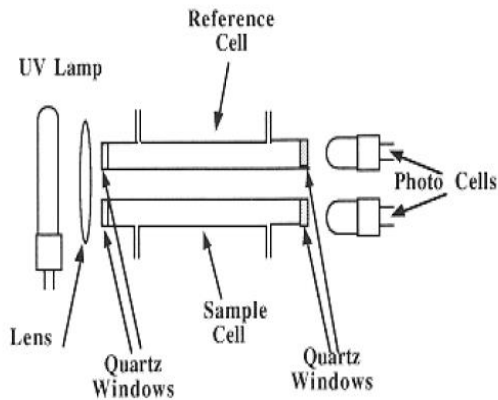
Ada 2 tipe detektor UV-Vis yang dapat digunakan yaitu :

a. Detektor *Fixed Wavelength*

Detektor ini terdiri dari sel silinder kecil (dengan volume 2 – 10 uL) yang dilewati oleh aliran eluent dari kolom. Sinar UV melewati sel dan jatuh pada sensor UV photo elektrik. Panjang gelombang cahaya tergantung pada jenis lampu yang digunakan. Tersedia beberapa jenis lampu yang dapat memberikan sinar UV pada panjang gelombang 210 - 280 nm. Sumber sinar yang paling populer adalah lampu uap mercury, karena lampu uap mercury dapat memancarkan sinar dengan panjang gelombang dimana banyak analit dapat dianalisis pada panjang gelombang tersebut. *Fixed Wavelength* adalah detektor yang

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

relative murah harganya dimana detector ini beroperasi pada satu panjang gelombang tertentu dengan intensitas sinar yang sangat tinggi sehingga detector ini memiliki sensitivitas intrinsic lebih baik dari pada detector *Multiply Wavelength*.



Gambar 33. Diagram Detektor UV *Fixed Wavelength* (Sumber: Skoog, 1998)

b. Detektor *Multy Wafelanght*

Pada detektor ini langsung dilakukan penghambatan pada rentang 3 panjang gelombang sekaligus, yaitu panjang gelombang analitik, konfirmasi dan pembanding sehingga dapat mempercepat proses deteksinya pada rentang spektrum yang luas dan lebih untuk deteksinya.

Photodiode Array

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Walaupun detektor UV absorpsi banyak dipakai, namun karena analit yang diukur banyak maka cenderung timbul kemungkinan akan adanya puncak-puncak kromatogram yang tidak terdeteksi dan terjadi pergeseran puncak-puncak kromatogram.

Beberapa kemampuan detektor *Photodiode Array*

Pemeriksaan kemurnian puncak

Pemeriksaan kemurnian puncak ini penting sekali untuk riset kontrol dengan memakai metode kromatografi, kemurnian puncak-puncak kromatogram akan sulit bila hanya dilakukan pemeriksaan pada puncak-puncak kromatogramnya saja. Untuk menanggulangi hal ini perlu dilakukan juga pemeriksaan spektra UV-Vis dari puncak analit.

Kemurnian puncak tidak hanya membandingkan puncak-puncak kromatogram saja karena puncak-puncak kromatogram dan harga waktu tambat banyak sekali variasinya dan dipengaruhi oleh beberapa faktor dalam analisis.

Spektrum KCKT dengan satu panjang gelombang tidak dapat dipakai untuk menentukan kemurnian puncak kromatogram. *Photodiode Array* adalah detektor yang sangat memadai untuk mengetahui validitas puncak kromatogram suatu analit.

Analisa kuantitatif terhadap dua zat yang memberikan puncak tidak terpisah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Detektor UV dengan satu maupun dua panjang gelombang sama sekali tidak akan mampu menentukan kadar dua komponen yang puncaknya tidak terpisah. Teknik pemisahan dua puncak yang tidak terpisahkan dapat dilakukan dengan dua macam cara apabila digunakan detektor *Photodiode Array* yang dilakukan pada rentang panjang gelombang 200 – 650 nm

A. Teknik penghapusan puncak

Dengan teknik ini penentuan kadar dilakukan secara bergantian terhadap puncak yang tidak terpisah setelah dilakukan penghapusan puncak secara bergantian. Penghapusan puncak terhadap satu puncak dilakukan dengan jalan memakai panjang gelombang maksimum dan panjang gelombang acuan (*reference*).

B. Teknik perbandingan terkontrol

Teknik ini memakai nilai perbandingan dua sinyal pada dua panjang gelombang. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang maksimum dan panjang gelombang minimum.

Penampilan kromatogram dua dan tiga dimensi

Penampilan kromatogram tiga dimensi hanya mungkin dilakukan oleh KCKT yang memakai detektor *Photodiode Array*. Keuntungan penampilan kromatogram tiga dimensi ini akan sangat membantu untuk menentukan kemurnian puncak kromatogram.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4.5.2 Detektor Fluoresensi

Banyak senyawa yang mampu mengabsorpsi radiasi UV dan kemudian mengeluarkan suatu radiasi emisi pada panjang gelombang yang lebih jauh. Emisi dapat terjadi pada saat itu juga yang disebut peristiwa “fluoresensi” ataupun pada saat yang tertunda yang disebut sebagai peristiwa “fosforisensi”.

Senyawa-senyawa yang mempunyai sifat pendar fluor secara alamiah mempunyai struktur siklis yang terkonjugasi, misalnya hidrokarbon aromatis polisiklis. Senyawa yang tidak berpendar fluor dapat juga dirubah menjadi senyawa yang berpendar fluor dengan mereaksikan suatu reagen tertentu.

Kelebihan detektor fluor dari pada detektor lainnya :

- batas deteksi lebih rendah yaitu 1 pg
- lebih selektif dan sensitif
- lebih baik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif

Kelemahan detector ini adalah terkait dengan rentang linieritasnya yang sempit yakni antara 10 – 100. Pemilihan fase gerak pada deteksi dengan fluoresensi ini sangat penting karena karena fluoresensi sangat sensitive terhadap peredam fluoresensi. Pelarut-pelarut yang sangat polar, buffer-bufer, dan ion-ion halide akan meredam fluoresensi. pH fase gerak juga juga penting terkait dengan efisiensi fluoresensi. Sebagai contoh kinin dan kuinidin hanya menunjukkan fluoresensi dalam medium yang sama, sementara oksibarbiturat akan berfluoresensi dalam medium yang bersifat basa.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4.5.3 Detektor Elektro Kimia

Banyak senyawa organik dapat dioksidasi atau direduksi secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Arus yang dihasilkan pada proses ini dapat diperkuat hingga memberikan respon yang sesuai. Kepekaan detector elektrokimia pada umumnya tinggi. Detektor elektrokimia yang paling banyak digunakan adalah detector konduktivitas dan detector amperometri.

Fase gerak yang digunakan ketika menggunakan detector ini harus mengandung elektrolit pendukung sehingga fase geraknya harus yang bersifat polar. Keuntungan detector ini adalah terkait dengan kepekaannya yang tinggi. Pendeteksian jenis ini telah digunakan, misalnya untuk neurotransmitter dan metabolit mereka di dalam fluida ekstra seluler dari jaringan otak hewan.

4.5.4 Detektor Indeks Bias

Detektor indeks bias merupakan detector yang bersifat universal yang mampu memberikan respon (signal) pada setiap zat terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase gerak). Kelemahan yang utama detector ini adalah bahwa indeks bias dipengaruhi oleh suhu, oleh karena itu suhu fase gerak, kolom, dan detector harus dikendalikan secara seksama.

Penggunaan detector ini terutama untuk senyawa-senyawa yang tidak mempunyai kromofor. Sebagai contoh penggunaannya adalah untuk deteksi karbohidrat baik dalam bahan tambahan tablet atau dalam bahan makanan serta untuk deteksi asetilkolin dalam setiap optalmik.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4.5.5 Detektor Spektrometri Massa

Sejumlah fraksi kecil cairan dari kolom dimasukkan ke dalam spektrometer massa pada kecepatan alir 10 – 50 μl per menit atau menggunakan *termospray*. Analat akan diionisasikan, dipisahkan pada analisator, dibaca oleh detektor dan menghasilkan spektrum massa.

Latihan

1. Jelaskan apa fungsi degasser dan kenapa tidak boleh ada gelembung udara pada kolom KCKT selama proses kromatografi
2. Tuliskan bagian-bagian dari instrumentasi KCKT dan jelaskan fungsi masing-masingnya.
3. Sebutkan persyaratan pompa pada KCKT
4. Jelaskan keunggulan dan kekurangan dari elusi gradien
5. Sebutkan karakteristik detector pada KCKT

BAB V **APLIKASI dan VALIDASI METODA** **KCKT**

Setelah mempelajari Bab ini mahasiswa diharapkan

1. Memahami penggunaan HPLC dalam analisis kualitatif dan kuantitatif
2. Memahami penggunaan internal standard dan eksternal standar sebagai referensi
3. Memahami pengukuran tinggi puncak dan luas puncak dalam analisis kuantitatif
4. Memahami tentang variable validasi metoda

6.1 Analisis dan Metode

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metoda pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas.

Banyak senyawa yang dapat dianalisis dengan KCKT mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Untuk analisis dan pemisahan obat / bahan obat campuran rasemis optis aktif dikembangkan suatu fase pemisahan kiral (chirale Trennphasen) yang mampu menentukan rasemis dan isomer aktif.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Analisa kualitatif

Sebuah kromatogram akan memberikan informasi kualitatif terhadap solut tertentu dalam suatu sampel. Hal ini dapat dilihat dari waktu retensi (t_R) atau posisi pada fasa diam setelah masa elusi tertentu. Sejumlah informasi kromatogram dapat juga dibandingkan dengan spektrum IR tunggal, NMR atau Massa.

Jika sampel tidak menghasilkan puncak pada waktu retensi (t_R) yang sama dengan standar, yang dijalankan dalam kondisi identik tertentu maka dapat diasumsikan senyawa ini tidak ada dalam sampel atau kadar dibawah limit deteksi dari prosedur.

2. Analisa Kuantitatif

Analisa kuantitatif dari massa solut dalam suatu sampel dapat dilakukan berdasarkan perbandingan pengukuran tinggi atau luas puncak dari solut dengan puncak standar referensi pada konsentrasi yang diketahui.

Analisa Berdasarkan Tinggi Puncak

Tinggi puncak kromatogram didapat dengan menghubungkan baseline pada sisi puncak dengan garis tegak yang diukur mengenai puncak. Tinggi puncak berbanding terbalik dengan lebar puncak. Jika tinggi puncak akan digunakan untuk tujuan analitik maka seluruh parameter yang dapat mempengaruhi lebar puncak harus dipertahankan konstan. Selain itu komposisi pelarut harus dipertahankan stabil dan temperatur harus dipertahankan konstan. Kecepatan alir fasa gerak dan injeksi sampel harus dipertahankan konstan. Pengaruh injeksi sampel merupakan masalah penting dalam puncak awal dari kromatogram.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Analisa Berdasarkan Luas Puncak

Luas puncak merupakan integrasi dari tinggi puncak (konsentrasi) terhadap waktu (aliran volume dari fasa gerak) nilainya sebanding dengan total massa solut yang dielusi. Kebanyakan alat kromatografi modern dilengkapi dengan integrator elektronik digital yang akan memberikan penilaian presisi luas puncak .

Prosedur Untuk Analisa Kuantitatif

Ada tiga metoda dasar yang digunakan dalam analisa kuantitatif :

1. Metoda Standar Internal

Dalam metoda ini digunakan standar internal yang mungkin akan memberikan hasil lebih akurat secara kuantitatif. Dengan metoda standar internal prosedur tergantung pada zat yang akan dielusi dan ditambahkan standar referensi yang mempunyai struktur kimia yang mirip tetapi tidak mempengaruhi komponen asli dari sampel sehingga kesalahan injeksi sampel dapat dicegah. Jika memungkinkan standar internal harus dipisahkan dari puncak seluruh komponen sampel ($R_s > 1,25$) juga dari puncak standar.

2. Metoda Standar Eksternal

Metoda ini membutuhkan standar eksternal yang dilakukan kromatografi secara terpisah dari sampel dengan kondisi kromatografi yang harus dipertahankan konstan. Standar eksternal yang digunakan adalah zat yang diduga sebagai komponen sampel yang akan diuji.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3. Metoda Normalisasi

Metoda normalisasi paling mudah digunakan tetapi sayang sekali paling sedikit yang cocok untuk kromatografi cair. Elusi yang sempurna dari seluruh komponen sampel dibutuhkan, seluruh luas puncak yang dielusi dihitung sesudah pengoreksian luas tersebut dengan detektor respon ke tipe senyawa yang lain, konsentrasi analit didapat dari perbandingan puncak terhadap total luas seluruh puncak.

Validasi Metoda

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduisibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Secara singkat, validasi merupakan konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan.

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi persoalan analisis, sehingga suatu metode harus divalidasi ketika :

1. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi persoalan analisis tertentu
2. Metode yang sudah baku, direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu persoalan yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi
3. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
4. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

5. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku

Tujuan utama validasi metode adalah untuk mendapatkan hasil analisis yang baik. Untuk memperoleh hasil tersebut, semua variable yang terkait dengan metode analisis harus dipertimbangkan seperti prosedur pengambilan sampel, tahap penyiapan sampel, jenis fase diam yang digunakan pada kromatografi, fase gerak dan system deteksinya. Banyaknya parameter yang harus divalidasi tergantung pada tujuan analisis.

Validasi suatu metode analisa dapat dinyatakan melalui '*analytical performance parameter*' seperti akurasi, presisi, spesifitas, *limits of detection*, *limits of quantitation*, liniritas dan rentang.

6.2 Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisa dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung pada sebaran kesalahan sistematis dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi kesalahan sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat taat azas sesuai prosedur.

Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recover*) atau

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan bahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah analit tertentu yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

Accuracy perolehan kembali yang umum untuk senyawa obat dalam suatu campuran adalah $\pm 2\%$ (98,0% - 102,0%). Jika perolehan kembalinya di luar kisaran ini, maka prosedur analisis harus dikaji ulang.

6.3 Keseksamaan (*Pressition*)

Keseksamaan merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Konsep presisi diukur dengan simpangan baku. Presisi dapat dibagi lagi menjadi 3 kategori yaitu :

1. Keterulangan (*Repeatability*) merupakan penilaian terhadap ketepatan pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orang, peralatan, tempat maupun waktunya. Dua pilihan pengujian telah diizinkan ICH untuk menilai keterulangan yaitu :
 - a. Suatu pengukuran sebanyak 9 kali (minimal) yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalkan dengan 3

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

kosentrasi yang berbeda pada kisaran kosentrasi dengan masing-masing dilakukan replikasi sebanyak 3 kali)

- b. Suatu pengukuran sebanyak 6 kali (minimal) pada kosentrasi 100% dari kosentrasi uji

Dari hasil pengujian, dihitung standar deviasi (simpangan baku /SD) dan relatif standar deviasi (simpangan baku relatif / RSD) atau disebut koefisien variasi / keragaman (CV).

Secara umum nilai RSD yang dapat diterima :

- bahan baku obat : tidak lebih dari 1,0%
- sediaan obat : tidak lebih dari 2,0%
- cemaran atau hasil : tidak lebih dari 5%

2. Presisi antara merupakan ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang salah satunya berbeda baik orang, peralatan, tempat, maupun waktunya. Banyaknya presisi antara yang akan dilakukan tergantung pada keadaan yang mana suatu prosedur akan diperluas. Parameter-parameter yang akan diamati untuk presisi antara ini meliputi variasi antar hari, variasi analisis, dan variasi peralatan. Diharapkan pada presisi antara ini variabilitasnya berbeda pada kisaran yang sama atau lebih kecil terhadap variabilitas keterulangan.
3. Reprodusibilitas
Merupakan ketepatan pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orang, peralatan, tempat, maupun waktunya. Reprodusibilitas mengukur presisi antara laboratorium sebagaimana dalam studi-studi kolaboratif atau studi uji banding antar laboratorium dan atau uji profisiensi.

6.4 Selektivitas (spesifisitas)

Spesifisitas didefinisikan sebagai suatu kemampuan metode analisa untuk mengukur secara akurat dan spesifik suatu analit dengan adanya komponen-komponen lain yang terdapat dalam matrik sampel. Penunjukan spesifisitas membuktikan bahwa prosedur tidak dipengaruhi dengan adanya ketidakmurnian atau zat pembawa. Jika ketidakmurnian atau produk degradasi standar tidak tersedia, spesifisitas dapat ditunjukkan dengan membandingkan hasil uji dari sampel yang mengandung ketidakmurnian atau produk degradasi dengan prosedur kedua yang telah dikenal lebih baik (misal prosedur yang ada difarmakope atau prosedur validasi lain). Perbandingan seharusnya dilakukan terhadap sampel yang berada dalam kondisi penyimpanan misal kena cahaya, panas, kelembababan, hidrolisa asam/basa, oksidasi. Bila prosedur kromatografi digunakan maka kromatogram harus mewakili dan menunjukkan derajat selektivitas serta puncaknya harus cocok dengan penanda. Dalam teknik pemisahan, daya pisah (resolusi) antara analit yang dituju dengan pengganggu lainnya harus $> 1,5$

6.5 Batas deteksi / *Limits of Detection* (LOD) dan Batas kuantitasi / *Limits of Quantitation* (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. *Limits of detection* merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisa renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

dan seksama. Batas deteksi biasa dinyatakan dalam konsentrasi analit (misal % ppb) dari sampel.

Cara penentuan :

Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak

1. Metode non instrumen

Pada analisis non instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat.

2. Metode instrumen

Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko.

Formula yang digunakan :

$$Q = \frac{kxSb}{Sl}$$

Q : LOD (*limits of detection*) atau LOQ (*limits of quantitation*)

K : 3 untuk LOD dan 10 untuk LOQ

Sb : simpangan baku respon analitik dari blanko

Sl : arah garis linir (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = *slope* (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linir dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linir $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

a. *Limits of detection (Q)*

Karena $K = 3$,

Simpangan baku (S_b) = S_y / x , maka

$$Q = \frac{3S_y / x}{Sl}$$

b. *Limits of quantitation (Q)*

$K = 10$ maka :

$$Q = \frac{10S_y / x}{Sl}$$

6.5 Liniritas dan Rentang

Liniritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan liniritas yang dapat diterima.

Cara Penentuan Liniritas

Liniritas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian liniritas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metoda kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit,

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linear $Y = a + bx$. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan nilai kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y).

$$S = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - y_1')^2}{N - 2}}$$

Dimana :

$$y_1' = a + bx$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

S_{x_0} = standar defiasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

V_{x_0} = koefisien variasi dari fungsi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Latihan

1. Jelaskan bagaimana analisis kualitatif dan kuantitatif dengan KCKT
2. Jelaskanlah apa yang dimaksud dengan validasi metoda
3. Jelaskan kapan validasi perlu dilakukan pada suatu metoda analisis
4. Jelaskan apa yang dimaksud dengan parameter keterulangan (*precision*) dan jelaskan bagaimana prosedur pengujiannya serta berapa harga RSD yang dipersyaratkan
5. Jelaskan bagaimana cara melakukan uji selektivitas metoda
6. Dari data analisis menggunakan KCKT berikut, tentukanlah linieritas hubungan antara konsentrasi dan luas area

| Kosentrasi larutan baku Rubraxanthon (ug/mL) | Luas area |
|--|-----------|
| 2,5 | 393706 |
| 5 | 776533 |
| 10 | 1526164 |
| 12,5 | 1975350 |
| 25 | 3907807 |

SUMBER BACAAN

1. Adamovics. J.A., “*Chromatographic analysis of Pharmaceuticals*”, Marcell Dekker, New York, 1990
2. Ahmad, M., dan Suherman 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press. Surabaya.
3. Ahmad, M., dan Suherman. 1991. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Airlangga University Press. Surabaya.
4. Association of Official Analytical Chemist, 2002, AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis, *JAOAC Int.*, 85: 1-5
5. Bahti. 1998. *Teknik Pemisahan Kimia dan Fisika*. Universitas Padjajaran. Bandung.
6. Bassett, J., R.C. Denney, G.H. Jeffery, dan J. Mendham, 1994, *Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
7. Day, R.A dan Underwood, A.L., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif*, Erlangga, Jakarta.
8. Gandjar, I.G., Rohman, A., *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*, Yokyakarta, 2012
9. Gritter, R. J., Bobbiditi, J. M., Scwaring, A. E., *Pengantar Kromatografi*, Edisi II, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinta, ITB, Bandung. 1997
10. Johson, E.I. and Stevenson R. *Basic Liquid Chromatography*. Varian Associate. Inc. California. 1977.
11. Khopkar, S.M., 2008, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, UI Press, Jakarta.
12. Putra, Effendy D. L., 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*. Jurusan Farmasi Fakultas Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara :3
13. Scott, R. P.W. *Liquid Chromatography for The Analyst*. Marcel Dekker Inc. New York. 1994

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

14. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, Timothy A., *Principle of Instrumental Analysis*. Fifth edition. Saunders College publishing. Philadelphia. 1998.
15. Sudjadi, 1986. *Metode Pemisahan*. Kanisius. Yogyakarta.

Indeks

| | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| (-) methadone | 23 |
| adrenalin | 19, 20 |
| Agarosa | 27 |
| amfoter | 19 |
| Bio-Gel | 27 |
| bonded phase | 15 |
| bovine serum albumin | 21 |
| cellohydrobiolase | 21 |
| constant displacement | 32 |
| constant pressure | 32 |
| <i>degasser</i> | 29, 30, 43 |
| Detektor | 39, 40, 41, 42, 43 |
| Difusi | 7, 8, 13 |
| dinitrobenzoylphenylglycine | 21 |
| divinilbenzen | 26 |
| Elusi gradient | 33 |
| enansiomer | 20, 23 |
| Faktor Kapasitas | 5 |
| faktor konfigurasi | 10 |
| Faktor simetri | 12, 13 |
| fase diam kiral | 20, 21, 22, 23 |
| guard colomn | 38 |
| indeks bias | 31, 39, 43 |
| Injektor | 35 |
| isokratik | 32, 33, 34 |
| Jarak Setara Pelat Teori | 6 |
| Jumlah pelat teori | 6 |
| Kecermatan (<i>Accuracy</i>) | 46 |

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

| | |
|--|--|
| Keseksamaan (<i>Pressition</i>) | 46 |
| Kolom analitik | 36 |
| Kolom preparative | 37 |
| konduktivitas | 39, 43 |
| Kromatografi | 1, 2, 9, 15, 16, 19, 20, 23, 25, 26, 28, 44, 51 |
| Kromatografi eksklusi | 26 |
| Kromatografi partisi | 15 |
| Kromatogram | 4, 12, 13 |
| Kurfa Hukum Van Deemter | 7 |
| kurva Gauss. | 4 |
| Limits of Quantitation | 48 |
| Limits of Detection | 48 |
| Liniritas | 49 |
| loop valve | 35 |
| nonvolatile | 2 |
| Normal Phases | 16 |
| Normalisasi | 45 |
| ovomucoid | 21 |
| Photodiode Array | 41, 42 |
| pompa syringe | 33 |
| Porositas | 26 |
| reciprocating pump | 32 |
| Repeatability | 47 |
| Reprodusibilitas | 47 |
| Reservoir | 29, 30 |
| Resin penukar anion | 26 |
| Resin penukar kation | 26 |
| Resina | 25 |
| Resolusi | 11, 12, 13, 14 |
| Reverse phases | 16 |

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

| | |
|---|-------------------------|
| Selektivitas | 47 |
| Siklodekstrin | 23 |
| Spektrometri Massa | 43 |
| Sphadex | 27 |
| Standar Eksternal | 45 |
| Standar Internal | 45 |
| Stirigel | 27 |
| stiren | 26 |
| Transparansi terhadap UV | 31 |
| Validasi metode | 45 |
| vancomycin | 22 |
| Viskositas. | 31 |
| Waktu retensi | 4, 5, 13, 14, 37 |
| waktu retensi pelarut | 4, 5 |
| α1 acid glycoprotein | 21 |