

# KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DALAM BIDANG FARMASI

**EFFENDY DE LUX PUTRA**

**Jurusan Farmasi  
Fakultas Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Sumatera Utara**

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Sejarah

Kromatografi adalah suatu istilah umum yang digunakan untuk bermacam-macam teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fase gerak yang bisa berupa gas ataupun cair dan fase diam yang juga bisa berupa cairan ataupun suatu padatan. Penemu Kromatografi adalah Tswett yang pada tahun 1903, mencoba memisahkan pigmen-pigmen dari daun dengan menggunakan suatu kolom yang berisi kapur ( $\text{CaSO}_4$ ). Istilah kromatografi diciptakan oleh Tswett untuk melukiskan daerah-daerah yang berwarna yang bergerak kebawah kolom. Pada waktu yang hampir bersamaan, D.T. Day juga menggunakan kromatografi untuk memisahkan fraksi-fraksi petroleum, namun Tswett lah yang pertama diakui sebagai penemu dan yang menjelaskan tentang proses kromatografi.

Penyelidikan tentang kromatografi kendor untuk beberapa tahun sampai digunakan suatu teknik dalam bentuk kromatografi padatan cair (LSC). Kemudian pada akhir tahun 1930 an dan permulaan tahun 1940 an, kromatografi mulai berkembang. Dasar kromatografi lapisan tipis (TLC) diletakkan pada tahun 1938 oleh Izmailov dan Schreiber, dan kemudian diperhalus oleh Stahl pada tahun 1958. Hasil karya yang baik sekali dari Martin dan Synge pada tahun 1941 (untuk ini mereka memenangkan Nobel) tidak hanya mengubah dengan cepat kromatografi cair tetapi seperangkat umum langkah untuk pengembangan kromatografi gas dan kromatografi kertas. Pada tahun 1952 Martin dan James mempublikasikan makalah pertama mengenai kromatografi gas. Diantara tahun 1952 dan akhir tahun 1960 an kromatografi gas dikembangkan menjadi suatu teknik analisis yang canggih.

Kromatografi cair, dalam praktek ditampilkan dalam kolom gelas berdiameter besar, pada dasarnya dibawah kondisi atmosfer. Waktu analisis lama dan segala prosedur biasanya sangat membosankan. Pada akhir tahun 1960 an, semakin banyak usaha dilakukan untuk pengembangan kromatografi cair sebagai suatu teknik mengimbangi kromatografi gas. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau Kromatografi Cair Penampilan Tinggi atau High Performance = Tekanan atau Kinerja Tinggi, High Speed = Kecepatan Tinggi dan Modern = moderen) telah berhasil dikembangkan dari usaha ini. Kemajuan dalam keduanya instrumentasi dan pengepakan kolom terjadi dengan cepatnya sehingga sulit untuk mempertahankan suatu bentuk hasil keahlian membuat instrumentasi dan pengepakan kolom dalam keadaan tertentu. Tentu saja, saat ini dengan teknik yang sudah matang dan dengan cepat KCKT mencapai suatu keadaan yang sederajat dengan kromatografi gas.

### 1.2. Kelebihan KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak

cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya (Done dkk, 1974; Snyder dan Kirkland, 1979; Hamilton dan Sewell, 1982; Johnson dan Stevenson, 1978). Kelebihan itu antara lain:

- mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- mudah melaksanakannya
- kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
- dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis
- Resolusi yang baik
- dapat digunakan bermacam-macam detektor
- Kolom dapat digunakan kembali
- mudah melakukan "sample recovery"

## **II. JENIS-JENIS KROMA TOGRAFI**

### **2.1. Kromatografi padatan cair (LSC)**

Teknik ini tergantung pada teradsorpsinya zat padat pada adsorben yang polar seperti silika gel atau alumina. Kromatografi lapisan tipis (TLC) adalah salah satu bentuk dari LSC. Dalam KCKT kolom dipadati atau dipak dengan partikel-partikel micro or macro particulate or pellicular (berkulit tipis 37 -44  $\mu$ ). Sebagian besar dari KCKT sekarang ini dibuat untuk mencapai partikel-partikel microparticulate lebih kecil dari 20 $\mu$ . Teknik ini biasanya digunakan untuk zat padat yang mudah larut dalam pelarut organik dan tidak terionisasi. Teknik ini terutama sangat kuat untuk pemisahan isomer-isomer.

### **2.2. Kromatografi partisi**

Teknik ini tergantung pada partisi zat padat diantara dua pelarut yang tidak dapat bercampur salah satu diantaranya bertindak sebagai fasa diam dan yang lainnya sebagai fasa gerak. Pada keadaan awal dari kromatografi cair (LSC), fasa diamnya dibuat dengan cara yang sama seperti pendukung pada kromatografi gas (GC). Fasa diam (polar atau nonpolar) dilapisi pada suatu pendukung inert dan dipak kedalam sebuah kolom. Kemudian fasa gerak dilewatkan melalui kolom. Bentuk kromatografi partisi ini disebut kromatografi cair cair (LLC)

Untuk memenuhi kebutuhan akan kolom-kolom yang dapat lebih tahan lama, telah dikembangkan pengepakan fasa diam yang berikatan secara kimia dengan pendukung inert. Bentuk kromatografi partisi ini disebut kromatografi fase terikat (BPC = Bonded Phase Chromatography). BPC dengan cepat menjadi salah satu bentuk yang paling populer dari KCKT. Kromatografi partisi (LLC dan BPC), disebut "fase normal" bila fasa diam lebih polar dari fasa gerak dan "fase terbalik" bila fasa gerak lebih polar dari pada fasa diam.

### **2.3. Kromatografi penukar ion (IEC)**

Teknik ini tergantung pada penukaran (adsorpsi) ion-ion di antara fasa gerak dan tempat-tempat berion dari pengepak. Kebanyakan mesin-mesin berasal dari kopolimer divinilbenzen stiren dimana gugus-gugus fungsinya telah ditambah. Asam sulfonat dan amin kuarterner merupakan jenis resin pilihan paling baik untuk digunakan. Keduanya, fase terikat dan resin telah digunakan. Teknik ini digunakan secara luas dalam life sciences dan dikenal untuk pemisahan asam-asam amino. Teknik ini dapat dipakai untuk keduanya kation dan anion.

### **2.4. Kromatografi eksklusi**

Teknik ini unik karena dalam pemisahan didasarkan pada ukuran molekul dari zat padat. Pengepak adalah suatu gel dengan permukaan berlubang-lubang sangat kecil (porous) yang inert. Molekul-molekul kecil dapat masuk dalam jaringan dan

ditahan dalam fase gerak yang menggenang (stagnat mobile phase). Molekul-molekul yang lebih besar, tidak dapat masuk kedalam jaringan dan lewat melalui kolom tanpa ditahan.

Kromatografi eksklusi rnerpunyai banyak nama, yang paling umum disebut permeasi gel (GPC) dan filtrasi gel. Apapun namanya, mekanismenya tetap sama. Dalam bidang biologi, Sephadex, suatu Cross-linked dextran gel, telah digunakan secara luas, hanya pengepak keras dan semi keras (polistiren, silika, glass) yang digunakan dalam KCKT. Dextran gel lunak tidak dapat menahan kinerja diatas 1 atau 2 atmosfer. Tenik ini dikembangkan untuk analisis polimer-polimer dan bahan-bahan biologi, terutama digunakan untuk rnmolekul-molekul kecil.

## 2.5. Kromatografi pasangan ion (IPC)

Kromatogtafi pasangan ion sebagai penyesuaian terhadap KCKT termasuk baru, pemakaian pertama sekali pada pertengahan tahun 1970. Diterimanya IPC sebagai metode baru KCKT merupakan hasil kerja Schill dan kawan-kawan dan dari beberapa keuntungan yang unik. Kadang-kadang IPC disebut juga kromatografi ekstraksi, kromatografi dengan suatu cairan penukar ion dan paired ion chromatography (PIC). Setiap teknik-teknik ini mempunyai dasar yang sama.

Popularitas IPC muncul terutama sekali dari keterbatasan IEC dan dari sukanya menangani sampel-sampel tertentu dengan metode-metode LC lainnya (seperti senyawa yang sangat polar, senyawa yang terionisasi secara kompleks dan senyawa basa kuat).

IPC dapat dilaksanakan dalam dua tipe yaitu fase normal dan fase balik. Fase diam dari rase balik IPC dapat terdiri dari suatu pengepak silika yang disilanisasi (misalnya C8 atau C18 Bonded Phase) atau dari suatu pengepak yang diperoleh secara mekanik, fase organik yang tidak dapat bercampur dengan air seperti 1 pentanol. Fase diam yang dipakai adalah Cs atau CIS BPC Packing. Fase gerak terdiri dari suatu larutan bufer (ditambah suatu kosolven organik seperti metanol atau asetonitril untuk pemisahan fase terikat) dan suatu penambahan ion tanding,yang muatannya berlawanan dengan molekul sampel.

Sebagai contoh, untuk pemisahan suatu kelompok asam-asam karboksilat menggunakan suatu fase gerak yang dibufer pada pH 7,0 supaya semua senyawa-senyawa sampel berada dalam bentuk RCOO (dilambangkan dengan R). Ion tanding dalam hal ini bisa berupa tetrabutyl ammonium ion, BU<sub>4</sub>N<sup>+</sup> (atau TBA<sup>+</sup>). Dalam hal yang paling sederhana dari IPC, dapat dianggap bahwa sampel dan ion tanding dapat lama hanya dalam fase gerak air, dan pasangan ion yang dibentuk dari ion-ion ini dapat larut hanya dalam fase diam organik. Dalam hal ini dapat ditulis persamaan untuk distribusi sampel R- diantara dua fase :



### pasangan Ion

Tulisan aq dan org menunjukkan fase air dan rase organik. Konstanta ekstraksi E selanjutnya ditetapkan dengan persamaan :

$$E = \frac{(R^- TBA^+)_{org}}{(R^-)_{aq} (TBA^+)_{aq}} \dots\dots\dots(2b)$$

Dimana E adalah konstant untuk suatu sistem IPC khusus, tetapi bervariasi dengan pH fase gerak dan kekuatan ion, konsentrasi dan jenis kosolven organik didalam fase gerak (misal metanol atau asetonitril) dan suhu. Kapasitas faktor k<sup>3</sup>,berhubungan dengan E sebagai berikut :

$$k' = \frac{V_s (R^- TBA^+)_{org}}{V_m (R^-)_{aq}} \dots\dots\dots(2c)$$

$$k' = \frac{V_s}{V_m} E(TBA^+)_{aq} \dots\dots\dots(2d)$$

Maka harga  $k^3$  untuk semua senyawa-senyawa sampel (untuk unit bermuatan negatif) diduga sebanding dengan konsentrasi ion tanding  $TBA^+$ . Catatan bahwa koefisien distripbusi K berhubungan dengan E sehingga.

$$E = \frac{K}{(TBA^+)} \dots\dots\dots(2e)$$

Variasi dari  $(TBA^+)_{aq}$  memberikan suatu cara untuk mengontrol kekuatan solven dalam selektifitas. Dalam sistem fase balik, kekuatan solven dengan mudah dapat divariasi dengan mengubah ion tanding atau konsentrasinya. Untuk sistem fase balik pemisahan samapel anion atau sampel kation dapat dirumuskan dengan :

$$(s\text{ampel anion}) \quad : k' = \frac{V_s}{V_m} E(C^+) \dots\dots\dots(2f)$$

$$(s\text{ampel kation}) \quad : k' = \frac{V_s}{V_m} E(C^-) \dots\dots\dots(2g)$$

Disini konsentrasi  $(C^+)$  dan  $(C^-)$ , berturut-turut menunjukkan konsentrasi ion tanding kation dan konsentrasi ion tanding anion, dan E adalah konstan walaupun kondisi-kondisi lainnya diubah. Maka bertambahnya konsentrasi dari ion tanding dalam fase gerak menyebabkan bertambahnya  $k^3$  untuk IPC fase batik ( dan berkurang pada JPC fase normal). Persamaan (6) dan (7) untuk ion-ion sampel terionisasi tunggal. Untuk ion-ion sampel bivalen atau trivalen,  $k'$  berubah berturut-turut menjadi  $(C^+)^2$  atau  $(C^+)^3$ .

Dalam IPC fase normal,  $k'$  dapat divariasi dengan mengubah konsentrasi ion tanding dalam fase diam. Namun, hal ini kurang tepat karena berarti harus mengubah fase diam (mengisi kembali kolom = reloading the column). Dalam operasional fase normal ataupun fase balik IPC,  $k'$  dapat juga divariasi dengan mengubah jenis ion tanding (misalnya mengganti pentan sulfonat dengan heptan sulfonat). Penambahan satu gugus  $CH_2$  kepada molekul ion tanding menghasilkan suatu faktor sampai 2,5 kali (efek lebih besar pada ion tanding dengan konsentrasi rendah), molekul-molekul ion tanding yang lebih besar memberikan harga  $k'$  lebih kecil pada IPC fase normal.

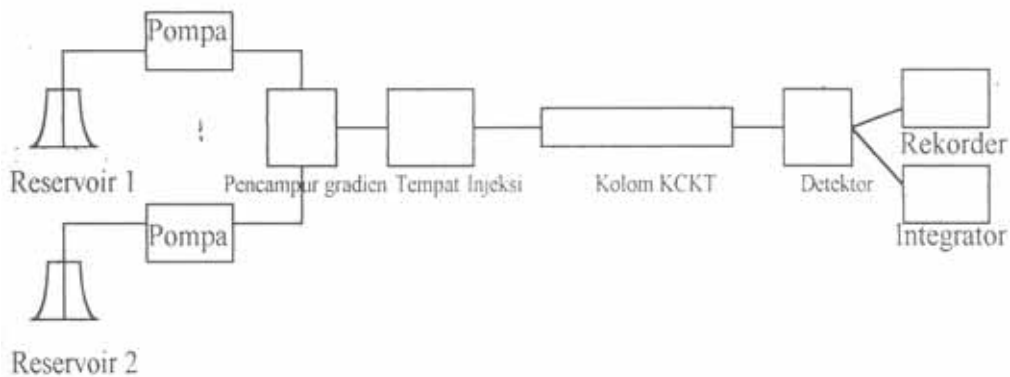
Kekuatan solven baik dalam fase normal ataupun fase balik IPC dapat juga divariasi dengan merubah polaritas fase gerak. Untuk sistem fase balik IPC tanpa penambahan fase diam organik, campuran air dengan salah satunya metanol atau asetonitril biasanya digunakan sebagai fase gerak. Bila persentase air dikurangi, maka pelarut menjadi lebih kuat dan harga  $k'$  sampel berkurang.

Selain dari pada menaikkan konsentrasi ion tanding, menaikkan kekuatan ionik didalam fase air biasanya mengurangi pembentukan pasangan-pasangan ion, sebagai suatu hasil kompetisi dari ion-ion sekunder dalam membentuk pasangan-

pasangan ion dengan ion tanding. Maka suatu kenaikan/pertambahan kekuatan ion akan menurunkan harga  $k'$  pada IPC fase balik dan akan meninggikan harga  $k'$  pada rase normal IPC. Satu studi membuktikan bahwa 2 sampai 3 kali lipat perubahan  $k'$  untuk setiap menggandakan kekuatan ion. Ion-ion sekunder yang muatannya sama dengan muatan ion sampel (misal : kationik atau anionik) mempunyai efek yang paling besar pada harga  $k'$  sampel. Dalam suatu studi meliputi pemisahan anion-anion sampel dengan IPC, efek dari ion-ion sekunder terhadap  $k'$  bertambah dalam urutan  $\text{NO}_3 < \text{Br} < \text{Cl} < \text{SO}_4^{-2}$

### III. KOMPONEN-KOMPONEN KCKT

Komponen-komponen penting dari KCKT dapat dilihat pada Gambar 3. 1 . Diagram Blok KCKT berikut ini



Gambar 3.1 : Diagram Blok KCKT

#### 3.1. Pompa (Pump)

Fase gerak dalam KCKT adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom. Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (constant pressure) dan pemindahan konstan (constant displacement). Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu: pompa reciprocating dan pompa syringe. Pompa reciprocating menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur (pulsating), oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk, menghasilkan garis dasar (base line) detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Pompa syringe memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas.

#### 3.2. Injektor (injector)

Sampel yang akan dimasukkan ke bagian ujung kolom, harus dengan disturbansi yang minimum dari material kolom. Ada dua model umum :

- a. Stopped Flow
- b. Solvent Flowing

Ada tiga tipe dasar injektor yang dapat digunakan :

- a. Stop-Flow: Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfer, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam cairan kecil dan resolusi tidak dipengaruhi
- b. Septum: Septum yang digunakan pada KCKT sama dengan yang digunakan pada Kromatografi Gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60 - 70 atmosfer. Tetapi septum ini tidak tahan dengan semua pelarut-pelarut Kromatografi Cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.

- c. Loop Valve: Tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10  $\mu$  dan dilakukan dengan cara otomatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual). Pada posisi LOAD, sampel diisi ke dalam loop pada kinerja atmosfer, bila VALVE difungsikan, maka sampel akan masuk ke dalam kolom.

### 3. 3. Kolom (Column)

Kolom adalah jantung kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

- a. Kolom analitik : Diameter dalam 2 -6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan pellicular, panjang yang digunakan adalah 50 -100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikel, 10 -30 cm. Dewasa ini ada yang 5 cm.
- b. Kolom preparatif: umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25 -100 cm.

Kolom umumnya dibuat dari stainlesssteel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan (Liquid Solid Chromatography, LSC; Liquid Liquid Chromatography, LLC; Ion Exchange Chromatography, IEC, Exclusion Chromatography, EC)

### 3. 4. Detektor (Detector) .

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan (noise) yang rendah, kisaran respons linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh.

Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV 254 nm. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan range yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV. Detektor-detektor lainnya antara lain:

Detektor Fluorometer	-Detektor Spektrofotometer Massa
Detektor Ionisasi nyala	-Detektor Refraksi Indeks
Detektor Elektrokimia	-Detektor Reaksi Kimia

### 3. 5. Elusi Gradien

Elusi Gradien didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fasa gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari Elusi Gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom. Dasar-dasar elusi gradien dijelaskan oleh Snyder.

Elusi Gradien menawarkan beberapa keuntungan :

- a. Total waktu analisis dapat direduksi
- b. Resolusi persatuan waktu setiap senyawa dalam campuran bertambah
- c. Ketajaman Peak bertambah (menghilangkan tailing)
- d. Efek sensitivitas bertambah karena sedikit variasi pada peak

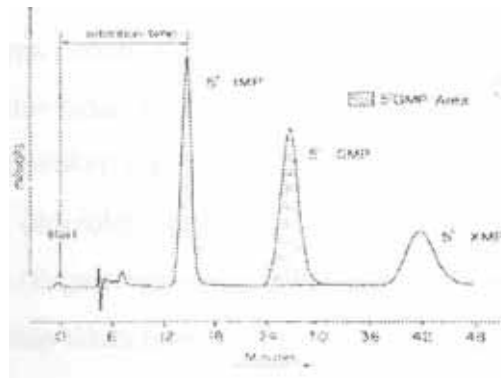
Gradien dapat dihentikan sejenak atau dilanjutkan. Optimasi Gradien dapat dipilih dengan cara trial and error. Tabel 3. 1. berikut ini menunjukkan kompatibilitas dari bermacam-macam mode kromatografi cair dengan analisis gradien. Dalam praktek, gradien dapat diformasi sebelum dan sesudah pompa.

Tabel 3. 1 : Mode Kompatibilitas dengan Gradien

Mode	Solven Gradien
Kromatografi Cair padat (LSC)	Ya
Kromatografi eksklusi	Tidak
Kromatografi Penukar Ion (IEC)	Ya
Kromatografi Cair Cair (LLC)	Tidak
Kromatografi Fasa Terikat (BPC)	Ya

### 3. 6. Pengolahan Data (Data Handling)

Hasil dari pemisahan kromatografi biasanya ditampilkan dalam bentuk kromatogram pada recorder. Suatu tipe Kromatogram dapat dilihat pada Gambar 3. 2 berikut ini



Gambar 3.2 : kromatogram dari senyawa 5' Nukleotida

Dari Gambar 3.2. waktu retensi dan volume retensi dapat diketahui /dihitung. Ini bisa digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif suatu komponen, bila kondisi kerja dapat dikontrol. Lebar puncak dan tinggi puncak sebanding atau proporsional dengan konsentrasi dan dapat digunakan untuk memperoleh hasil secara kuantitatif.

### 3. 7. Fasa gerak

Di dalam kromatografi cair komposisi dari solven atau rasa gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada solven yang digunakan untuk KCKT, tetapi ada beberapa sifat umum yang sangat disukai, yaitu rasa gerak harus :

1. Murni, tidak terdapat kontaminan
2. Tdak bereaksi dengan wadah (packing)
3. Sesuai dengan defektor
4. Melarutkan sampel
5. Memiliki visikositas rendah
6. Bila diperlukan, memudahkan "sample recovery"
7. Diperdagangkan dapat diperoleh dengan harga murah (reasonable price)

Umumnya, semua solven yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemumiannya kembali sangat membosankan dan mahal biayanya. Dari semua persyaratan di atas, persyaratan 1) s/d 4) merupakan yang sangat penting.

Menghilangkan gas (gelembung udara) dari solven, terutama untuk KCKT yang menggunakan pompa bolak balik (reciprocating pump) sangat diperlukan terutama bila detektor tidak tahan kinerja sampai 100 psi. Udara yang terlarut yang tidak dikeluarkan akan menyebabkan gangguan yang besar di dalam detektor sehingga data yang diperoleh tidak dapat digunakan (the data may be useless). Menghilangkan gas (degassing) juga sangat baik bila menggunakan kolom yang sangat sensitif terhadap udara (contoh : kolom berikatan dengan NH<sub>2</sub>).

### 3.8. Keuntungan KCKT

KCKT dapat dipandang sebagai pelengkap Kromatografi Gas (KG). Dalam banyak hal kedua teknik ini dapat digunakan untuk memperoleh efek pemisahan yang sama membaiknya. Bila derivatisasi diperlukan pada KG, namun pada KCKT zat-zat yang tidak diderivatisasi dapat dianalisis. Untuk zat-zat yang labil pada pemanasan atau tidak menguap, KCKT adalah pilihan utama. Namun demikian bukan berarti KCKT menggantikan KG, tetapi akan memainkan peranan yang lebih besar bagi para analis laboratorium. Derivatisasi juga menjadi populer pada KCKT karena teknik ini dapat digunakan untuk menambah sensitivitas detektor UV Visibel yang umumnya digunakan.

KCKT menawarkan beberapa keuntungan dibanding dengan kromatografi cair klasik, antara lain:

**Cepat:** Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit (uncomplicated), waktu analisis kurang dari 5 menit bisa dicapai

**Resolusi :** Berbeda dengan KG, Kromatografi Cair mempunyai dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi. Pada KG, gas yang mengalir sedikit berinteraksi dengan zat padat; pemisahan terutama dicapai hanya dengan fase diam. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.

**Sensitivitas detektor :** Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10<sup>-9</sup> gram) dari bermacam-macam zat. Detektor-detektor Fluoresensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi jumlah sampai picogram (10<sup>-12</sup> gram). Detektor-detektor seperti Spektrofotometer Massa, Indeks Refraksi, Radiometri, dll dapat juga digunakan dalam KCKT

**Kolom yang dapat digunakan kembali :** Berbeda dengan kolom kromatografi klasik, kolom KCKT dapat digunakan kembali (reusable) . Banyak analisis yang bisa dilakukan dengan kolom yang sama sebelum dari jenis sampel yang diinjeksi, kebersihan dari solven dan jenis solven yang digunakan

**Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik :** zat – zat yang tidak bisa dianalisis dengan KG karena volatilitas rendah , biasanya diderivatisasi untuk menganalisis spesies ionik. KCKT dengan tipe eksklusi dan penukar ion ideal sekali untuk menganalisis zat – zat tersebut.

**Mudah rekoveri sampel :** Umumnya setektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa, oleh karena itu komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detector. Solvennya dapat dihilangkan dengan menguapkan kevakum untuk kromatografi penukar ion memerlukan prosedur khusus.



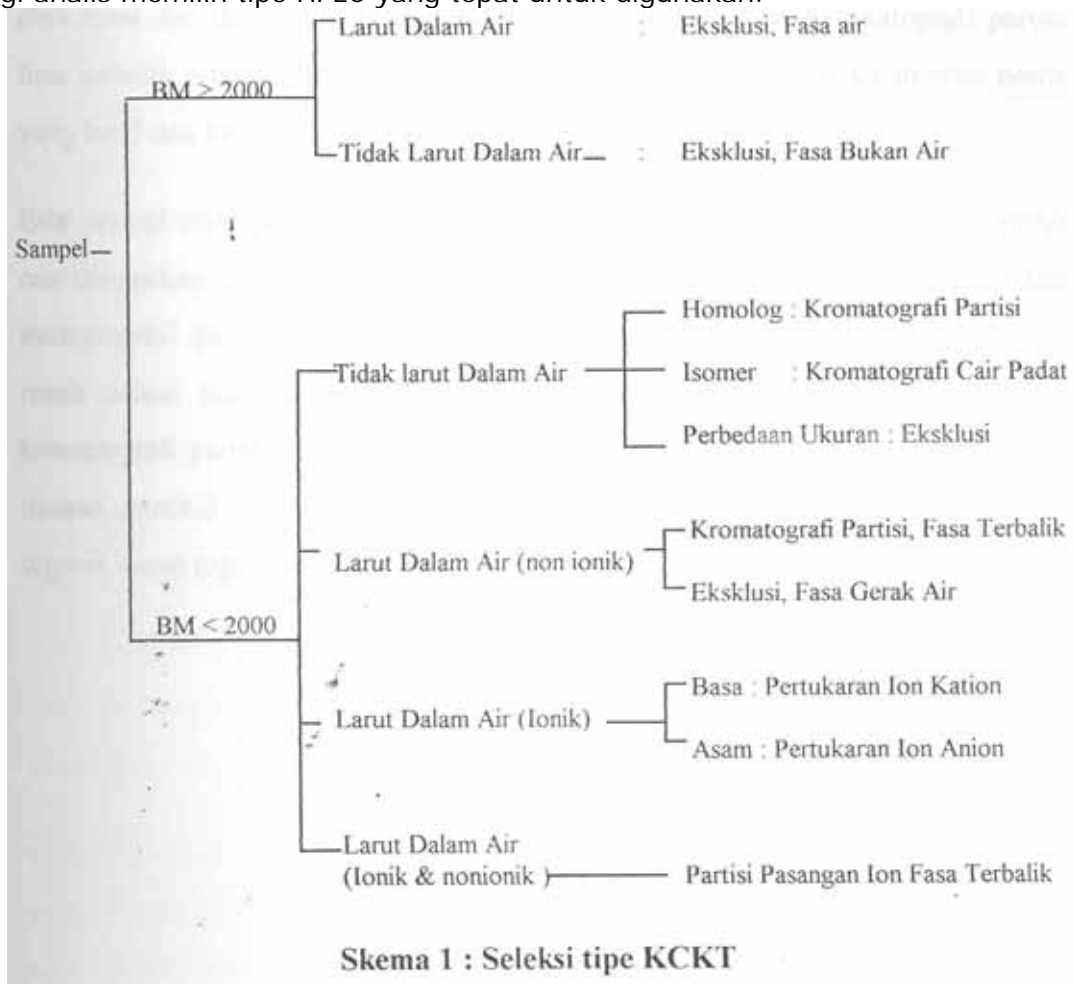
### 3.9 Seleksi Tipe KCKT

Analisis (pengguna KCKT) sebelum mengoperasikan KCKT, harus membuat keputusan tipe yang mana yang harus dipilih yang dapat memberikan informasi yang diinginkan.

Skema 1 : Seleksi tipe KCKT adalah suatu petunjuk umum untuk seleksi tipe KCKT . Informasi ini akan memudahkan para analis untuk memutuskan pemilihan tipe KCKT yang memberikan para analis untuk memutuskan pemilihan tipe KCKT yang memberikan kemungkinan terbaik pada pemisahan yang diinginkan. Namun, sampel yang tidak dikenal (unknown) akan menyulitkan pemilihannya tipe KCKT.

Informasi seperti kelarutan, gugus fungsi yang ada, besarnya Berat Molekul dapat diperoleh dari pembuat informasi, pemberi sampel, atau data spektroskopik seperti nucleic magnetic resonance Spectrophotometer, infra red spectrophotometer, ultra violet spectrometer, dan mass

Spectrophotometer. Semua data-data ini dapat digunakan sebagai petunjuk bagi analis memilih tipe HPLC yang tepat untuk digunakan.



Skema 1 : Seleksi tipe KCKT

Skema 1 : Seleksi tipe KCKT

Dengan berpedoman pada Hukum Dasar "like dissolves like" maka sangat mudah untuk memutuskan tipe KCKT yang akan dipilih. Dari Skema 1 : Seleksi tipe KCKT, dengan cepat kita dapat melihat bahwa Berat Molekul (BM) lebih besar dari 2000, maka kita dapat menggunakan kromatografi eksklusi. Fasa geraknya adalah air jika sampelnya larut dalam air; bila dapat larut dalam pelarut organik maka digunakan

pelarut- pelarut organik sebagai fase gerak. Fase diamnya adalah Sephadex atau (Bondagel Seri E untuk fase gerak air dan Styragel atau MicroPak TSK gel untuk fase gerak organik. Bila BM lebih rendah dari 2000, pertama yang harus ditentukan adalah apakah sampel dapat larut dalam air. Bila sampel dapat larut dalam air, maka kromatografi partisi fase terbalik atau kromatografi penukar ion dapat digunakan. Bila kelarutan dipengaruhi oleh penambahan asam atau basa atau bila pH larutan bervariasi lebih dari 2 (dua) satuan pH dari pH 7, maka kromatografi penukar ion adalah pilihan utama. Bila kelambatan tidak dipengaruhi oleh asam dan basa dan larutan sampel adalah netral, maka kromatografi partisi fase terbalik adalah pilihan terbaik. Tipe Eksklusi menggunakan ukuran poros yang kecil dan fase air dapat juga dicoba.

Bila sampel tidak larut dalam air, kromatografi partisi atau kromatografi padat cair dianjurkan untuk digunakan. Untuk pekerjaan rutin disarankan menggunakan kromatografi partisi fase terikat normal karena kolom-kolom ini tidak begitu rumit dalam perawatannya setelah digunakan. Untuk sampel-sampel isomer kromatografi padat cair lebih baik digunakan. Bila sampel memiliki perbedaan ukuran partikel yang besar, kromatografi eksklusi sterik dengan fase gerak organik dapat juga digunakan.

#### **IV. Penggunaan KCKT dalam Farmasi**

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.

Pada Farmakope Indonesia Edisi III Tahun 1979 KCKT belum digunakan sebagai suatu metoda analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Padahal di Farmakope negara-negara maju sudah lama digunakan, seperti Farmakope Amerika Edisi 21 (United State of Pharmacopoeia XXI), Farmakope Jerman Edisi 10 (Deutsches Arzneibuch 10).

Pada Farmakope Indonesia Edisi IV Tahun 1995 sudah digunakan KCKT dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif dan uji kemurnian sejumlah 277 (dua ratus tujuh puluh tujuh) obat/bahan obat. Perubahan yang sangat spektakuler dari Farmakope Indonesia Edisi IV Tahun 1995 ini menunjukkan bahwa Pemerintah Indonesia melalui Departemen Kesehatan Republik Indonesia dan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan benar-benar telah mengikuti perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi canggih dalam bidang analisis obat.

Walaupun disadari biaya yang dibutuhkan untuk analisis dengan KCKT sangat mahal, namun metoda ini tetap dipilih untuk digunakan menganalisis 277 jenis obat / bahan obat karena hasil analisis yang memiliki akurasi dan presisi yang tinggi, waktu analisis cepat. Pada Tabel 4.1 dapat dilihat Daftar Obat-obat yang Penetapan Kadarnya dengan KCKT yang tercantum dalam Farmakope Indonesia Edisi IV Tahun 1995.

Tabel 4.1 : Daftar Obat – obat yang Penetapan Kadarnya dengan KCKT (FL Edisi IV)

No. Nama Obat /Bahan Obat

1. Tablet Asetazolamida
2. Asetilsistein
3. Larutan Asetilsistein

4. Tablet Asetosal
5. Asam Aminokaproat
6. Asam Aminosalisilat
7. Asam Folat '
8. Tablet Asam Folat
9. Asam Mefenarnat
10. Kapsul Asam Mefenamat
11. Asiklovir
12. Tablet Allopurinol
13. Alprozolam
14. Tablet Alprozolam
15. Amikasin Sulfat
16. Injeksi Amikasin Sulfat
17. Aminofilin
18. Amoksihn .
19. Kapsu Armoksilin
20. Amoksilin untuk Suspensi Oral
21. Ampisilin
22. Tablet Atropin Sulfat
23. Injeksi Atropin Sulfat
24. Beklometason Dipropionat
25. Gel Benzoil Peroksida
26. Betametason
27. Tablet Betametason
28. Betametason Dipropionat
29. Krim Bemetason Dipropionat
30. Salep Betametason Dipropionat
31. Betametason Natrium Fosfat
32. Inj. Betametason Natrium Fosfat
33. Betametason Valerat
34. Krim Betametason Valerat
35. Salep Betametason Valerat
36. Tablet Bisakodil
37. Supositoria Bisakodil
38. Tablet Bromokriptin Mesilat
39. Injeksi Bupivakain Hidroklorida
40. Karbamazepin
41. Tablet Karbamazepin
42. Karbidopa
43. Tablet Karisoprodol
44. Sefazolin Natrium untuk Injeksi
45. Sefaleksin
46. Kapsul Sefaleksin
47. Tablet Sefaleksin
48. Sefaleksin untuk Suspensi Oral
49. Sefradin
50. Kapsul Kloramfenikol
51. Krim Kloramfenikol
52. Tetes Telinga Kloramfenikol
53. Tetes Mata Kloramfenikol
54. Kloramfenikol Palmitat
55. Susp.Oral Kloramfenikol Palmitat
56. Klordiazepoksida

57. Tablet Klordiazepoksida
58. Klorpropamida
59. Tablet Klorpropamida
60. Klortalidon
61. Tablet Klortalidon
62. Kolekalsiferol
63. Simetidin
64. Tablet Simetidin
65. Sisplatin
66. Sisplatin untuk Injeksi
67. Tablet Klemastin Fumarat
68. Kelindamisin Hidroklorida
69. Kapsul Klindamisin Hidroklorida
70. Klindamisin Fosfat
71. Injeksi Klindamisin Fosfat
72. Klomifen Sitrat
73. Tablet Klomifen Sitrat
74. Tablet Klonazem
75. Klotrimazol
76. Krim Klotrimazol
77. Tablet Vaginal Klotrimazol
78. Kloksasilin Natrium
79. Kolkhisin
80. Kortison Asetat
81. Suspensi Steril Kortison Asetat
82. Siklofosfamida
83. Tablet Siklofosfamida
84. Siklofosfamida untuk Injeksi
85. Siklosporin
86. LarPekat Siklosporin untuk Inj.
87. Larutan Oral Siklosporin
88. Sitarabin
89. Sitarabin Steril
90. Daktinomisin
91. Daktinomisin untuk Injeksi
92. Dapson
93. Tablet Dapson
94. Daunorubisin Hidroklorida
95. Daunorubisin Hidroklorida u. Inj.
96. Desoksimetason
97. Deksametason
98. Deksametason Asetat
99. Tablet Deksametason
100. Deksametason Natrium Fosfat
101. Inj. Deksametason Natrium Fosfat
102. Dekstrometorfan Hidrobromida
103. Sirup Dekstrometorfan HBr
104. Tablet Diazepam
105. Injeksi Diazepam
106. Dibukaini Hidroklorida
107. Dikloksasilin Natrium
108. Dikloksasilin Natrium steril
109. Kapsul pikloksasilin Natratrium

110. Dikloksasilin Na utk Susp. Oral
111. Digitoksin
112. Tablet Digitoksin
113. Digoksin
114. Tablet Digoksin
115. Diltiazem Hidroklorida
116. Tablet Diltiazem Hidroklorida
117. Tablet Difenhidramin Teoklat
118. Difenhidramin Hidroklorida
119. Inj. Difenhidramin Hidroklorida
120. Tablet Dipiridamol
121. Injeksi Dopamin Hidroklorida
122. Doksorubisin Hidroklorida
123. Doksorubisin HCl untuk Injeksi
124. Doksisisiklin
125. Doksisisiklin Hiklat
126. Kapsul Doksisisiklin Hiklat
127. Ergokalsiferol (Vitamin D)
128. Tablet Ergonovin Maleat
129. Injeksi Ergonovin Maleat
130. Estradiol
131. Estradiol Sipionat
132. Etinil Estradiol
133. Injeksi Fentanil Sitrat
134. Fluosinolon Asetonida
135. Fluoksimesteron
136. Tablet Furosemida
137. Injeksi Furosemida
138. Gemfibrozil
139. Gentamisin Sulfat
140. Griseofulvin
141. Tablet Griseofulvin
142. Tablet Guaifenesin
143. Tablet Haloperidol
144. Hidralazin Hidroklorida
145. Hidroklorotiazida
146. Tablet Hidroklorotiazida
147. Hidrokortison
148. Hidrokortison Asetat
149. Krim Hidrokortison Asetat
150. Hidrokortison Butirat
151. Ibuprofen
152. Tablet Ibuprofen
153. Isoniazid
154. Tablet Isoniazid
155. Isosorbid Dinitrat Encer
156. Tab. Subli. Isosorbid Dinitrat
157. Kalium Kiavulanat
158. Tablet Ketokonazol
159. Tablet Levamisol Hidroklorida
160. Levotiroksin Natrium
161. Tablet Levotiroksin Natrium
162. Lidokain Hidroklorida

163. Injeksi Lidokain Hidroklorida
164. Lrt. Oral Topikal Lidokain HCl
165. Inj. Lidokain dan Epinefrin
166. Linkomisin Hidroklorida
167. Kapsul Linkomisin Hidroklorida
168. Injeksi Linkomisin Hidroklorida
169. Tablet Lorazepam
170. Manitol
171. Medroksiprogesteron Asetat
172. Susp. Ster. Medroksiprogest. Asetat
173. Metotreksat
174. Tablet Metotreksat
175. Injeksi Metotreksat Natrium
176. Metoksalen
177. Tablet Metilergonovin Maleat
178. Injeksi Metilergonovin Maleat
179. Metilprednisolon Asetat
180. Metiltestosteron
181. Tablet Metoklopramida HCl
182. Tablet Metoklopramida HCl
183. Injeksi Metoklopramida HCl
184. Lrt. Oral Metoklopramida HCl
185. Tablet Metoprolol Tartrat
186. Tablet Metronidazol
187. Injeksi Metronidazol
188. Meksiletin Hidroklorida
189. Minosiklin Hidroklorida
190. Mitomisin
191. Mitomisin untuk Injeksi
192. Morfin Sulfat
193. Injeksi Morfin Sulfat
194. Tablet Nadolol
195. Tablet Naproksen Natrium
196. Natrium Aminosalisilat
197. Tablet Natrium Aminosalisilat
198. Nifedipin
199. Nitrofulantoin
200. Kapsul Nitrofurantoin
201. Nitrogliserin Encer
202. Tablet Nitrogliserin
203. Metaproterenol Sulfat
204. Oksimetazolin Hidroklorida
205. Tetes Hidung Oksimetazolin HCl
206. Tablet Parasetamol
207. Larutan Oral Parasetamol
208. Suspensi Oral Parasetamol
209. Luminal
210. Tablet Fenobarbital
211. Luminal Natrium
212. Injeksi Fenobarbital Natrium
213. Fenolftalein
214. Penisilin V
215. Tablet Penisilin V

216. Fenilbutazon
217. Fenitoin Natrium
218. Kapsul Fenitoin Natrium
219. Vitamin K1 (Fitonadion)
220. Tablet Fitonadion
221. Injeksi Fitonadion
222. Tetes Mata Pilocarpin HCl
223. Tetes Mata Pilocarpin Nitrat
224. Pindolol
225. Piperazin
226. Piroksikam
227. Prazikuantel
228. Tablet Prazikuantel
229. Tablet Prazosin Hidroklorida
230. Prednisolon
231. Prednisolon Asetat
232. Tts.Mata Susp. Prednisolon Asetat
233. Prednison
234. Tablet Prednison
235. Probenesid
236. Prokainamida HCl.
237. Progesteron
238. Injeksi Prometazin HCl
239. Propanolol HCl
240. Tablet Propanolol HCl
241. Injeksi Propanolol HCl
242. Tablet Propiltiourasil
243. Pirantel Pamoat
244. Suspensi Oral Pirantel Pamoat
245. Piridoksin HCl
246. Tablet Kuinin Sulfat
247. Ranitidin HCl
248. Tablet Ranitidin HCl
249. Riboflavin Natrium Fosfat
250. Rifampisin
251. Kapsul Rifampisin
252. Sorbitol
253. Spironolakton
254. Tts. Mata Sulfasetamida Natrium
255. Sulfadiazin
256. Sulfametizol
257. Tablet Kotrimoksazol
258. Tablet Tamoksifen Sitrat
259. Terbutalin Sulfat
260. Tetrasiklin
261. Tetrasiklin HCl
262. Kapsul Tetrasiklin HCl
263. Teofilin
264. Tiamin HCl
265. Injeksi Vitamin B1
266. Tiamin Mononitrat
267. Tiokonazol
268. Tobramisin

- 269. Tolbutamida
- 270. Tablet Tolbutamida
- 271. Triamsinolon
- 272. Triamsinolon Asetonida
- 273. Triheksifenidil HCl
- 274. Vinblastin Sulfat
- 275. Tablet Triheksifenidil HCl
- 276. Vinkristin Sulfat
- 277. Tubokurarin Klorida
- 278. Warfarin Natrium

Dari Tabel 4. 1 di atas dapat diketahui bahwa :

1. Penetapan Kadar obat / Bahan obat baik dalam bentuk murni maupun dalam bentuk sediaannya ditetapkan dengan KCKT
2. Penetapan kadar Obat / Bahan Obat dalam bentuk murni dilakukan dengan metoda lain seperti Titrasi Bebas Air, Nitrimetri, Iodo-i/metri dan lain-lain, I sedangkan Penetapan Kadar sediaannya menggunakan KCKT.
3. Khusus untuk beberapa Antibiotik dalam bentuk murninya dilakukan Penetapan Potensinya, namun dalam bentuk sediaannya dilakukan Penetapan kadar dengan KCKT. Namun ada juga Antibiotik baik bentuk murninya dan sediaannya ditetapkan kadarnya dengan KCKT
4. Beberapa senyawa Sulfonamida dalam bentuk murninya ditetapkan kadarnya dengan nitrimetri tetapi dalam bentuk sediaannya dengan KCKT.

## V. ANALISIS KUANTITATIF

### 5.1. Metoda Persentase Tinggi / Lebar Puncak

Metoda ini disebut juga Metoda Normalisasi Internal. Untuk analisis kuantitatif diasumsikan bahwa lebar atau tinggi Puncak (Peak) sebanding (proportional) dengan kadar / konsentrasi zat yang menghasilkan puncak. Dalam metoda yang paling sederhana diukur lebar atau tinggi Puncak, yang kemudian dinormalisasi (ini berarti bahwa setiap lebar atau tinggi Puncak diekspresikan sebagai suatu persentase dari total). Hasil normalisasi dari lebar atau tinggi puncak memberikan komposisi dari campuran yang dianalisis, seperti contoh pada Tabel 5.1. berikut:

**Tabel 5.1 : Normalisasi Tinggi Puncak**

Puncak	Tinggi Puncak (mm)	Normalisasi tinggi Puncak (%w/w)
1	12	$12/162 \times 100 = 7,4$
2	27	$27/162 \times 100 = 16,7$
3	72	$72/162 \times 100 = 44,4$
4	51	$51/162 \times 100 = 31,5$
	162	100

Ada dua masalah dengan pendekatan ini, yaitu:

Kita harus yakin bahwa kita telah menghitung semua komponen, yang tiap-tiap komponen muncul sebagai suatu puncak yang terpisah pada kromatogram. Komponen-komponen dapat berkoelusi, atau ditahan di dalam kolom, atau terelusi tanpa terdeteksi.



Kita harus mengasumsi bahwa kita memperoleh respons detektor yang sama untuk setiap komponen

Untuk mengatasi kesulitan ini, maka kalibrasi detektor diperlukan.

**5. 2. Metoda Baku Luar (External Standard Method)**

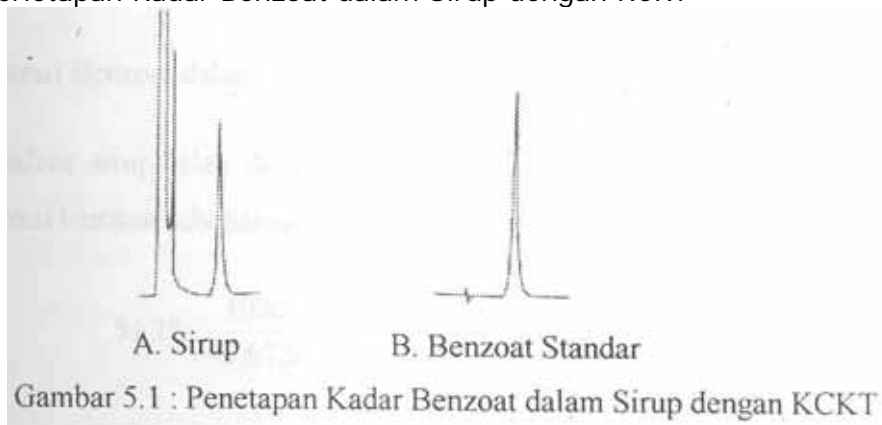
Pada metoda ini kita membuat suatu Baku/ Standard yang mengandung senyawa /senyawa-senyawa yang akan ditetapkan kadarnya, idealnya jumlah baku sama dengan jumlah bahan yang akan dianalisis, dan kita membandingkan kromatogram baku dengan kromatogram sampel. Dan kromatogram baku dapat dihitung suatu respons faktor untuk setiap Puncak yang diinginkan, respons faktor memberi informasi tentang konsentrasi komponen yang dihasilkan oleh satuan respons detektor (unit detector respons) :

$$\text{Responsiraktor} = \frac{\text{KonsentrasiKomponen}}{\text{lebaratauTinggiPuncak}} \dots\dots\dots (5a)$$

Kemudian untuk kromatogram sampel kita dapat menghitung konsentrasi dari setiap komponen yang diinginkan dengan cara mengalikan (multiplikasi) tinggi atau lebar puncak dengan respons faktor.

Bila bekerja dengan metoda ini, respons detektor harus tinier untuk setiap senyawa pada kisaran (range) konsentrasi yang digunakan, dan juga kita harus menginjeksikan (bila secara manual) jumlah yang sama untuk setiap komponen pada kedua kromatografi, sehingga berhasilnya operasi dari metoda ini tergantung pada kemampuan menginjeksi sampel dengan presisi yang bagus.

Contoh Perietapan Kadar Benzoat dalam Sirup dengan KCKT



- Kolom : Zorbax 5 μ C – 18,25 x 4,6 cm
- Fasa Gerak : CH<sub>3</sub>CN/0,005 mol dm<sup>-3</sup> pH 4,5 dapar asetat (15:85)
- Kecepatan Alir: 1,5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>; suhu 40°C
- Detektor : UV absorpsi 254 nm

Gambar 5. 1. menunjukkan beberapa hasil yang diperoleh pada penetapan kadar benzoat yang ditambahkan sebagai suatu preservatif di dalam sirup. Kromatogram adalah standar Natrium Benzoat (konsentrasi 0,07308 g dm<sup>-3</sup> dalam rasa gerak), Kromatogram A adalah sirup (konsentrasi 90,6726 g dm<sup>-3</sup> dalam rasa gerak). Kedua Kromatogram direkam dengan sensitivitas detektor yang sama. Lebar Puncak diukur menggunakan suatu integrator, yang mencetak (memprint) angka proporsional antara konsentrasi dengan lebar Puncak. Waktu retensi Benzoat

pada sirup sama dengan waktu retensi Benzoat standar. Lebar Puncak Benzoat yang diperoleh untuk :

standar 103 741                      Sampel sirup 72859

Menghitung persentase (dalam berat) untuk benzoat preservatif di dalam sirup adalah :

$$\begin{aligned} \text{ResponsFaktor} &= \frac{73,08\text{ppm}}{103741} \\ &= 7\,044 \times 10^{-4} \end{aligned}$$

Maka Konsentrasi Benzoat dalam sirup =  $72859 \times 7,044 \times 10^{-4} = 51,32 \text{ ppm}$   
 Sebelum dianalisis sirup telah diencerkan dengan rasa gerak sampai 1000 ml, maka konsentrasi benzoat sebenarnya adalah :

$$51,32 \times \frac{1000}{906726} = 566\text{ppm} = 0,0566\%$$

**5. 3. Metoda Baku Dalam (Internal Standard Method)**

Dalam metoda ini kita menambahkan ke dalam sampel sejumlah tertentu (jumlah yang diketahui) Zat standar (Baku Dalam). Kromatogram yang diperoleh dibandingkan dengan kromatogram sampel atau campuran senyawa dalam sampel. Metoda ini mempunyai keuntungan dibanding dengan metoda baku luar karena, ia mengkompensasi variasi volume injeksi dan juga untuk perubahan yang kecil dari sensitivitas detektor atau perubahan kromatografi yang bisa terjadi. Karena kita tidak perlu menginjeksi dalam jumlah yang sama setiap waktu, maka metoda ini biasanya mempunyai presisi yang lebih baik dari pada menggunakan baku luar. Dari kromatogram standar dapat dihitung respons faktor relatif sebagai berikut :

$$r = \frac{C/A}{C_s/A_s} \dots\dots\dots (5b)$$

- r                      = respons faktor relatif
- C                     = Konsentrasi Komponen Sampel
- A                     = Lebar atau Tinggi Puncak Komponen Sampel
- C<sub>s</sub>                   = Konsentrasi Baku Dalam
- A<sub>s</sub>                   = Lebar atau Tinggi Baku Dalam

Di dalam campuran sampel digunakan rumus berikut :

$$C_u = A_u \cdot r \cdot \frac{C_s}{A_s} \dots\dots\dots (5c)$$

- C<sub>u</sub>                   = Konsentrasi komponen sampel
- A<sub>u</sub>                   = Lebar atau Tinggi Puncak
- C<sub>s</sub>                   = Konsentrasi Baku Dalam
- A<sub>s</sub>                   = Lebar atau Tinggi Puncak Baku Dalam

Pendekatan lain adalah mengkoreksi setiap lebar puncak pada campuran yang diketahui dengan mengalikannya dengan respons faktor relatif. Hal ini menghasilkan lebar Puncak yang diperoleh dengan respons detektor yang sama

untuk setiap komponen. Komposisi dari campuran kemudian diperoleh dengan normalisasi lebar Puncak yang telah dikoreksi. Untuk bekerja dengan metoda ini sekali lagi kita harus yakin bahwa kita telah melihat semua komponen di dalam campuran sebagai sebagai Puncak-puncak yang terpisah pada kromatogram.

Sebagai contoh dari metoda ini ialah penetapan kadar aspirin (asam asetil salisilat) dan kafein menggunakan Baku Dalam Fenasetin. Tablet-tablet analgesik biasanya mengandung aspirin dan kafein, dan pada kesempatan ini dilakukan analisis kuantitatif tablet yang diperoleh dari perdagangan untuk memisahkan ketiga senyawa di atas, digunakan suatu metoda yang diambil dari literatur (G.B. Cox et. al., Journal of Chromatography 1976, 117,269-278).

Tablet analgetik yang dibeli di Apotik pada etiketnya tertera setiap tablet mengandung 325 mg Aspirin dan 50 mg Kafein.

### Prosedur kerja

Ambil dua Tablet tambahkan 0,0773 g Fenasetin kocok dengan 10 ml etanol selama 10 menit, dan tambahkan 10 ml ammonium format  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  dan campuran ini diencerkan dengan fase gerak sampai 100 ml. Tablet mengandung bahan-bahan pembawa, maka larutan ini harus disaring sebelum dikromatografi. Dengan kondisi percobaan yang digunakan ketiga senyawa tersebut dapat dipisahkan dalam waktu sekitar 3 menit (lihat Gambar 5.2)

Untuk merfghitung respons faktor relatif dilakukan penimbangan Standar dari senyawa-senyawa di atas dan diencerkan sehingga konsentrasinya mendekati konsentrasi sampel dan diinjeksikan ke sistem kromatografi sebanyak tiga kali, diperoleh data-data sebagaimana tercantum pada Tabe15. 2. berikut :

Tabel 5. 2 : Data campuran Standar Aspirin, Fenasetin dan Kafein

Nomor Injeksi		Aspirin	Fenasetin	Kafein
1.	Berat dalam campuran	0,6015	0,0765	0,0924
	Lebar Puncak	144 090	159 516	43 057
	r	?	1	?
2.	Lebar Puncak	143 200	163 164	43099
	r	?	1	?
3.	Lebar Puncak	121 297	139 796	36 564
	r	?	1	?

Dengan menggunakan Rumus (5b) maka akan diperoleh harga respons faktor relatif, sebagaimana disajikan pada Tabel 5.3. berikut :



Kolom : 5 silika SCX ; 12,5 cm x 4,6 mm  
 Fasa gerak : 0,05 mol dm<sup>-3</sup> HCOONH<sub>4</sub> + 10% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ; pH 4,8  
 Kecepatan alir: 2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>  
 Detektor : uV absorsi, 24 nm  
 Puncak : 1 = Aspirin , 2 = Fenasetin = , 3 = kafein

Tabel 5.3 : Data Hasil Perhitungan respons faktor relatif Aspirin dan Kafein

Nomor Injeksi	Berat dalam campuran	Aspirin	Fenasetin	Kafein
1.	Berat Dalam Campuran (g)	0,6015	0,0765	0,0924
	Lebar Puncak	144 090	159 516	43 057
2.	r	8,804	1	4,475
	Lebar Puncak	143 200	163 164	43 099
3.	r	8,959	1	4,573
	Lebar Puncak	121 297	139 796	36 564
	r	9,062	1	4,618
		8,908	1	4,555

Untuk menghitung kadar aspirin dan kafein dalam tablet, setelah dilakukan Prosedur kerja sebagaimana tercantum pada halaman 26, maka diinjeksi ke sistem kromatografi sebanyak dua kali dan diperoleh data yang disajikan pada Tabel 5.4 berikut :

Tabel 5.4 : Data Sampel Aspirin dan Kafein dengan buku dalam Fenasetin

No. Injeksi	Lebar Puncak		
	Aspirin	Fenasetin	Kafein
1.	157595	170804	50693
2.	153541	164174	48478

Hitung respons faktor relatif, kadar Aspirin dan Kafein dalam tablet . Persyaratan Farmakope untuk aspirin harus diantara 95% dan 105% sedangkan Kafein di antara 90 % dan 110 % . Apakah tablet tersebut memenuhi persyaratan ?

Dengan menggunakan Rumus (5c) maka diperoleh hasil sebagai berikut :

$$Cu = Au * r * \frac{Cs}{As}$$

Untuk Injeksi 1 :  
Kadar aspirin

$$Cu = 157595 * 8,908 * \frac{0,0773}{170804} = 0,6353 \text{ g dalam 2 tablet}$$

$$= 0,31765 \text{ g dalam 1 tablet}$$

Kadar Kafein

$$Cu = 50693 * 4,555 * \frac{0,0773}{170804} = 0,1045 \text{ g dalam 2 tablet}$$

$$= 0,0522 \text{ g dalam 1 tablet}$$

Untuk injeksi 2 :  
Kadar aspirin

$$Cu = 153541 * 8,908 * \frac{0,0773}{164174} = 0,6440 \text{ g dalam 2 tablet}$$

$$= 0,322 \text{ g dalam 1 tablet}$$

Kadar Kafein

$$Cu = 48478 * 4,555 * \frac{0,0773}{164174} = 0,1040 \text{ g dalam 2 tablet}$$

$$= 0,0520 \text{ g dalam 1 tablet}$$

$$\text{Kadar rata - rata Kafein} = \frac{0,31765 + 0,322}{2} = 0,3198 \text{ g}$$

$$\text{Presentase Aspirin} = 319,8/325 \times 100\% = 98,4 \%$$

$$\text{Kadar rata - rata Kafein} = \frac{0,0522 + 0,0520}{2} = 0,0521 \text{ g}$$

$$\text{Persentase Kafein} = 52,1/50 \times 100\% = 104,2 \%$$

	<b>Persyaratan Farmakope</b>	<b>Hasil Analisis KCKT</b>
Aspirin	95 % s/d 105 %	98,4 %
Kafein	90 % s/d 110 %	104,2 %

Berarti kadar aspirin dan Kafein memenuhi persyaratan Farmakope

### **DAFTAR PUSTAKA**

Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Farmakope Indonesia Edisi III 1979, Departemen Kesehatan R.I Jakarta

Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Farmakope Indonesia Edisi IV 1995, Departemen Kesehatan R.I Jakarta

Johnson, E. L. and Steven son, R (1978). Basic liquid chromatography. Varian, California

Lindsay, S. 1992. High performance liquid chromatography. second edition, John Wiley & Sons, Chischester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore

Rucker, G 1988. Instrumentelle pharmazeutische Analytik : lehbuch zu spektroskop, chromatograph.u. elektrochem. Analysemethoden/von G. Rucker. M. Neugebauer ; G.G. Wilems . Stuttgart : Wiss. Verl – Ges., Germany

Snyder, L. R and Kirkland J.J 1979. Introduction to modern liquid chromatography. second edition. John Wiley & Sons. Inc New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore