

LAPORAN PRAKTIKUM HPLC : ANALISA TABLET VITAMIN C

Nama : Juwita (127008003)

Rika Nailuvar Sinaga (127008004)

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 19 Desember 2012

Waktu Praktikum : 12.00 – 15.00 WIB

Tujuan :

- Praktikan dapat memahami prinsip kerja dari HPLC.
- Praktikan dapat menentukan kadar vitamin C dengan menggunakan metode HPLC.

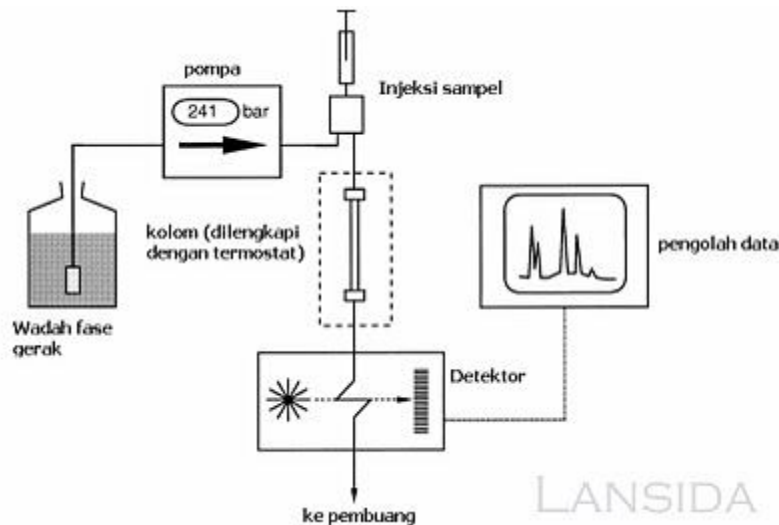
Pendahuluan :

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) atau biasa juga disebut dengan Kromatografi pertama sekali diperkenalkan oleh TSWETT pada tahun 1903 dan dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, HPLC merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis bahan obat, baik dalam bulk atau dalam sediaan farmasetik.

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*).

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam.

Diagram skematik sistem kromatografi cair seperti ini :



1. Wadah Fase gerak dan Fase gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembap (inert). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan bufer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fase normal ini kurang umum dibanding dengan fase terbalik.

2. Pompa

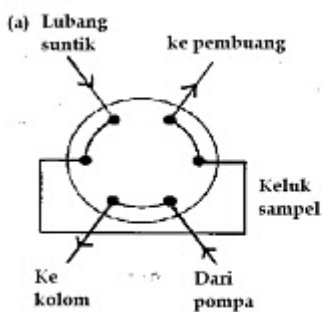
Pompa yang cocok digunakan untuk HPLC adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, Teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan

fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit.

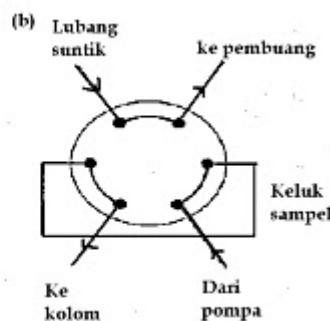
Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa dalam HPLC yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan.

3. Tempat penyuntikan sampel

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (sample loop) internal atau eksternal.



Posisi pada saat memuat sampel



Posisi pada saat menyuntik sampel

4. Kolom dan Fase diam

Ada 2 jenis kolom pada HPLC yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Kolom merupakan bagian HPLC yang mana terdapat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan solut/analit.

Kolom mikrobor mempunyai 3 keuntungan yang utama dibanding dengan kolom konvensional, yakni:

- Konsumsi fase gerak kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fase gerak lebih lambat (10 -100 µl/menit).
- Adanya aliran fase gerak yang lebih lambat membuat kolom mikrobor lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.
- Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat, karenanya jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

5. Detektor HPLC

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut:

1. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel.
2. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil.
3. Stabil dalam pengopersiannya.
4. Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.
5. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier).
6. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

Alat dan Bahan:

Alat	Bahan
High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Alliance 2695, Detector UV/VIS 2489 dilengkapi dengan kolom C-18, diameter 5 µl, ukuran 4,6 x 150 mm dan Detektor UV-VIS terhubung.	Vitamin C berbagai merek dan berbagai kadar (Vitacimin dan Xon-ce)
Labu ukur 10 ml dan 100 ml.	Aquabidest
Pipet otomatis dan pipet tetes.	Standar vitamin C
Tabung filter.	
Beker gelas.	
Tissue.	

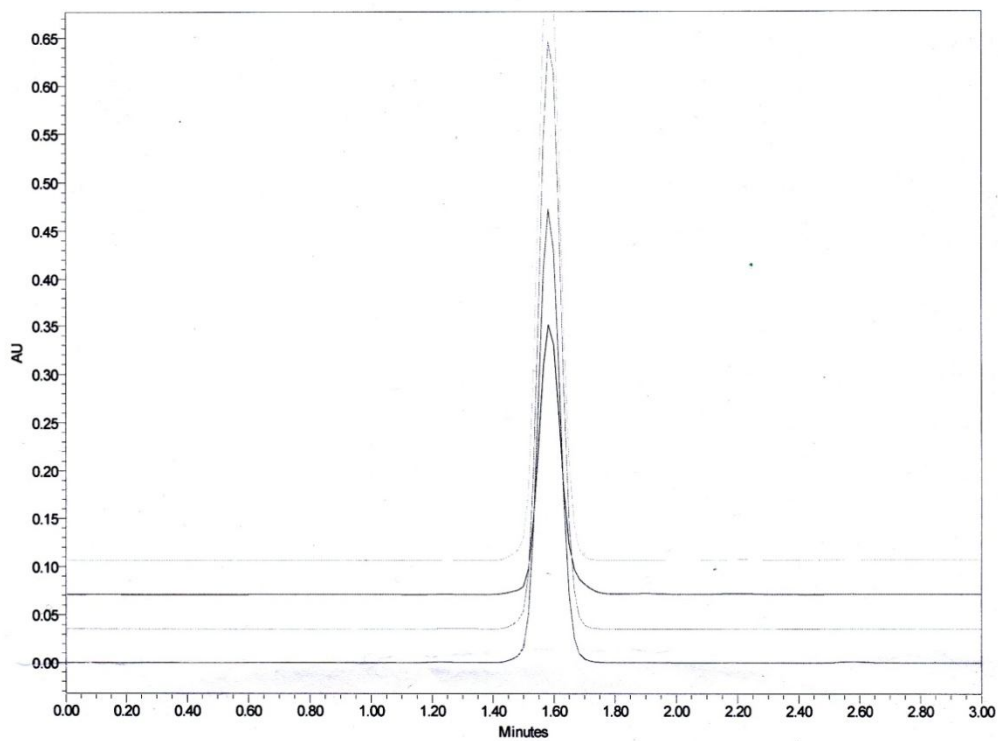
Cara kerja :

- Untuk standar, ambil dan timbang standar vitamin C sebanyak 0,005 gr dan encerkan dengan aquabidest sampai 100 ml. masukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- Kemudian ambil 10 ml dari larutan tersebut dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- Untuk sampel vitamin C, gerus halus masing-masing vitamin C yang tersedia (Vitacimin dan Xon-Ce).
- Ambil dan timbang vitamin C sebanyak 300 mg dan larutkan dengan 100 ml aquabidest (larutan 1). Lalu masukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- Ambil sebanyak 10 ml larutan 1 dan encerkan sampai 100 ml dengan aquabidest.
- Ambil sebanyak 10 ml dari larutan sebelumnya dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- Kemudian masukkan sampel dan standar ke dalam waterbath selama 5 menit agar larutan tercampur sempurna dan gelembung yang ada di dinding tabung hilang.
- Lalu pindahkan sampel dan standar ke dalam tabung effendorf dengan menggunakan spuit 5 cc.
- Masukkan sampel dan standar ke dalam alat HPLC dan tunggu hasilnya.

Hasil Praktikum:

Empower[®] 3
SOFTWARE

Peak Summary Report



— Sample Name: Sampel A; Date Acquired: 12/19/2012 3:33:00 PM WT; Vial: 5; Injection: 1
— Sample Name: Sampel B; Date Acquired: 12/19/2012 3:36:44 PM WT; Vial: 6; Injection: 1
— Sample Name: Sampel C; Date Acquired: 12/19/2012 3:40:28 PM WT; Vial: 7; Injection: 1
— Sample Name: Sampel D; Date Acquired: 12/19/2012 3:44:11 PM WT; Vial: 8; Injection: 1

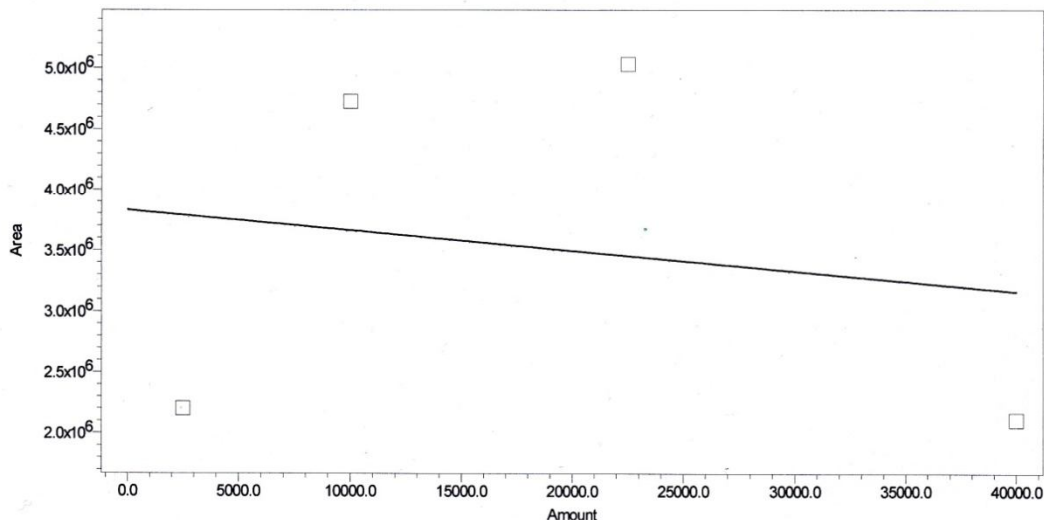
Error Log

Peak Summary w Statistics group contains information that doesn't match the data being reported.

Reported by User: System
Report Method: Peak Summary Report
Report Method ID: 1010
Page: 1 of 1

Project Name: Biomedik siang
Date Printed:
12/19/2012
4:18:48 PM Asia/Jakarta

Processing Method:	Multi std biomedik siang	System:	2695_2489
Processing Method ID:	1047	Channel:	W2489 ChA
Calibration ID:	1048	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 254nm
Date Calibrated:	12/19/2012 4:08:36 PM WT		



Peak Name: Peak1; RT: 1.585; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 1049; R: 0.173542; R²: 0.030117; Weighting: None; Equation: $Y = -1.67e+001 X + 3.83e+006$; Normalized Intercept/Slope: -10.783267; RSD(E): 54.155268

Peak: Peak1

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation
1	Standart A	1050	Peak1	1	2500.000	2200446.387	97459.353	3798.37
2	Standart B	1051	Peak1	2	10000.000	4724681.473	-53602.758	-636.03
3	Standart C	1052	Peak1	3	22500.000	5031279.536	-71951.029	-419.78
4	Standart D	1053	Peak1	4	40000.000	2106284.664	103094.434	157.74

Peak: Peak1

	Manual	Ignore		Manual	Ignore		Manual	Ignore		Manual	Ignore
1	No	No	2	No	No	3	No	No	4	No	No

Reported by User: System
Report Method: LC Calibration Report
Report Method ID: 1007
Page: 1 of 2

Project Name: Biomedik siang
Date Printed:
12/19/2012
4:08:57 PM Asia/Jakarta

Pembahasan :

Dari hasil praktikum diatas di dapati hasil yang gagal karena tidak di dapati persamaan linear yang akan digunakan untuk menghitung kadar sampel vitamin C. Hal ini disebabkan karena kesalahan dalam melakukan pengenceran (human error). Pada kurva yang di tampilkan di atas menunjukkan peak kurva yang berbeda-beda di karenakan kadar vitamin C yang diukur berbeda-beda.

Kesimpulan:

- Pengenceran merupakan faktor yang sangat penting karena mempengaruhi kadar/konsentrasi vitamin C.
- Seharusnya semakin tinggi peak dari kurva yang terlihat maka semakin besar konsentrasi vitamin C.
- HPLC merupakan suatu metode yang baik untuk menganalisa suatu produk obat.

Saran :

- Praktikan harus lebih berhati-hati dan teliti dalam melakukan pengenceran.
- Praktikan dapat mengukur kadar dari obat yang lain dengan menggunakan HPLC.