

Praktium HPLC; Analisa Tablet Vitamin C

Tujuan :

- i) Praktikan memahami teknik HPLC
- ii) Praktikan dapat menentukan kadar berbagai tablet Vitamin C menggunakan metoda HPLC

Pengantar

kromatografi pertama kali diperkenalkan oleh TSWETT pada tahun 1903, ia menggunakannya untuk pemisahan senyawa-senyawa berwarna dan nama kromatografi diambil dari senyawa-senyawa yang berwarna. Senyawa berwarna yang di gunakan TSWETT sebagai sampel adalah pigmen-pigmen daun, karena warnanya maka cepat terlihat lokasinya dalam kolom. Saat ini kromatografi tidak lagi digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa berwarna saja. Senyawa-senyawa tidak berwarna dapat dilihat melalui floresensi dalam sinar ultraviolet.

Pada dasarnya semua teknik kromatografi menggunakan dua fasa, yaitu fasa diam (stationary) dan fasa gerak (mobile); pemisahan-pemisahan tergantung pada gerakan relative dari dua fasa ini. Perlu diperhatikan bahwa fasa gerak yang digunakan tidak mempunyai efek terhadap fasa diam atau hanya sangat lemah diserap oleh fasa diam.

Dalam industri farmasi, HPLC secara rutin digunakan untuk menganalisis produk obat. Pabrikan harus memastikan bahwa setiap produk memenuhi syarat yang ditentukan. Sebagai analis QC, Anda akan menganalisis beberapa tablet C Vitamin (asam askorbat) untuk memastikan konsentrasi tablet Vitamin C tersebut sesuai label dan memiliki jumlah yang konsisten dari vitamin C dalam setiap tablet.

Peralatan

Alat *High Performance Liquid Chromatographi* (HPLC) yang digunakan yaitu **Alliance 2695**, Detector **UV/VIS 2489** dilengkapi dengan kolom C-18, diameter 5 ul, ukuran 4,6 x 150 mm dan Detektor UV-Vis yang terhubung, labu ukur dan alat-alat glass lainnya.

Bahan

Standard Vitamin C (Asam askorbat), Tablet Vitamin C dalam bentuk tunggal, Mis: Vitacimin (**Setiap kelompok harus menyediakan sampel tablet Vitamin C dengan merek yang berbeda**), ddH₂O, Methanol, H₂SO₄.

Persiapan fase gerak dan alat HPLC

- Siapkan 500 mL larutan 55% air: metanol 45% dan tambahkan 6 tetes 6 M H₂SO₄.
- Hidupkan komputer dan alat HPLC, set sesuai dengan protokol alat HPLC tersebut dan sesuai dengan kondisi analisa yang digunakan.

Persiapan Larutan Induk Vitamin C (asam askorbat)

Pembuatan Larutan Baku Vitamin C 1000 ppm (Kelompok I)

Siapkan larutan baku Vitamin C 1000 ppm sebanyak 50 ml menggunakan labu ukur 50 ml. Berapa banyak Vitamin C baku yang harus ditimbang

Pembuatan Larutan Baku Vitamin C 500 ppm (Kelompok II)

Siapkan larutan baku Vitamin C 500 ppm sebanyak 50 ml menggunakan labu ukur 50 ml. Berapa banyak larutan baku Vitamin C 1000 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan baku 500 ppm.

Pembuatan Serial Larutan Standard Vitamin C

Siapkan pengenceran berlipat ganda (*doubling dilution*) dari larutan baku Vitamin C 500 ppm.

Caranya untuk doubling dilution

- 1) Sediakan 6 tabung reaksi, beri tanda 1 s/d 6. Tambahkan 2 ml akudes masing-masing pada tabung reaksi 2 s/d 6.
- 2) Pada tabung reaksi 1 tambah 4 ml larutan stok.
- 3) Pada tabung reaksi 2 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 1. Campur dengan baik.
- 4) Pada tabung reaksi 3 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 2. Campur dengan baik.

Buat pengenceran larutan stok selanjutnya dengan cara yang sama (yaitu 2 ml larutan dari tabung reaksi sebelumnya ditambahkan ke tabung reaksi yang selanjutnya). Lihat tabel dibawah sebagai ringkasaan *doubling dilution*.

nomor tabung	1	2	3	4	5	6
pengenceran urea/glukosa	stok	1:1	1:3	1:7	1:15	1:31
faktor	-	2	4	8	16	32

Masing-masing larutan disaring menggunakan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 ml, beri label. Larutan standard dalam botol vial di degassing selama ± 5 menit.

Persiapan panjang gelombang Max Vitamin C

- Siapkan Vitamin C standar faktor 8 dan tentukan panjang gelombang absorbansi maksimum untuk Vitamin C menggunakan spektrofotometer UV / Vis dengan $\lambda = 200-400$ nm.
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk detector HPLC yang digunakan.

Persiapan sampel

- Sediakan beberapa tablet vitamin C berbeda, gerus halus masing-masing tablet tersebut
- Larutkan 300 mg dalam air dan encerkan sampai 100,0 mL air. (**JANGAN memanaskan solusi**).
- Ambil alikuot 10,00 mL larutan di atas dan encerkan sampai 100,0 mL dengan air
- Larutan sampel disaring dengan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 ml, kemudian di degassing selama ± 5 menit
- Ulangi untuk sampel vitamin C lainnya.

Analisis Vitamin C

- Siapkan kurva kalibrasi dan tentukan konsentrasi vitamin C setiap sampel
- Hitung standar deviasi relatif dan rata-rata untuk lima hasil sampel.
- Sampel tablet harus memiliki nilai rata-rata (Assay) dalam 10% dari klaim label dan standar deviasi relatif (Keseragaman Content) harus kurang dari 5% untuk tablet yang akan diteruskan kepada konsumen. Apakah tablet lulus?