

HIGH PERFORMANCE LIQUIDCHROMATOGRAPHY (HPLC) ; ANALISA TABLET VITAMIN C

Oleh: Jenny Novina Sitepu – Liza Mutia

Waktu Praktikum:

Kamis, 20 Desember 2012

Jam 08.00 – 17.00 WIB

I. Tujuan Praktikum :

Untuk mengetahui perbedaan kadar Vitamin C antara sampel-sampel Vitamin C yang beredar di masyarakat serta mengetahui apakah konsentrasi Vitamin C yang ada sesuai dengan yang tercantum pada labelnya dengan menggunakan metode HPLC (High Performance Liquid Chromatograph).

II. Dasar Teori

A. HPLC

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan komponen-komponen campuran dimana cuplikan berkesetimbangan diantara dua fasa, yaitu fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak yang membawa cuplikan dan fasa diam yang menahan cuplikan secara selektif. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan cairan sebagai fasa gerak dan fasa diamnya. Kromatografi didasarkan atas distribusi partisi sampel (komponen) diantara fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak yaitu fasa yang bergerak dengan arah yang telah ditentukan. Fasa gerak bergerak melalui fasa diam. Sedangkan fasa diam adalah fasa yang secara tetap tidak bergerak. Prinsip kerja HPLC adalah pemisahan komponen analit berdasarkan kepolarannya, artinya komponen pada suatu analit (sampel) akan terpisah berdasarkan sifat kepolaran masing-masing komponen dalam sampel, apakah kepolarannya lebih mirip dengan fasa diam, maka dia akan tertinggal di fasa diam atau bergerak lebih lambat, ataukah kepolarannya lebih mirip dengan fasa gerak sehingga dia akan bergerak terdistribusi lebih jauh dan lebih cepat. Dengan bantuan pompa, fasa gerak cair dialirkan melalui kolom detector. Cuplikan (sampel) dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara solut-solut terhadap fasa diam. Solut-solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam, maka komponen tersebut akan keluar lebih lama. Setiap campuran komponennya yang keluar kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Kromatogram HPLC serupa dengan kromatogram kromatografi gas, dimana jumlah peak menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer digunakan untuk mengontrol kerja sistem

HPLC dan mengumpulkan serta mengolah data hasil pengukuran. (Hendayana, Sumar. (2006): 69)

Metode HPLC dapat digunakan untuk analisa kuantitatif dan sekaligus kualitatif. Untuk analisa kualitatif dengan membandingkan kromatogram sampel dengan kromatogram baku pembanding berdasarkan waktu retensinya. Sedangkan untuk analisa kuantitatif dapat digunakan dengan persamaan :

$$C_x = A_x / A_p \times C_p$$

Keterangan :

A = Peak area = Luas puncak

C = Konsentrasi

X = sampel

P = pembanding

Atau jika ingin mendapatkan data yang lebih valid dapat pula ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar.

B. Vitamin C

Vitamin yang tergolong larut dalam air adalah vitamin C dan vitamin-vitamin B kompleks. Vitamin C dapat berbentuk sebagai asam L-askorbat dan asam L-dehidroaskorbat. Keduanya mempunyai keaktifan sebagai vitamin C. Asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversibel menjadi asam L-dehidroaskorbat. Asam L-dehidroaskorbat secara kimia sangat labil dan dapat mengalami perubahan lebih lanjut menjadi asam L-diketogulonat yang tidak memiliki keaktifan vitamin C lagi (Winarno, 1997). Dalam larutan air vitamin C mudah dioksidasi, terutama apabila dipanaskan. Oksidasi dipercepat apabila ada tembaga atau suasana alkalis. Kehilangan vitamin C sering terjadi pada pengolahan, pengeringan, dan cahaya. Vitamin C penting dalam pembuatan zat-zat interseluler, kolagen. Vitamin ini tersebar keseluruh tubuh dalam jaringan ikat, rangka, matriks, dan lain-lain. Vitamin C berperan penting dalam hidrosilasi prolin dan lisin menjadi hidroksiprolin dan hidroksilisin yang merupakan bahan pembentukan kolagen tersebut (Poedjiadi, 1994).

III. Prosedur Kerja

Alat dan Bahan

Alat :

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) **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.
2. Gelas Ukur
3. Labu ukur 100 ml
4. Pipet tetes
5. Corong
6. Neraca Analitik
7. Vorteks
8. Mortir dan stamper
9. Batang pengaduk

Bahan :

1. Vitamin C Pot (25 mg)
2. Biferce (1000 mg)
3. C IPI (50 mg)
4. Xon ce (500 mg)
5. Vitacimin (500 mg)
6. Aquadest
7. Vitamin C standart
8. Methanol
9. Asam Oksalat

Cara kerja

1. Pembuatan Fasa Gerak (Pelarut)
 - 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
2. Pembuatan larutan standart Vitamin C
 - Siapkan 0,25 mg / mL Vitamin C standar diencerkan dengan air dan di paskan hingga mencapai 100 ml.

- Siapkan 0,20 mg / mL Vitamin C standar diencerkan dengan air dan di paskan hingga mencapai 100 mL.
 - Siapkan 0,15 mg / mL Vitamin C standar diencerkan dengan air dan di paskan hingga mencapai 100 mL.
 - Siapkan 0,10 mg / mL Vitamin C standar diencerkan dengan air dan di paskan hingga mencapai 100 mL.
 - Siapkan 0,05 mg / mL Vitamin C standar diencerkan dengan air dan di paskan hingga mencapai 100 mL.
3. Pembuatan Deret Larutan Standar Vitamin C
- Sediakan beberapa tablet vitamin C berbeda, gerus halus masing-masing tablet tersebut
 - Larutkan 300 mg (massa terdekat 0,1 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
 - Ulangi untuk sampel vitamin C lainnya.
4. Pengoperasian Alat
- Alat HPLC disambungkan dengan sumber listrik yang benar sesuai dengan kapasitas alat.
 - Tombol 'ON ' ditekan pada sakelar listrik.
 - Botol diisi fasa gerak dengan volume yang memadai dan botol penampung dikosongkan.
 - Tombol,ON'
 - pada alat ditekan secara berturut-turut untuk power ,detector dan pompa.
 - Dilakukan pemrograman alat dengan komputer, sesuai dengan instruksi dalam komputer.
 - Dipilih mode sesuai dengan parameter kondisi instrument.
 - Larutan standar diinjeksikan (mulai dengan konsentrasi rendah),selanjutnya larutan sampel diinjeksikan pula.
 - Hasil pengukuran dicetak, dicatat kondisi percobaannya.
 - Pompa dimatikan
 - File ditutup, komputer dimatikan.
 - Tombol'OFF'pada alat ditekan secara berturut-turut untuk pompa,detector dan power.
 - Alat HPLC diputuskan dari sumber arus listrik.

IV. Hasil dan Pembahasan

A. Hasil

Dari hasil HPLC didapat data kadar konsentrasi beberapa sampel vitamin c yang terlihat pada data dibawah ini :

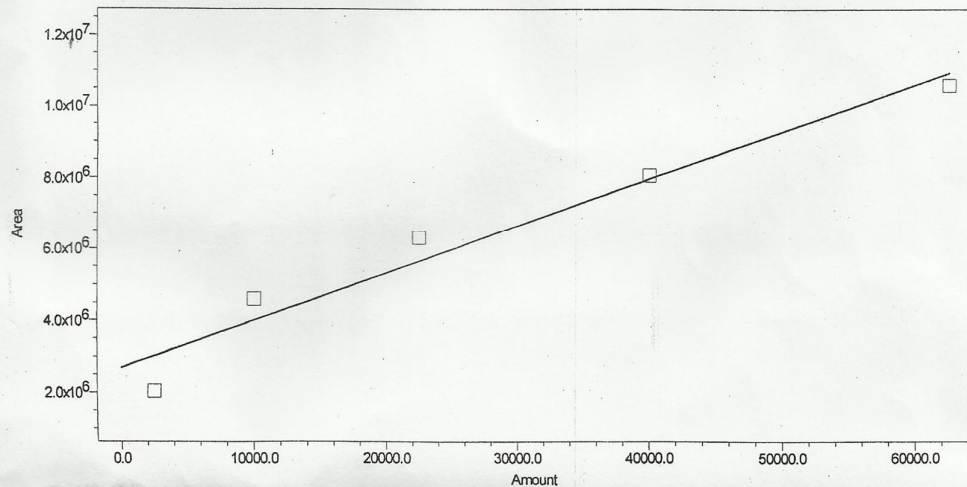
Tabel. 1. Perbandingan Konsentrasi Beberapa Sampel Vitamin C

Sampel	Nama	Amount (ppm)	Kadar pada Label
1	Vit C Pot	-	25 mg
2	Vit C Biferce	410,8 ppm	1000 mg
3	Vit C IPI	402,9 ppm	50 mg
4	Xon ce	28,7 ppm	500 mg
5	Vitacimin	33,9 ppm	500 mg

Dari hasil HPLC yang didapatkan bahwa konsentrasi vitamin C tablet yang berasal dari pot tidak dapat diketahui, konsentrasi vitamin C tablet yang berasal dari bahan suplemen Biferce adalah 410,8 mg/l, Konsentrasi vitamin C tablet yang berasal dari IPI adalah 402,9 mg/l, Konsentrasi vitamin C tablet dari bahan suplemen Xon ce adalah 28,7 mg/l dan konsentrasi vitamin C tablet dari bahan suplemen Vitacimin adalah 33,9 mg/l.

Processing Method:	Multi St Biomedik Pagi	System:	2695_2489
Processing Method ID:	1087	Channel:	W2489 ChA
Calibration ID:	1088	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 254nm
Date Calibrated:	12/19/2012 2:54:38 PM WIT		

Calibration Plot group contains no data.



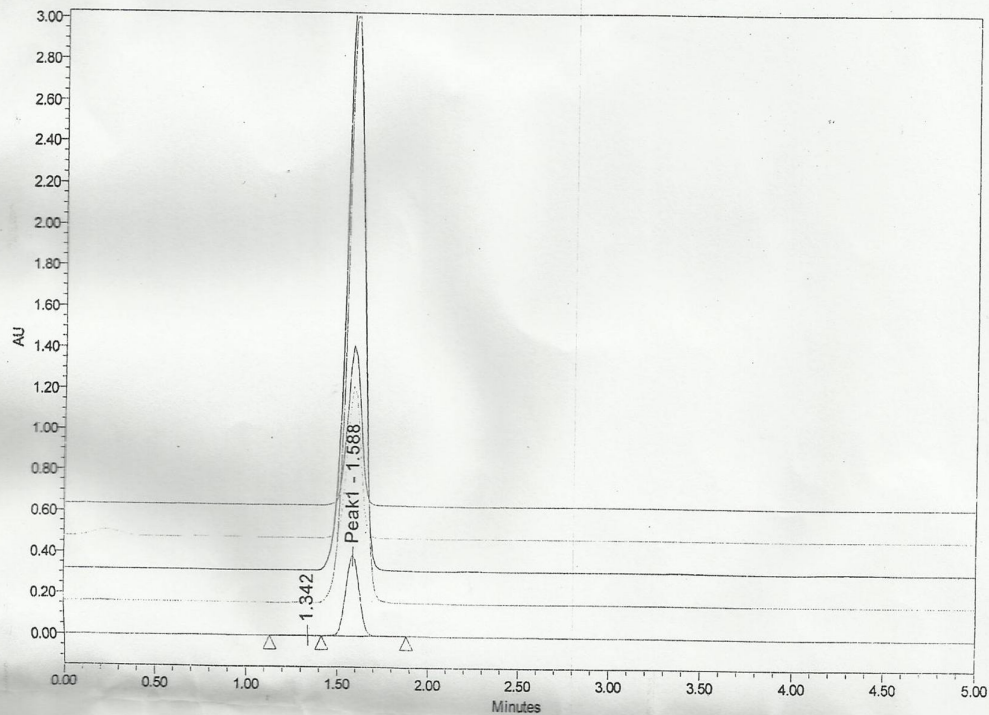
Peak Name: Peak1; RT: 1.586; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 1089; R: 0.977702; R²: 0.955902; Weighting: None; Equation: $Y = 1,32e+002 X + 2.69e+006$; Normalized Intercept/Slope: 0.627822; RSD(E): 12.515451

Peak: Peak1

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation
1	Standart 1	1090	Peak1	1	2500.000	2033196.598	-4974.901	-299.00
2	Standart 2	1091	Peak1	2	10000.000	4595027.769	14466.066	44.66
3	Standart 3	1092	Peak1	3	22500.000	6304546.595	27439.091	21.95
4	Standart 4	1093	Peak1	4	40000.000	8056170.973	40731.641	1.83
5	Standart 5	1094	Peak1	5	62500.000	10573922.670	59838.102	-4.26

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

Project Name: Biomedik 12 pagi
Date Printed:
12/19/2012
4:00:31 PM Asia/Jakarta



— Sample Name: Sampel 1; Date Acquired: 12/19/2012 12:42:58 PM WT; Vial: 6; Injection: 1
— Sample Name: Sampel 2; Date Acquired: 12/19/2012 12:48:43 PM WT; Vial: 7; Injection: 1
— Sample Name: Sampel 3; Date Acquired: 12/19/2012 12:54:27 PM WT; Vial: 8; Injection: 1
— Sample Name: Sampel 4; Date Acquired: 12/19/2012 1:00:09 PM WT; Vial: 9; Injection: 1
— Sample Name: Sampel 5; Date Acquired: 12/19/2012 1:05:54 PM WT; Vial: 10; Injection: 1

Peak Summary with Statistics

Name: Peak1

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Sampel 1	6	1	Peak1	1.588	1981862	99.70	390019		ppm
2	Sampel 2	7	1	Peak1	1.595	18930571	99.46	2891172	410.8	ppm
3	Sampel 3	8	1	Peak1	1.588	18614825	99.42	2816141	402.9	ppm
4	Sampel 4	9	1	Peak1	1.587	3822665	90.97	737558	28.7	ppm

Reported by User: System
Report Method: Peak Summary Report
Report Method ID: 1010
Page: 1 of 2

Project Name: Biomedik 12 pagi
Date Printed:
12/19/2012
3:55:03 PM Asia/Jakarta

Peak Summary with Statistics

Name: Peak1

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
5	Sampel 5	10	1	Peak1	1.586	4029159	99.78	776211	33.9	ppm
Mean					1.589					
Std. Dev.					0.004					
% RSD					0.22					

Peak Summary with Statistics

Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Sampel 1	6	1	1.342	5865	0.30	686
2	Sampel 2	7	1	1.307	17363	0.09	2617
3	Sampel 2	7	1	0.198	28141	0.15	2826
4	Sampel 2	7	1	4.352	19967	0.10	1116
5	Sampel 2	7	1	1.930	17592	0.09	2901
6	Sampel 2	7	1	2.038	19647	0.10	3140
7	Sampel 3	8	1	1.261	5172	0.03	519
8	Sampel 3	8	1	2.232	21858	0.12	2933
9	Sampel 3	8	1	3.392	28999	0.15	2871
10	Sampel 3	8	1	4.300	51673	0.28	2748
11	Sampel 4	9	1	0.839	74271	1.77	4511
12	Sampel 4	9	1	0.235	297417	7.08	30049
13	Sampel 4	9	1	1.341	7563	0.18	738
14	Sampel 5	10	1	2.417	3472	0.09	252
15	Sampel 5	10	1	1.338	5576	0.14	608
Mean				1.901			
Std. Dev.				1.279			
% RSD				67.25			

Reported by User: System
 Report Method: Peak Summary Report
 Report Method I: 1010
 Page: 2 of 2

Project Name: Biomedik 12 pagi
 Date Printed:
 12/19/2012
 3:55:03 PM Asia/Jakarta

B. Pembahasan

Penentuan peak vitamin C pada kromatogram larutan standar ini dilakukan dengan mengamati peak yang waktu retensinya relatif tetap atau sama pada setiap konsentrasi larutan standar, serta memerhatikan luas area peaknya. Karena larutan standar adalah larutan vitamin C maka kadar vitamin C di dalamnya adalah yang terbesar dibanding komponen lain sebagai hasil penguraian vitamin C atau senyawa lainnya (pengotor). Dari penentuan ini, dari hasil HPLC diketahui bahwa dari larutan standart vitamin C menunjukkan peak dengan waktu retensi rata 1,586 menit , sedangkan berasal dari 5 (lima) sampel yang kita periksa tampak peak yang muncul memiliki waktu retensi rata-rata 1,589 menit (mendekati dengan peak vitamin C pada standar). Peak ini ditafsirkan sebagai peak vitamin C dalam sampel, dari data HPLC juga didapat standart deviasi rata rata waktu retensi 0,004 (derajat kesalahannya sedikit) oleh sebab itu dapat disimpulkan sampel yang diperiksa adalah memang benar mengandung vitamin C.

Dari pemeriksaan sampel vitamin C dengan metoda HPLC kosentrasi vitamin C yang didapat terlihat bahwa kosentrasi vitamin C yang didapat sangat tidak sesuai, hal ini dapat disebabkan oleh sewaktu penimbangan vitamin C yang tidak akurat, pengenceran sampel yang berlebih dan tidak mengelap sisa air pengeceran yang terdapat pada dinding tabung, adanya gelembung pada sampel pemeriksaan yang sudah dilarutkan atau mungkin saja salah mencatat urutan vitamin C yang diperiksa sehingga menyebabkan hasil yang tidak sesuai.

V. Kesimpulan

1. Dari hasil pemeriksaan vitamin C dengan metode HPLC dapat disimpulkan bahwa memang benar sampel yang diperiksa adalah vitamin C (dimana peak rata retensi waktunya sudah mendekati antara standart dengan sampel)
2. Kosentrasi vitamin C yang diperiksa pada 5 sampel yaitu kosentrasi vitamin C tablet yang berasal dari pot tidak dapat diketahui. Hali ini dapat terjadi karena kosentrasi vitamin C dalam sampel terlalu kecil sehingga tidak terbaca oleh alat.
3. Kosentrasi vitamin C kelima sampel yang diperoleh dari alat tidak sesuai dengan kosentrasi yang diklaim pada label.

VI. Saran

1. Sebaiknya setiap pemeriksaan sampel tablet vitamin C harus dilakukan minimal 3 kali pemeriksaan dan hasilnya diambil rata-rata pemeriksaan.
2. Sebaiknya lebih banyak mengindari kesalahan dalam prosedur kerja dengan menggunakan metode HPLC (Human error) oleh sebab itu praktikan lebih teliti dan lebih sering melaksanakan prosedur pemeriksaan ini.
3. Coba metode pemeriksaan lain untuk membandingkan perbedaan hasil kosentrasi antara metode HPLC dengan metode tersebut.