

C.2.4. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*



Pressure

KCKT : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

- Fase gerak : Kromatografi cair
- Sistem peraralatan : Kromatografi kolom → fase diam ter “*packing*” didalam kolom.
- Proses pemisahan : Kromatografi adsorpsi atau partisi butiran adsorben :
 - zat padat murni → adsorpsi
 - disalut dengan cairan → partisi.

- Perkembangan KCKT

- Asas proses pemisahan adsorpsi dan partisi



berasaskan

- afinitas
- filtrasi gel
- ion yang berpasangan
- Proses pemisahan tetap dilaksanakan di dalam kolom, disertai pemakaian pelarut pengembang dengan tekanan tinggi

PEMILIHAN SISTEM KROMATOGRAFI

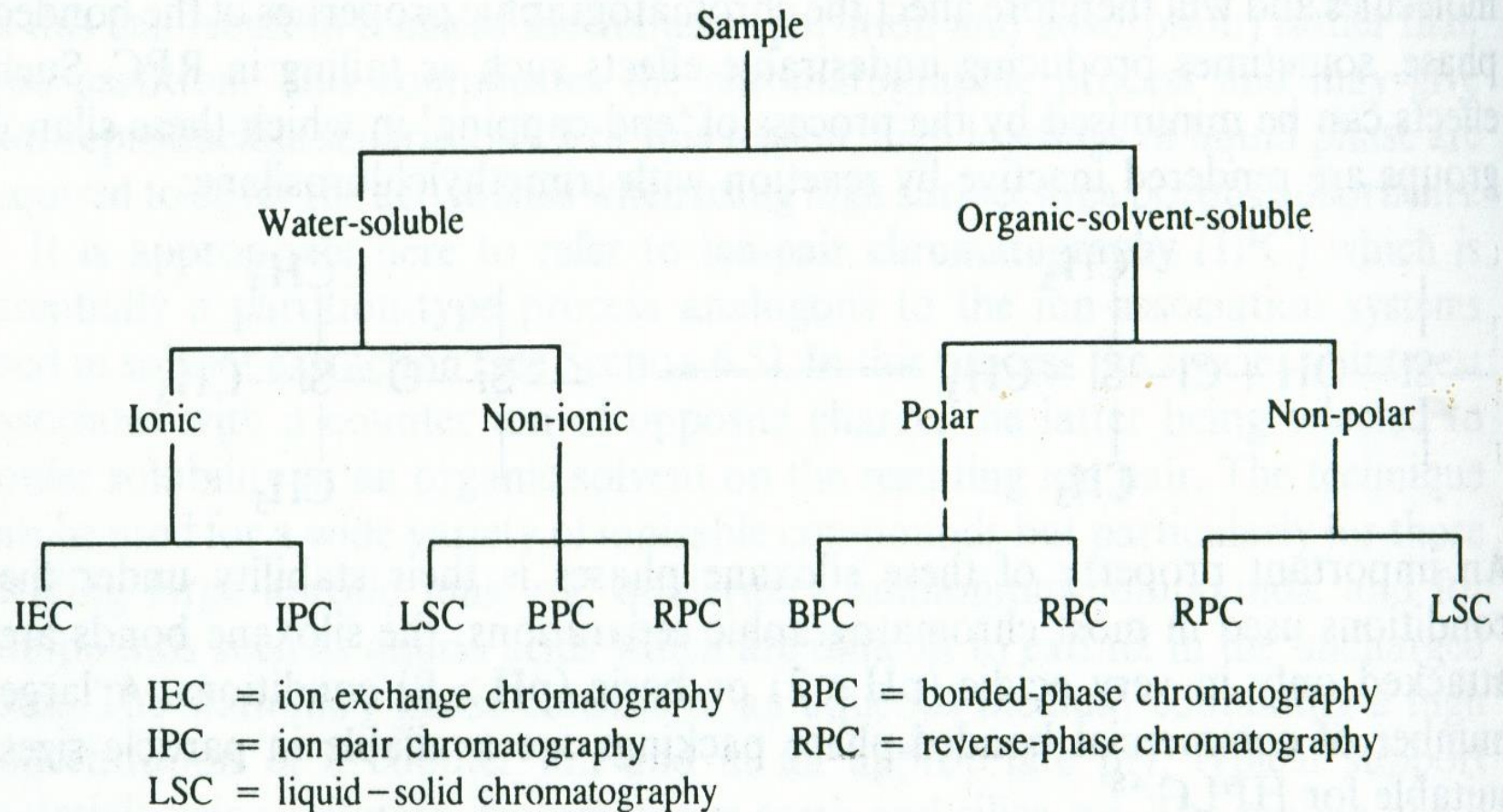


Fig. 8.1

- **Tujuan analisis dengan KCKT :**

Didapatnya pemisahan yang baik dalam waktu proses yang relatif singkat.

Hal yang perlu dipersiapkan dan diperhitungkan untuk Penatalaksanaannya antara lain :

1. Dipilih pelarut pengembang / pelarut pengembang campur yang sesuai untuk komponen yang dipisahkan
2. Berkaitan dengan pemilihan pelarut pengembang, maka kolom yang dipakai juga harus diperhatikan
3. Detektor yang memadai
4. Pengetahuan dasar KCKT yang baik serta pengalaman dan ketrampilan kerja yang baik.

Kalau analisis dengan KCKT dapat terlaksana dengan baik maka dapat dikatakan derajatnya sama dengan Kromatografi Gas cair yang memakai kolom kapiler.

- KCKT berbeda dari Kromatografi cair klasik :
 - menggunakan kolom dengan diameter umumnya kecil, 2 – 8 mm dengan ukuran partikel penunjang 50 μm
 - laju aliran dipertinggi dengan tekanan yang tinggi.
- Bila dibandingkan terhadap kromatografi gas cair (KGC),
 - KCKT lebih bermanfaat untuk isolasi :
 - zat tidak mudah menguap
 - zat yang secara termal tidak stabil
 - KGC kecepatan dan kesederhanaan lebih baik
 - Kedua teknik ini komplementer satu sama lainnya, keduanya efisien, sangat selektif hanya memerlukan sampel berjumlah sedikit serta dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

- **KCKT :**
 - Fase diam : mikro partikel (ukuran sangat kecil) dengan jarak ukuran pendek.
 - Tekanan tinggi → fase gerak dapat laju
 - Pada KCKT preparatif ukuran partikel antara 5 – 30 μm
 - Harga k' kecil → volume puncak kecil → senyawa dalam eluat konsentrasi tinggi
 - Pemurnian campuran rumit dengan urutan :
Pemisahan preparatif – pemisahan semipreparatif – pemisahan analitik – produk.
 - Banyak digunakan untuk pemisahan senyawa bahan alam.
 - Umumnya untuk pemurnian akhir.

- Elusi umumnya isokratik, hanya kadang-kadang gradien.
- Senyawa sangat polar / atau sangat larut air, lebih baik dipisahkan dengan kolom untuk fase balik.
- Adsorben yang telah digunakan dapat dicuci dengan metanol.

→ Teknik yang harus dipilih ???

Untuk ini perlu dipertimbangkan beberapa prinsip dasar berikut :

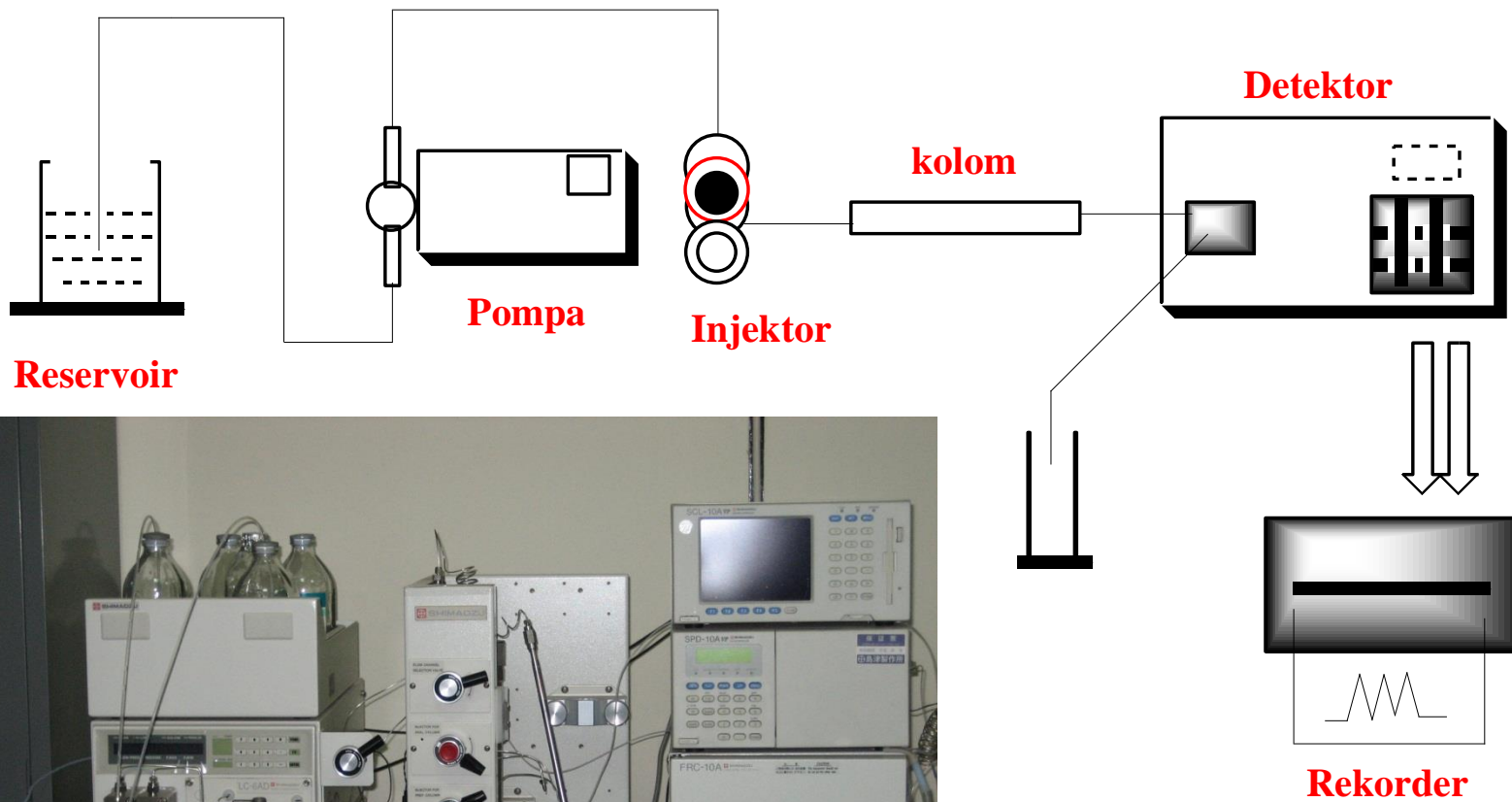
- Harga N (Jumlah pelat teori) yang besar
- Harga H (JSPT) yang kecil
- Harga L (panjang kolom) yang pendek
- Harga t_R (waktu tambat) yang singkat

Keuntungan

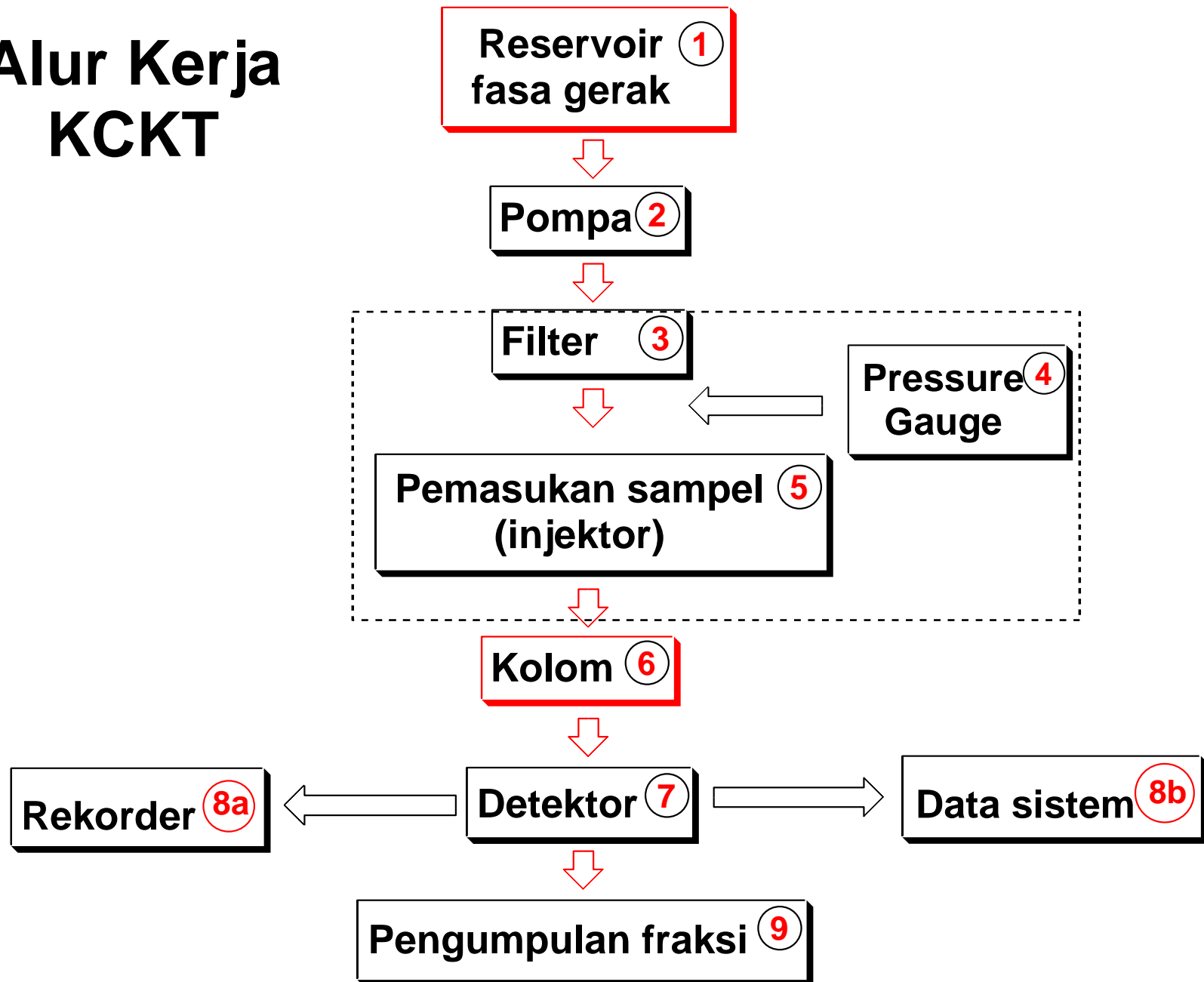
- Aliran eluen tetap (konstan)
- Analisa cepat
- Daya pisah tinggi
- Kolom dapat dipakai kembali
- Sampel sedikit
- Analisa kualitatif dan kuantitatif

Kerugian

- Sangat mahal
- Pelarut harus murni (Lichrosolv)
- Kolom harus banyak
- Electric power



Alur Kerja KCKT



1. Reservoir Pelarut

- Pelarut tidak mengandung gas udara. Bila ada gas, aliran pelarut menjadi diskontinyu
- Sistem pelarut (i). Isokratik (satu jenis)
(ii). gradient / landaian (lebih satu jenis)

2. Pompa

- Untuk mengalirkan pelarut sebagai fasa mobil dengan kecepatan dan tekanan tetap

GANGGUAN pada pompa :

- Pelarut yang tidak difiltrasi
- Adanya elektrolit klorida yang tinggi pd pH rendah yang mengakibatkan terbentuk **endapan**
- Tekanan pompa tergantung ukuran kolom dan viskositas pelarut

Kolom [\varnothing 5 mm kecep. alir 1 - 2 mL/menit;
..... tekanan 400 bar]

3. Filter (Penyaring)

- Penyaringan pelarut yang mengandung impurities

4. Pressure Gauge

- Stabilisator tekanan

5. Injektor

- Tempat sampel dimasukkan/injeksi
- Injeksi dapat dilakukan melalui septum atau non septum

6. Kolom

- Kolom merupakan jantung alat kromatografi.
Kolom dapat dibagi menjadi 2 macam, yaitu :

a. Kolom analitik

Kolom yg mempunyai garis tengah dalam 2-6 mm,
panjangnya untuk partikel biasa 50-100 cm
untuk mikropartikel 10 - 30 cm

b. Kolom preparatif

Bergaris tengah 6 mm atau lebih dgn panjang 25-100 cm
Biasanya terbuat dari baja nirkarat dan
dipakai pada suhu kamar.

7. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi adanya komponen di dalam kolom dan mengukur jumlahnya. Detektor yang paling banyak dipakai adalah **detektor UV-Vis (200-270 nm)**.

Karena hampir semua komponen kimia dapat dideteksi pada panjang gelombang ini.

Jenis-jenis detektor lainnya

- Detektor Fluoresensi

Detektor ini tidak banyak komponen bisa dideteksinya.

Detektor ini sangat peka dan dapat mendeteksi kadar senyawa yang sangat kecil seperti aflatoksin, aromatik berinti banyak, vitamin² tertentu, dan derivat asam amino

Kelemahan detektor ini (??)

- **Detektor Konduktivitas**

Detektor ini bekerja dengan mengukur konduktivitas eluen dari kolom. Dapat dilakukan dengan cara : menempatkan dua elektroda yang tidak reaktif (inert) dalam aliran pelarut serta mengukur tahanan antara keduanya. Sehingga digunakan untuk mengukur senyawa yang bersifat ionik.

Kelemahan detektor ini adalah penggunaan bufer harus dihindari, karena bufer ion mempunyai konduktivitas yang tinggi

Detektor Indeks Refraksi

Detektor ini bekerja atas dasar terjadinya perubahan nilai indeks refraksi dari suatu cairan yang mengalir bila di dalamnya terlarut suatu zat kimia.

Bila hanya fasa mobil murni yang mengalir, maka yang akan dihasilkan adalah garis dasar yang lurus.

Kelemahan detektor ini adalah tidak dapat memakai pelarut gradient. Detektor ini bisa dipakai untuk analisa gula dan asam lemak

Detektor FID (Flame Ionization Detector)

Banyak senyawa kimia yang larut dalam suatu pelarut dan terdeteksi secara bersama-sama. Sehingga Detektor ini digunakan untuk menghilangkan terdeteksinya pelarut.

Caranya : Eluen dari kolom dialirkan pada permukaan kawat, kemudian ke alat pirolisis dan akhirnya ke FID.

Derivatisasi

Banyak senyawa kimia yang sukar untuk dideteksi dengan detektor yang ada. Untuk mengatasi hal ini dan untuk mempermudah pendeteksian, maka dilakukan **Derivatisasi**

Proses derivatisasi dapat dilakukan

1. sebelum sampel diinjeksikan (*pre-column derivatization*)
2. sesudah sampel diinjeksikan (*post-column derivatization*)

1. Pada proses pre-column :

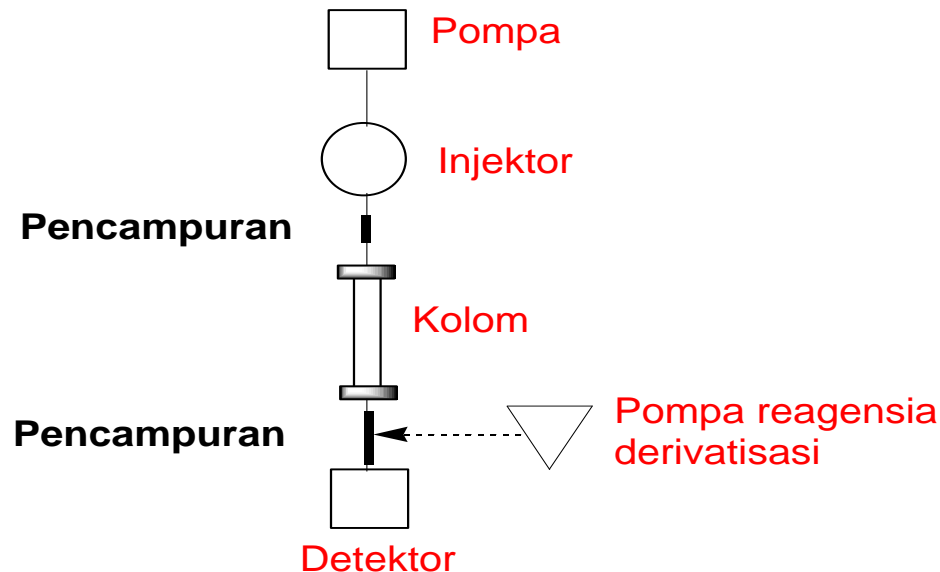
Kondisi reaksi tidak mempengaruhi kondisi kromatografi
Hanya senyawa derivat yang dihasilkan mempunyai sifat kromatografi yang berbeda (mis. R_t)

2. Pada proses post-column

Reaksi derivatisasi terjadi setelah proses pemisahan di kolom, atau pada eluen yang keluar dari kolom.

Karena pemisahan telah berlangsung, maka tidak mempengaruhi kromatogram.

Hanya reaksi harus dapat berlangsung dengan cepat sebelum sampel mengalir ke dalam detektor



8a. Rekorder

Alat yang merekam hasil dari detektor yang berupa kromatogram

8b. Data sistem

Alat yang menyimpan semua hasil analisis. Sehingga data dapat dibuka kembali apabila diperlukan

9. Pengumpulan fraksi

Tempat atau wadah yang digunakan untuk menampung pembuangan pelarut atau **penampungan fraksi-fraksi hasil analisa**

Bagaimana proses atau mekanisme yang terjadi pada satu sistem kromatografi ??



Apakah proses adsorpsi ? atau partisi ?
atau kedua-duanya ?

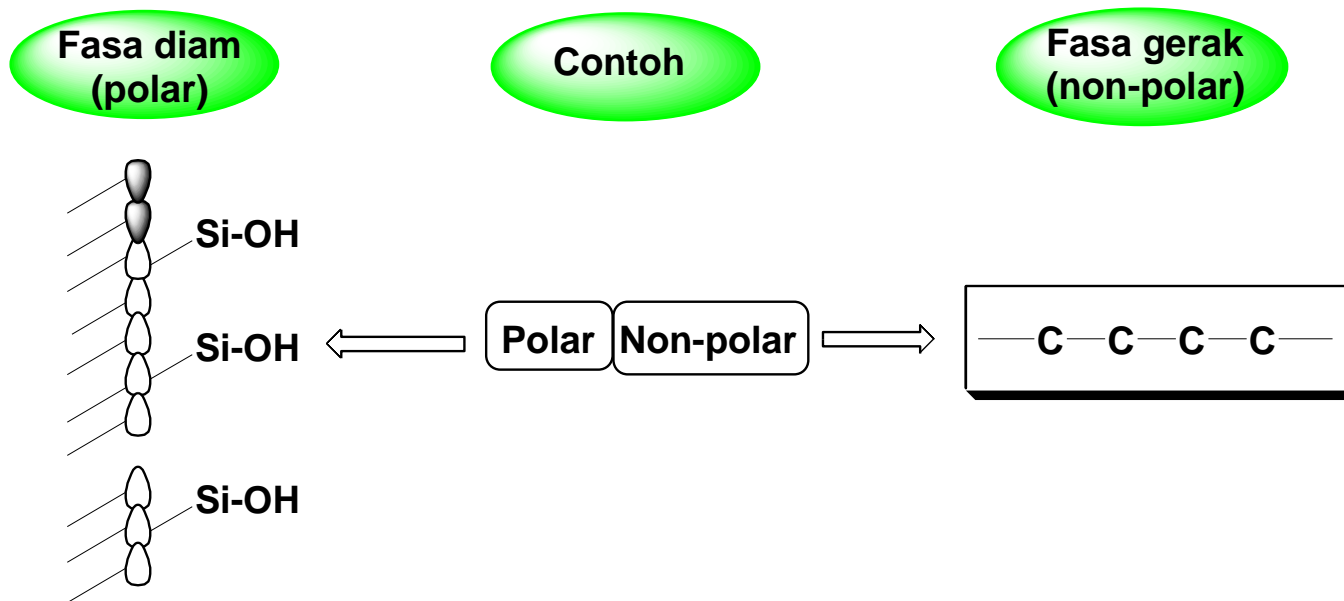
Sehingga untuk membedakannya, Kromatografi dapat dibedakan atas polaritas dari fasa diam dan fasa geraknya, yaitu :

1. Kromatografi fasa normal (**normal phase chr.**)
2. Kromatografi fasa bolak-balik (**reversed phase chr.**)
3. Kromatografi fasa terikat (**bonded phase chr.**)

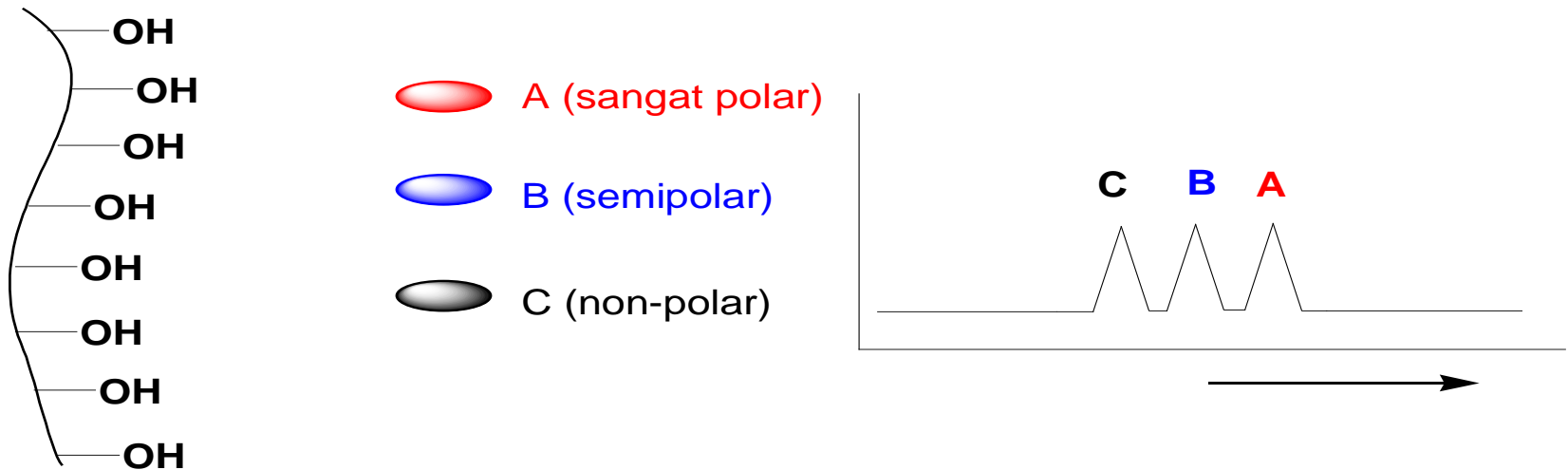
ad 1. Kr. fasa normal

Sistem kromatografi ini,
fasa diam bersifat polar (silika)
fasa gerak bersifat non-polar (*n*-heksan, EA, eter)

Sehingga senyawa kimia yang bersifat **polar** akan tertahan lebih lama di dalam kolom dibandingkan dengan senyawa yang **kurang polar** atau senyawa yang **tidak polar** sama sekali



Sehingga dalam kr. fasa normal, urutan elusi atau senyawaan yang akan terpisah dapat digambarkan sbr. :

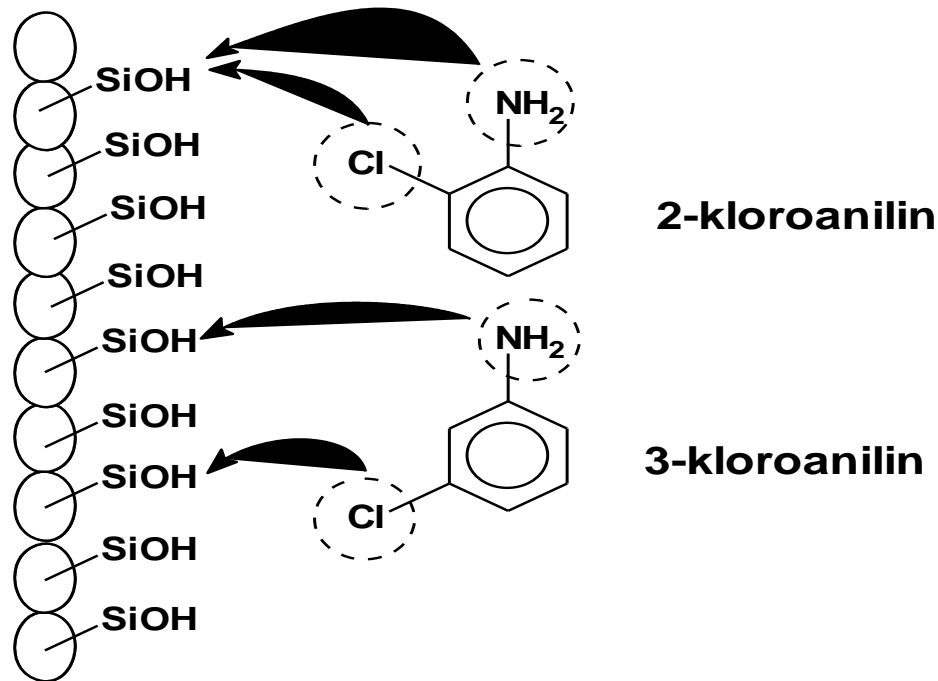


Keuntungan pemakaian kr. fasa normal adakah :

1. Harganya lebih murah
2. Mudah untuk membersihkan dari fasa geraknya
3. Mempunyai kapasitas yang besar untuk pemeriksaan sampel yang bersifat non polar

Contoh aplikasinya :

Pemisahan senyawa 2-kloroanilin dan 3-kloroanilin

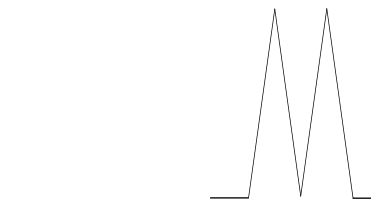
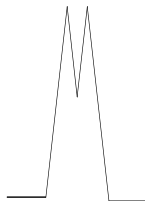


Pengaruh komposisi fasa gerak :

1. *n*-heksan-CHCl₃ = 40 : 60

2. *n*-heksan-CHCl₃ = 50 : 50

1. *n*-heksan-CHCl₃ = 40 : 60



2. *n*-heksan-CHCl₃ = 50 : 50

ad 3. Kr. fasa terikat (bonded phase)

Silika adalah suatu senyawa yang bersifat reaktif, yang mana gugusnya dapat diikat (bonded) oleh gugus lain. Gugus yang sering digunakan atau diikatkan yaitu C-8 dan C-10, fenil aromatik, dan gugus siano.

Pengikatan gugus non-polar pada silika akan mengubah sifat kimia permukaannya menjadi non-polar



Misal : R = C-10

Fasa gerak

Syarat-syarat :

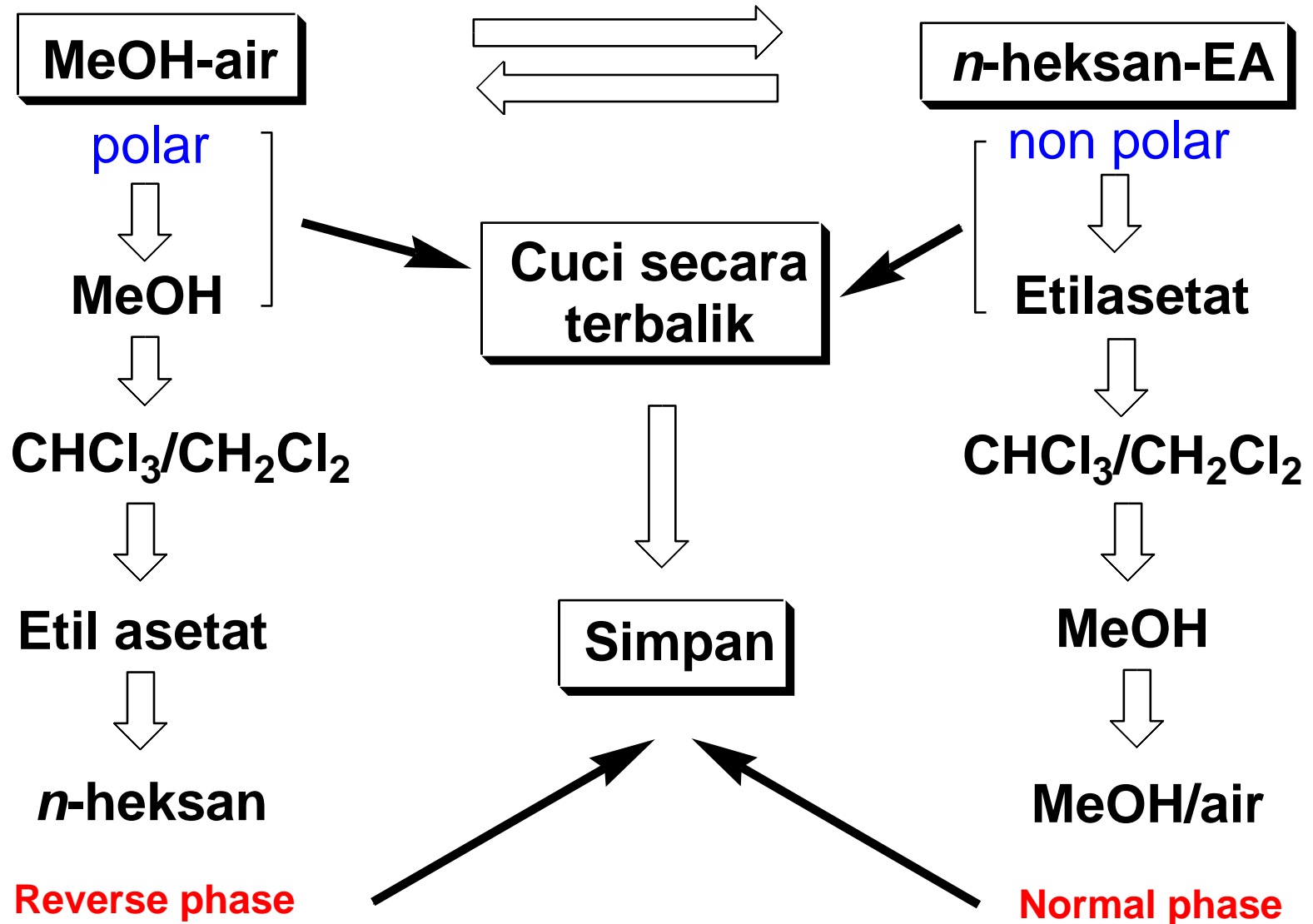
1. Mempunyai kemurnian dan kestabilan yang tinggi
(Lichrosolv, p.a., teknis)
2. Mudah tercampur dengan pelarut lain
(MeOH-air, *n*-heksan-etilasetat)
3. Mempunyai toksisitas yang rendah
(Benzen x, CHCl_3 x, MeOH, air, *n*-heksan ok)
4. Mempunyai transmisi UV yang rendah
(puncak yang timbul kecil, dan lebih dahulu)
5. Mempunyai viskositas yang rendah
(air tinggi, *n*-heksan rendah; perhatikan tekanan KCKT)
6. Mempunyai daya larut yang tinggi terhadap sampel
(Bila campuran, harus salah satu dapat larut)

Fasa diam

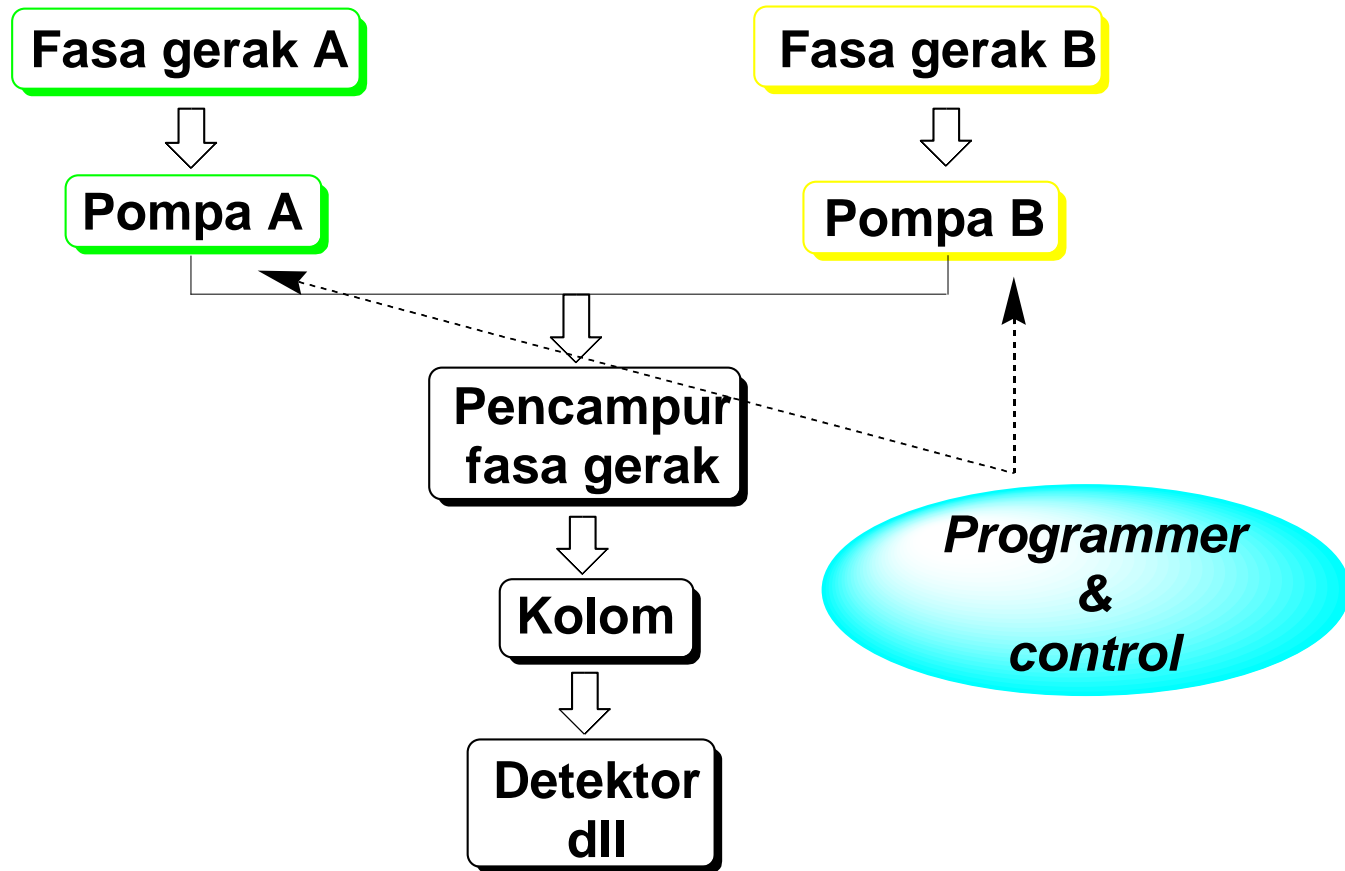
Syarat-syarat :

1. Sesuaikan dengan kapasitas sampel
(Kr. analisis; kromatografi preparatif)
2. Penggunaan sampel
(Fasa normal, fasa bolak-balik)
3. Kecepatan analisis
4. Pemisahan senyawa yang dianalisis

Pencucian kolom dari KCKT

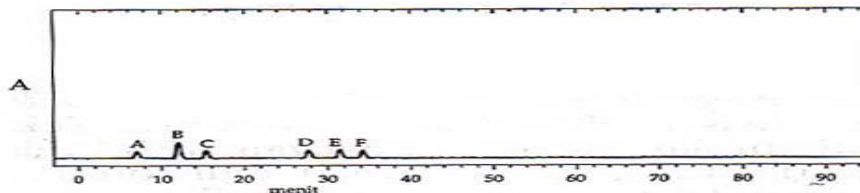


sistem gradien

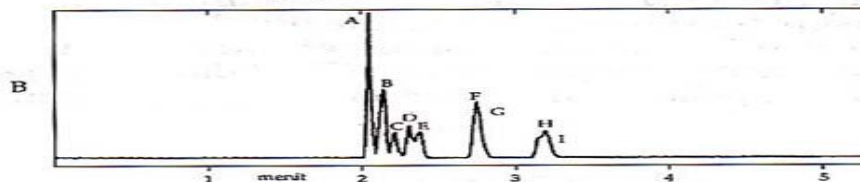


Mode Operasional KCKT

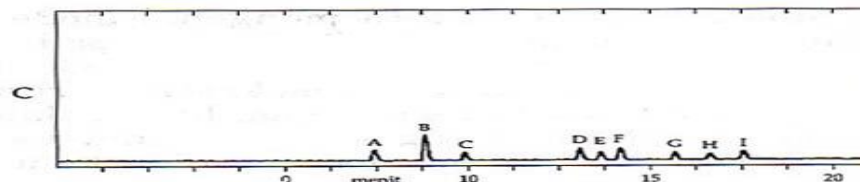
1. Pertama sekali sampel yang akan dianalisis, harus larut sempurna dengan pelarut yang akan digunakan
2. Pelarut yang digunakan harus didegassing lebih dahulu
3. Sampel harus disaring dengan membran filter 0,45 μm
4. Pastikan bahwa alat KCKT tidak ada kebocoran
(Periksa dari reservoir pelarut hingga pada pembuangan pelarut)
5. Gunakan *precolumn* bila ada (untuk mencegah pemampatan impurities pada kolom)
6. Pastikan pelarut yang digunakan apakah **sistem isokratik** atau **gradien**



Metanol 40%



Metanol 90%



Gradien : 0 - 10 (metanol 40%)
10 - 20 (metanol 90 %)

- **Prinsip KCKT**

Luas puncak kromatografi pada kurva elusi dipengaruhi oleh tiga proses perpindahan massa yaitu :

- difusi Eddy
- difusi longitudinal
- transfer massa tidak setimbang

Sedangkan parameter-parameter yang menentukan berlangsungnya proses-proses tersebut adalah :

- laju aliran
- laju disolusi
- ukuran partikel
- ketebalan stationer

- Penurunan persamaan *van Deemter* secara matematika akan mendapatkan μ_{opt} dan H_{min} sesuai dengan tujuan semula dari percobaan *van Deemter* untuk memperoleh kedua harga tersebut yaitu :

$$\mu_{opt} = (B/C)^{1/2}$$

$$H_{min} = A + 2 (B/C)^{1/2}$$

Persamaan van Deemter memberikan hubungan laju aliran dengan tinggi piringan teoritsi. Tetapi ternyata pada KCKT , hubungan antara efisiensi dengan laju aliran fase gerak yang diturunkan dari persamaan van Deemter tersebut tidak begitu sesuai. umumnya efisiensi pemisahan lebih baik bila partikel penunjang berukuran kecil.

Van Deemter menghubungkan ketiga proses dengan efisiensi kolom dalam suatu persamaan .

Persamaan ini telah teruji dengan metode kromatografi gas .

$$H = A + B/\mu + C \times \mu$$

Keterangan :

A = suatu variabel yang berasal dari difusi Eddy

B = variabel yang berhubungan dengan difusi longitudinal
(difusi molekul fase gerak)

C = menyangkut transfer massa tidak setimbang.
(tahanan alih massa)

μ = kecepatan fase gerak (laju alir)

- Untuk menghasilkan laju aliran yang sesuai dapat diatur dengan suatu pompa bertekanan tinggi.
- Didalam KCKT pompa yang canggih dilengkapi pengendali tekanan. (komponen terpenting)
- Komponen lain yang penting adalah sistem injeksi sampel.

- **Pemisahan Preparatif senyawa alam secara KCKT**

Pemakaian KCKT luas dan jumlah publikasinya yang menyangkut Isolasi senyawa alam menempati porsi yang lumayan.

Beberapa pemisahan secara KCKT dapat dilihat pada tabel 5.8 buku : Cara Kromatografi Preparatif, K.Hostettmann. Dkk hal 78 – 84.

-Sebagai patokan umum, KCKT merupakan langkah pemurnian akhir.

-Kondisi isokratik paling sering digunakan pada KCKT preparatif karena dengan demikian masalah operasi diperkecil. Akan tetapi untuk pemisahan yang rumit dipakai kondisi gradien.

Senyawa antara pada sintesis organik dapat dipisahkan dengan baik dengan KCKT preparatif. → bisiklooktaan dan dibromobenzobaralena telah dipisahkan dengan kolom LiChrosorb Si 60.

KCKT analitik dapat diskala besarkan untuk pekerjaan preparatif dengan dua cara :

- kita dapat melakukan penyuntikan berkali-kali.
- memakai kolom yang diameter lebih besar dan hasilan pelarut yang tinggi, sampai 10 atau 20 ml/menit.

Kolom semipreparatif niaga dan kolom preparatif dapat dibeli.

Kolom smeipreparatif dapat dipakai untuk cuplikan sampai 1 gram dan kolom preparatif untuk 5 gram atau lebih.

- Untuk memperbesar keefisienan, kolom KCKT analitik dapat digandengkan. Bahan kemas berukuran 20-30 μm harus dipakai untuk mencegah ketelapan (permeabilitas), terutama jika memakai pelarut yang mengandung air. Jika memakai pelarut organik seperti heksana (viskositas rendah) bisa dipakai bahan kemas 10 μm .
- Sistem analitik tidak mampu menghasilkan laju aliran yang diperlukan untuk pemisahan preparatif skala besar → pemakaian terbatas.

■ APLIKASI

■ Analisis Kualitatif

- t_R : membandingkan waktu retensi cuplikan / zat uji dengan baku pembandingan

■ Analisis Kuantitatif

- Luas / tinggi puncak

■ Pemisahan atau pemurnian (Kromatografi Preparatif)

Latihan soal :

1. Pada pemisahan suatu campuran yang mengandung asam palmitat , asam malonat dan asam oksalat dengan KCKT diperoleh luas puncak masing sebagai berikut : $1,2 \text{ cm}^2$, $3,8 \text{ cm}^2$ dan $4,3 \text{ cm}^2$. Jika respon detektor seragam, hitung presentase komponen campuran.

Penyelesaian :

- cari luas total komponen

$$\text{luas total} = (1,2 + 3,8 + 4,3) \text{ cm}^2 = 9,3$$

- Hitung presentase masing-masing komponen

$$\text{asam palmitat} = 1,2/9,3 \times 100\% = 12,90 \%$$

$$\text{asam malonat} = 3,8/9,3 \times 100\% = 40,86\%$$

$$\text{asam oksalat} = 4,3/9,3 \times 100\% = 46,24\%$$

2. Harga A, B, C pada persamaan *van Deemter* adalah 0,15 cm, 0,36 cm² dan 4,3 x 10² detik. Hitung laju aliran optimum dan harga tinggi minimal piringan.

Penyelesaian :

$$\mu_{\text{opt}} = (B/C)^{1/2}$$

$$H_{\text{min}} = A + 2 (B/C)^{1/2}$$