

# KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) atau High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Oleh:

**Susila Kristianingrum**

**susila.k@uny.ac.id**

Kompetensi Dasar:

Mahasiswa dapat mendeskripsikan pemisahan secara KCKT dan menginterpretasi kromatogram, serta mengaplikasikan metode ini untuk analisis suatu sampel

# PENDAHULUAN

- ❑ Perkembangan tingkat tinggi dari [kromatografi](#) kolom.  
Pelarut yang menetes melalui kolom dibawah grafitasi (melalui tekanan tinggi sampai dengan 400 atm), sehingga membuatnya lebih cepat.
- ❑ Partikel berukuran sangat kecil untuk material terpadatkan dalam kolom akan memberi luas permukaan yang lebih besar memungkinkan pemisahan yang lebih baik dari komponen-komponen dalam campuran.
- ❑ Mempertimbangkan metode pendeteksian yang dapat digunakan (sangat otomatis dan sangat peka)

# KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

- Sistem elusi dg tekanan tinggi (5000 psi)
- Awalnya dikenal dg high **pressure** liquid chromatography (HPLC), kemudian diganti high **performance** liquid chromatography (HPLC).
- Teknik kromatografi cair baru
- Istilah Indonesia dikenal dg kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)
- Kemajuan teknologi bahan dan elektronik sangat berpengaruh

## PENDAHULUAN KCKT/HPLC

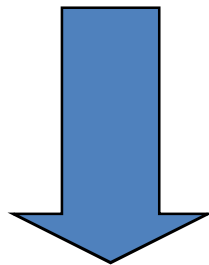
- Kunci keberhasilan: isi kolom (fs diam) yg memiliki diameter kecil ( $<40\mu\text{m}$ ).
- Eluen dipompa dg tekanan tinggi dg laju 1-10 mL/menit.
- Analit yg keluar dideteksi oleh detektor yg sangat sensitif.
- Teknologi kolom terikat (Bonded phase)
- Modifikasi sorben utk Reverse phase (RP), dan KPI

# TEORI KOLOM KCKT/HPLC

**N dipengaruhi oleh:**

- a. lebar pita ( $W$ ). Makin kecil  $W$ ,  $N$  makin besar, karena itu  $N$  mjd ukuran baik/tidaknya kolom**
- b. ukuran butir**
- c. distribusi ukuran butir**
- d. sifat butir (porous penuh/pelikuler)**

**Analisis yg sulit & rumit diperlukan kolom dg efisiensi tinggi**



**RESOLUSI TINGGI**

# OPTIMASI KCKT

- Ada 3 langkah utk memperoleh  $R_s$  tinggi:
  1. Harga  $k'$ , 1-5 dg eluen sesuai
  2. Harga  $\alpha$ , dg eluen lain, tetapi kekuatan elusi sama/dg eluen ketiga sbg aditif (mengubah buffer, menambah garam, pasangan ion).
  3. Harga  $N$ , dg cara mengurangi laju alir eluen, menggunakan kolom yg lebih panjang, menggunakan butir kolom lebih kecil.

# Metode Pemisahan Umum dalam HPLC

## Fasa normal

- Kolom (silika yang sangat kecil dan pelarut non polar misalnya heksan). Sebuah kolom sederhana dg i.d <4.6 mm dan panjang 150-250 mm.

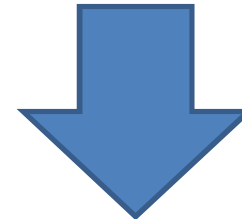


- Senyawa-senyawa polar dalam campuran melalui kolom akan melekat lebih lama pada silika yang polar dibanding dg senyawa-senyawa non polar, sehingga senyawa non polar akan lebih cepat melewati kolom.

- ❑ Fasa gerak non polar  
Fasa diam polar

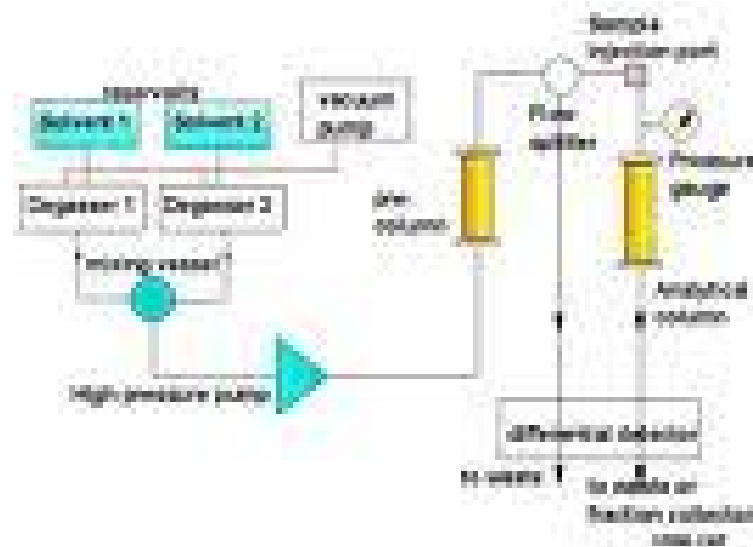
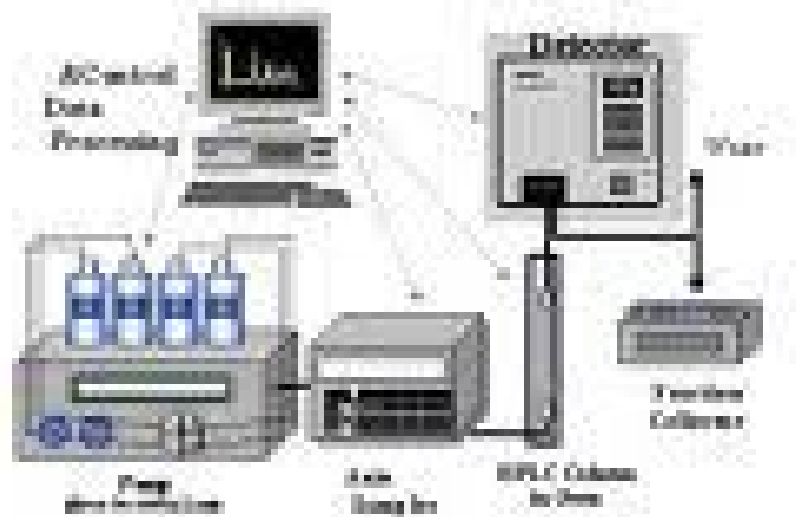
## Fasa terbalik (RP-HPLC)

- Kolom (silika dimodifikasi menjadi non polar melalui pelekatan rantai hidrokarbon panjang C8 atau C18 pada permukaannya secara sederhana dan pelarut polar (misal campuran air dan alkohol seperti metanol).



- Molekul-molekul polar akan bergerak lebih cepat melalui kolom.
- ❑ Fasa gerak polar  
Fasa diam non polar

# Diagram alir proses KCKT/HPLC





# Komponen KCKT

- penghantar solven tekanan tinggi
- sistem injeksi sampel
- kolom
- sistem detektor & recorder
- Microcomputer dg kontrol & data processing software

## Aesoris Alat:

- Dua pompa
- Sistem eluen terprogram
- Pengatur suhu kolom
- Injektor otomatis

# Fungsi masing-masing komponen

- **1. Gradien Controller/Solvent Reservoir :**  
Fungsinya untuk menampung fasa gerak yang akan dialirkan ke dalam kolom dengan bantuan pompa. Syarat fasa gerak yang digunakan harus dimilipore (pori-pori  $+5\mu\text{m}$ ) dan didegass.
- **2. Pompa:**  
Fungsinya untuk mendorong fasa gerak masuk ke dalam kolom.
- **3. Sample Introductions/Injector :**  
Fungsinya sebagai tempat memasukkan cuplikan/sampel dengan bantuan syringe.
- **4. Kolom:**  
Merupakan jantung dari sistem HPLC, karena di dalam kolomlah terjadi pemisahan komponen-komponen cuplikan.
- **5. Detektor:**  
Fungsinya untuk mendeteksi komponen-komponen cuplikan hasil pemisahan kolom.
- **6. Data Output :**  
Fungsinya untuk menampilkan hasil yang diperoleh.

# KEUNTUNGAN KCKT/HPLC

- Kerja lebih mudah dengan automatisasi dalam prosedur analisis dan pengolahan data
- Volume sampel kecil
- Daya pisah tinggi
- Merupakan metode analitis Cepat, Peka, Akurat, Tepat, Reproducible, Preparatif
- Dapat digunakan untuk analisis sampel organik dan anorganik, bersifat volatil dan non-volatil, stabil dan tidak stabil secara thermal.
- Pilihan fasa diam dan fasa geraknya luas.

# KOLOM

- Kolom analisis:
  - a. ukuran 15 cm x 3,9 cm terbuat dari baja tahan karat
  - b. ukuran 10 cm x 8 cm terbuat dari plastik (Radial-Pak)Besar butir: 5 atau 10  $\mu\text{m}$   
Jenis fasa diam bervariasi (silika atau C18)
- Kolom preparatif ada 2:
  - a. mikro (jumlah cupl 10mg-1,0 g) utk kolom 15cmx19mm atau 21,5mm.
  - b. makro (jumlah cupl 1,0 g-1,0 kg) utk kolom 30 cmx57mm.Besar butir: >20  $\mu\text{m}$   
Jenis fasa diam bervariasi (silika atau C18)

# Contoh kualitas kolom KCKT Merck

jenis	Luas perm	dp( $\mu\text{m}$ )	Vp(ml/g)	%C	$\Sigma$ bonded phase
Si-300	60	10	0,79		
Si-1000	30	10	0,78		
RP-8	340	4,5,10	1,25	12,5	4,3
RP-18	340	4,5,10	1,25	21,4	3,9

# Karakteristik kolom ODS

Kolom	Kand. C	N x 10 <sup>-3</sup>	Asimetrik pd 10% H	P (Psi)	Diameter
LC-18	10,76	73	1,03	950	5μ(spherical)
LC-7	12,90	39	1,12	1500	5μ(irregular)
C-18	15,28	80	1,29	1800	5μ(spherical)

# POMPA

- Pompa reciprocating & pneumatics
- Syaratnya:
  1. Bahan pompa harus terbuat dari bahan tahan terhadap eluen
  2. Daya pompa berkisar antara 500-5000psi
  3. Harus bebas pulsa/dilengkapi dg penghilang pulsa
  4. Memiliki kemampuan laju alir eluen 3 mL / menit
  5. Kedapatulangan laju alir  $\ll 1\%$ .

# JENIS –JENIS POMPA

1. Pompa bolak–balik(reciprocating pump)
  - Paling banyak digunakan
  - Jumlah vol pelarut tidak terbatas
  - Dapat digunakan untuk elusi gradien
  - Menghasilkan aliran berpulsa
2. Pompajenispenyuntik(syringe pump)
  - Kapasitas ruang pelarut 250 –500 mL
  - Untuk kolom–kolom kecil(*micro bore columns*)
  - Menghasilkan aliran bebas pulsa



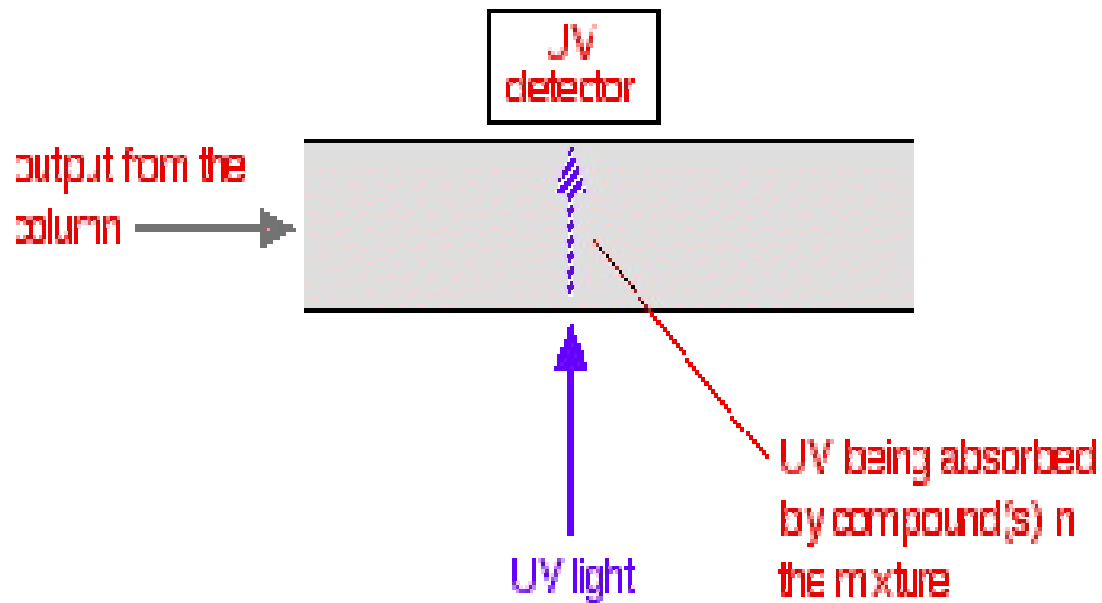
# DETEKTOR

Tergantung pada jenis senyawa dalam eluat:

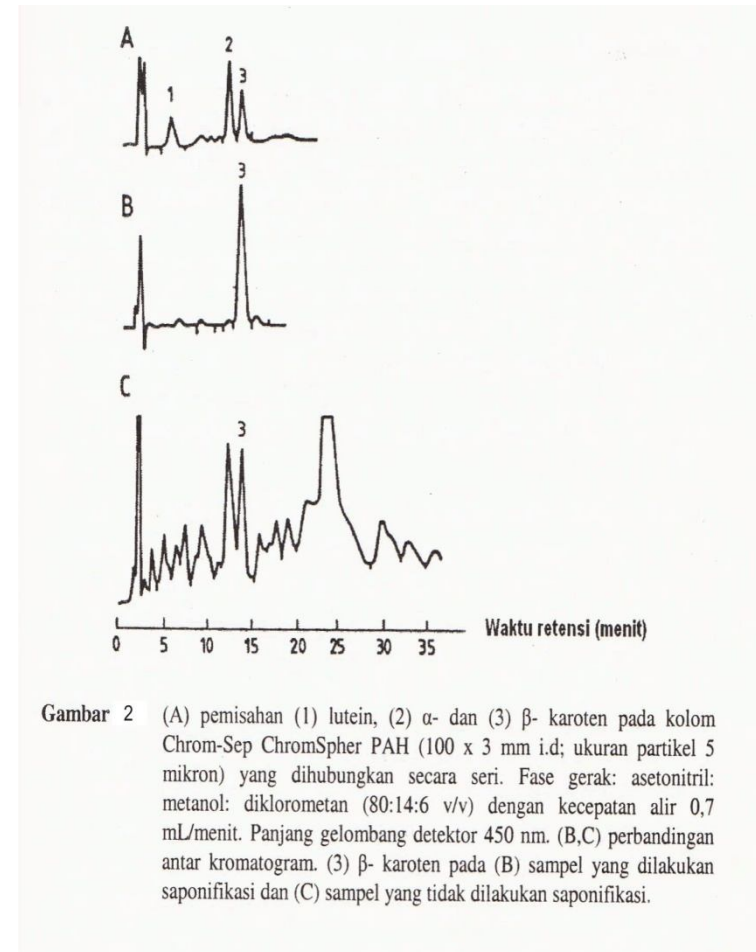
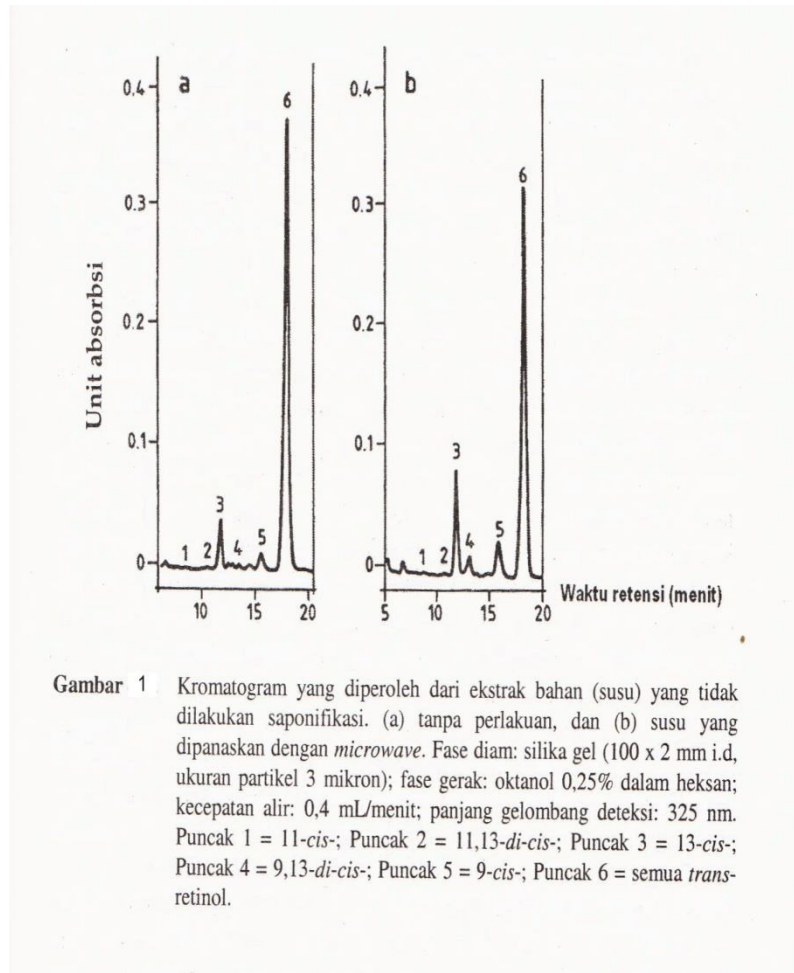
- Detektor indeks bias (Refractive Index Detector)
- Detektor UV-Vis
- Detektor fluoresensi
- Detektor elektrokimia
- IR
- LC-MS
- LC-NMR

# Detektor UV

Banyak senyawa-senyawa organik menyerap sinar UV dari beberapa panjang gelombang. Jika anda menyinarakan sinar UV pada larutan yang keluar melalui kolom dan sebuah detektor pada sisi yang berlawanan, anda akan mendapatkan pembacaan langsung berapa besar sinar yang diserap.



# Contoh kromatogram KCKT



# Aplikasi KCKT

## Preparative & Analytical Liquid Chromatography

- Bidang farmasi
- Bidang kimia
- Bidang biokimia
- Bidang kedokteran
- RP-HPLC
- KPI.

# Macam KCKT

Berdasarkan terjadinya interaksi antara solut, fasa diam, dan eluen maka KCKT dibedakan 3 yaitu:

1. Separation by size → Krom Ukuran-Elusi
2. Separation by charge → KPI (Krom Pertukaran Ion) & KIP (Krom Ion-Pasangan)
3. Separation by hydrophobicity

# Pemisahan berdasarkan hidrofobisitas

- Gugus yg diikat pada gugus siloksan dari silika gel bervariasi
- Gugus polar : CN, NH<sub>2</sub>  
Gugus non polar : C<sub>8</sub> atau C<sub>18</sub>

Interaksi solut dg fs diam dalam KFB melalui beberapa mekanisme:

1. Partisi antara lapisan hidrokarbon pd permukaan pakat dan fs gerak (K.cair-cair)
2. Partisi antara fs gerak dan fs diam termodifikasi
3. Adsorpsi solut pd permukaan lapisan hidrokarbon (K.cair-padat)

## Solvent dalam KCKT

- N-heksana
- Sikloheksana
- Tetraklorometana
- Metilbenzena
- Triklorometana
- Diklorometane
- THF
- Propanon
- Asetonitril
- Iso-propanol
- Etanol
- Metanol
- Asam etanoat
- Air

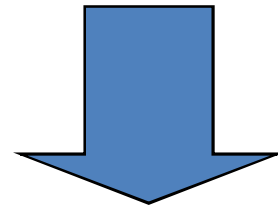
## Fasa diam dalam KCKT

### Bonded phases:

- ODS (oktadesilsilika, C<sub>18</sub>)
- Oktilsilika
- Propilsilika
- Aminopropil
- Asam sulfonat
- Amina kuartener

### Polimer phases:

- Cross-linked styrene atau DVB



- Untuk Eksklusi atau Pertukaran Ion



# TUGAS

1. Jelaskan bagaimana analisis kualitatif dan kuantitatif dg KCKT?
2. Pemisahan dg KPI pd teknik KCKT mempunyai beberapa kelemahan. Jelaskan jawaban anda!
3. Berikan beberapa contoh fasa diam dan fasa gerak yang digunakan dalam KCKT!
4. Jelaskan perbedaan antara KCKT fasa normal dan fasa terbalik!