ANALISIS KIMIAMENGGUNAKAN HPLC BAGIAN- I

Oleh:

Ella Salamah[1]

Pendahuluan

HPLC pada awalnya merupakan singkatan dari High Pressure Liquid Chromatography, karena metode ini memang merupakan suatu cara kromatografi dengan menggunakan tekanan (pressure). Tapi akhir-akhir ini dengan bertambah baiknya modifikasi dan penampakan dari peralatan, maka namanya berubah menjadi High Performance Liquid Chromatography.

HPLC merupakan suatu cara pemisahan komponen dari suatu campuran berdasarkan perbedaan distribusi/absorpsi/adsorpsi komponen diantara 2 fase yang berbeda yaitu fase diam (stasioner) dan fase bergerak (mobil) jantung dari peralatan HPLC adalah kolom dimana terdapat fase diam dan terjadi pemisahan komponen antara fase diam dan fase bergerak yang dialirkan dengan bantuan suatu pompa.

Pelarut-pelarut yang bisa digunakan dalam HPLC seperti air, methanol, asetomitril, chloroform dan pelarut-pelarut lainnya harus dalam keadaan murni (HPLC grade), sebelum digunakan harus disaring melalui millipore filter (0,45mm) dan harus dihilangkan gasnya (degarring) terlebih dahulu sebelum digunakan.

Operasionalisasi HPLC

HPLC dapat dioperasikan dengan 2 modifikasi yaitu modifikasi pelarut (ehner) dan modifikasi komponen.

Modifikasi pelarut dapat dilakukan dengan cara yang dinamakan isocratic yaitu selama pemisahan hanya digunakan satu macam palarut saja, tetapi dapat pula dilakukan dengan cara yang dinamakan gradien-elution yaitu selama pemisahan secara bertahap pelarut dirubah macam/ komposisinya sedikit demi sedikit.

Modifikasi komponen dapat dilakukan dengan cara pre-colum derivatization dimana komponen diderivatisasi sebelum masuk kolom atau sebelum injeksi, atau post-colum derivatization dimana komponen diderivatisasi sesudah keluar kolom.

Karena baik pelarut maupun komponen dapat dimodifikasi maka pemisahan komponen dalam suatu campuran dengan HPLC ini mempunyai resolusi yang sangat tinggi.

Beberapa Kegunaan dan Contoh Pemakian HPLC.

HPLC dapat digunakan secara luas, mulai dari pemisahan sederhana sampai pemisahan-pemisahan yang sangat sulit seperti msialnya:

1. Pemisahan gula, sakharin dan siklamat yang banyak digunakan pada minuman ringan.
2. Pemsiahan asam, gula dan alkohol sebagai hasil-hasil fermentasi.
3. Gikoalkoloid pada produk-produk hidrolisis kentang.
4. Pemisahan beberapa macam antioksidan seperti propil galat (PG),
5. Hasil-hasil reaksi maillard dari maltosa dan laktosa.
6. Analisis vitamin E dalam sampel yang mengandung lemak.
7. Analisis secara simultan dehyroascorbic acid, ascorbic acid dan asam-asam organik lain dalam buah-buahan dan sayur-sayuran.

---

[1] Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan IPB, Bogor.

ISSN 0854 -9230

8. Pemisahan Cholesterol dan epoxy cholesterol.

HPLC dapat digunakan untuk menentukan adanya cholesterol dan epoxy cholesterol didalam telur yang sudah di "spray dreid".

Setelah menjalani perlakuan seperti ekstraksi lipid, fraksionasi cholesterol dan epoxy cholesterol, kemudian dilakukan derivatisasi fraksi cholesterol maka dapat dilakukan analisa komponen tersebut dengan HPLC.

HPLC yang digunakan adalah Shimatzu LC-4A dengan kolom YMC yang dibungkus OOS (6x160 mm). HPLC dioperasikan dengan gradien eluation, pertama eluer yang digunakan adalah 2 propanol/aceton dengan perbandingan 10:90 v/v selama 5 menit, kemudian perbandingan pelarut dinaikkan menjadi 50:50 v/v selama 40 menit pertama dan dipertahankan 1 ml/menit pada menit berikutnya. Detektor yang digunakan adalah Shimatzu SPO-2-A Uv detector pada panjang gelombang 254 nm.

Campuran asam-asam organik yang ada dalam buah-buahan dan sayur-sayuran dapat dianalisa secara simultan dengan HPLC.

Sayur-sayuran dan buah-buahan setelah di homogenkan dilarutkan dalam 0,05 N H_3PO_4 Shurry disentrifuge dan supernatan dikumpulkan dan diencerkan dengan larutan pengekstrak. Ekstrak dimurnikan dengan cara melewatkannya kedalam saringan C-CP, diprekondisikan dengan acetonitril, aquabidest dan disaring melalui filter 0,45 nm sebelum injeksi.

HPLC yang digunakan adalah Perbin Elmer Isocrotic LC pompa 250 dengan kolom Spheri. 5-RP-18 (110x4,6 nm) dan 2 kolom Polypore H (110x4,6 nm dan 220x4,6 nm). Eluer yang digunakan adalah KH_2PO_4 2% dengan pH 2,3, kecepatan akhir 0,4 ml/menit dan tekanan 670-700 Psi. Detektor yang digunakan adalah Perbin. Elmer LC. 235 dengan panjang gelombang 215 dan 260 nm.

Kesimpulan

HPLC merupakan peralatan yang cukup handal karena mempunyai daya pisah yang cukup tinggi. Dalam pemakaiannya hal-hal yang perlu diperhatikan untuk dipelajari adalah:

1. Pemilihan kolom yang tepat.
2. Pemilihan eluer yang diperlukan.
3. Menentukan kecepatan alir eluer.
4. Pemakaian detektor yang cocok dengan serapan dari komponen yang dipisahkan.

Daftar Pusatka

Barbara Kramholier, Monika Psichefaricder and Theodor Severin. 1993. J. Agric. Food Chem. V:41 Halaman 347-351.

Myrna O. Nisperos Carriedo, Bela S. Buslig and Philip E. Shaw. 1992. J. Agric. Food Chem. V: 40. Halaman : 1127-1130.

Roger F. Mc. Feekrs 1993. J. Agric. Food Chem. V: 41. Halaman: 1439-1443.

Susan Tylor Mayne and Roberts Parker. 1988. J. Agric. Food Chem. V. 36. Halaman: 483-485.