

# KROMATOGRAFI

- Defenisi

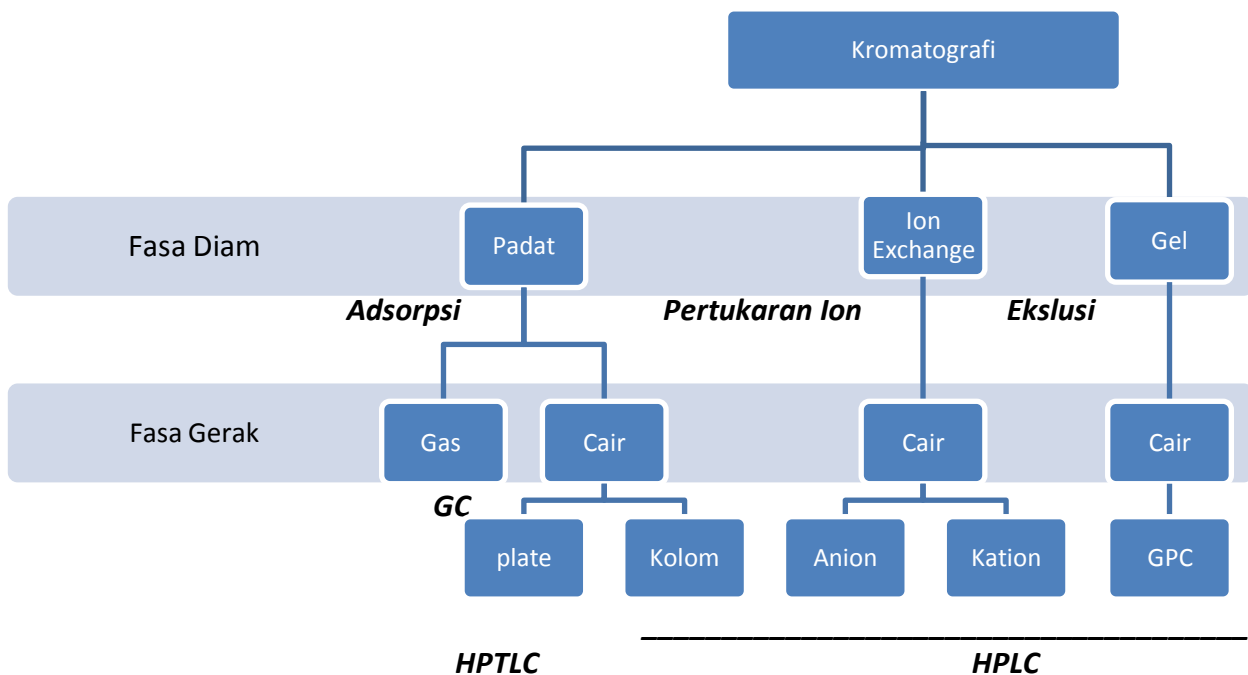
Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas).

Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*).

- Jenis-Jenis Kromatografi

Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu gas chromatography dan liquid chromatography. Masing-masing golongan dapat dibagi lagi seperti yang telah disebutkan pada definisi di atas.

Skema Pembagian Kromatografi



Pembagian ini selanjutnya dapat dibagi lagi seperti terlihat pada skema berikut:

- KROMATOGRAFI :
1. Kromatografi Gas
    - a. GLC
    - b. GSC
  2. Kromatografi Cair
    - a. HPLC
    - b. LLC-PC
    - c. LSC-TLC, Kolom
    - d. Ion Exchange
    - e. Eksklusi : - GP  
- GF

Keterangan

GLC = Gas Liquid Chromatography

GSC = Gas Solid Chromatography

LLC = Liquid Liquid Chromatography

LSC = Liquid Solid Chromatography

PC = Paper Chromatography

TLC = Thin Layer Chromatography

GP = Gel Permeation

GF = Gel Filtration

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

### ***Liquid Liquid Chromatography (LLC)***

LLC adalah kromatografi pembagian dimana partisi terjadi antara fase gerak dan fase diam yang kedua-duanya zat cair. Dalam hal ini fase diam tidak boleh larut dalam fase gerak.

Umumnya sebagai fase diam digunakan air dan sebagai fase gerak adalah pelarut organik. Misalnya pada kromatografi kertas, sebagai fase diam adalah air yang terserap pada serat selulosa dari kertas.

### ***Liquid Solid Chromatography (LSC)***

LSC adalah kromatografi penyerapan. Sebagai adsorben digunakan silika gel, alumina, penyaring molekul atau gelas berpori dipak dalam sebuah kolom dimana komponen-komponen campuran dipisahkan dengan adanya fase gerak. Kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (TLC) merupakan teknik pemisahan yang masuk golongan ini.

### ***Ion-exchange chromatography***

Teknik ini menggunakan zeolitas, resin organik atau anorganik sebagai penukar ion. Senyawaan yang mempunyai ion-ion dengan afinitas yang berbeda terhadap resin yang digunakan dapat dipisahkan.

Analisa asam-asam amino adalah yang umum dilakukan dengan cara ini. Contoh lain adalah asam-asam nukleat dan analisis garam-garam anorganik.

### ***Exclusion chromatography***

Dalam teknik ini, gel nonionik berpori banyak dengan ukuran yang sama digunakan untuk memisahkan campuran berdasarkan perbedaan ukuran molekulnya (BM).

Molekul-molekul yang kecil akan memasuki pori-pori dari gel sedangkan molekul besar akan melewati sela-sela gel lebih cepat bila dibandingkan dengan molekul yang melewati pori-porinya. Jadi urutan elusi mula-mula adalah molekul yang lebih besar, molekul sedang, dan terakhir molekul yang paling kecil. Bila sebagai penyaring digunakan gel yang hidrofil (Sephadex) maka teknik ini disebut *gel filtration chromatography* dan bila digunakan gel yang hidrofob (polystyrene-divinylbenzene) disebut *gel permeation chromatography*.

Teknik kromatografi yang umum digunakan dibidang farmasi yaitu kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, dan high performance liquid chromatography (kromatografi cair kinerja tinggi / KCKT).

### **Teori**

Martin dan Synge adalah yang pertamakali menulis tentang teori liquid partition chromatography. Prinsip teori yang dikemukakan itu dapat diterapkan untuk semua jenis kromatografi.

Pemisahan terjadi karena molekul sampel tertahan oleh fase diam atau dibawa oleh fase gerak, tergantung dari afinitas senyawa tersebut terhadap kedua fase ini.

### Koefisien distribusi

Distribusi dari molekul-molekul sampel diantara dua fase ditentukan oleh tetapan kesetimbangan yang dikenal dengan koefisien distribusi, K (koefisien partisi).

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

K = koefisien partisi

C<sub>s</sub> = konsentrasi sampel dalam fase diam (stationary phase)

C<sub>m</sub> = konsentrasi sampel dalam fase gerak (mobile phase)

Bila harga K, besar berarti populasi molekul dalam fase diam lebih besar daripada fase gerak dan berarti rata-rata lebih lama tertahan dalam fase diam.

### Faktor kapasitas

$K' = \frac{KV_s}{V_m} = \text{capacity factor} = \frac{C_s C_v}{C_m V_m}$  = perbandingan molekul sampel dalam fase diam dengan fase gerak.

K' Adalah nilai yang menunjukkan seberapa kuat komponen-komponen dalam sampel yang dibawa oleh fase gerak berinteraksi dengan kolom (fase diam).

### Laju pemisahan

Apabila bagian waktu yang dibutuhkan oleh molekul sampel pada fase gerak dikalikan dengan kecepatan linier (u) dari fase gerak maka diperoleh laju pemisahan (rate of travel) dari molekul rata-rata.

$$\text{Rate} = u \frac{1}{1+K'}$$

Jadi, laju pemisahan ditentukan oleh :

1. Kecepatan fase gerak (sama untuk tiap komponen campuran).
2. Perbandingan dari volume fase diam dengan fase gerak (sama untuk tiap komponen campuran)

3. Koefisien distribusi (spesifik untuk tiap komponen campuran).

### **Retention time**

Waktu yang diperlukan oleh sebuah komponen sampel untuk melintasi kolom sepanjang L disebut 'retention time' (t). Dari definisi ini, laju pemisahan diperoleh:

$$t = \frac{\text{Length}}{\text{rate}} = \frac{L}{u} = (1 + K') \cdot t_M = t_M(1 + K')$$

$t_M$  = waktu yang diperlukan oleh fase gerak untuk melintasi kolom sepanjang L.

Persamaan ini merupakan persamaan dasar untuk semua jenis kromatografi. Dalam praktek sering diterapkan pada kromatografi gas dan definisinya dapat diubah menjadi retention time, yaitu waktu yang diperlukan oleh sampel mulai dari saat injeksi sampai timbulnya peak maksimum.

### **Retention volume**

Bila kecepatan dari fase gerak konstan, maka volume dari fase gerak yang diperlukan untuk memisahkan suatu komponen campuran dari kolom dapat dihitung dengan rumus berikut :

Volume = waktu x kecepatan aliran

$$V_R = t_R F$$

Bila persamaan retention time disubstitusikan ke dalam persamaan ini maka diperoleh:

$$V_R = V_m (1 + K') = V_m + K V_s$$

$V_m$  = volume dari fase gerak dalam kolom

$V_s$  = volume dari fase diam

Bila fase diam berupa zat padat maka  $V_s$  dapat dirubah menjadi luas permukaan / area (adsorption) atau dengan kapasitas penukar ion.

### ***Relative retention (selektifitas, $\alpha$ )***

$\alpha$  adalah nilai yang menunjukkan seberapa baik sistem kromatografi dapat memisahkan dua komponen.

Retention time dan retention volume kurang tepat jika dipakai untuk identifikasi dengan membandingkan data-data lainnya karena harganya ini sangat tergantung dari cara pembuatan kolom dan kondisi percobaan. Untuk menghilangkan efek dari operasional variabel, maka lebih baik digunakan harga relative retention yaitu perbandingan antara retention time sampel dengan retention time standar yang diperoleh dari kolom yang sama dengan kondisi percobaan yang sama.

### ***Plate theory (N)***

Martin dan Syngge melihat adanya persamaan proses yang terjadi pada kolom kromatografi dengan kolom destilasi bertingkat kemudian menerapkan konsep “theoretical rate” pada pemisahan dengan destilasi ke dalam kromatografi.

Harga N ditentukan oleh konstruksi kolom, sifat sampel. Flow rate, temperature, cara memasukkan sampel dll. Ada 2 cara memperbesar harga N yaitu dengan memperpanjang kolom dan dengan memperpanjang jumlah keseimbangan (equilibrium) dalam jangka waktu yang sama.

### ***Rate theory***

Dalam praktek harga H selalu lebih besar dari harga idealnya (nol) yang berarti terjadi pelebaran peak. Pelebaran ini disebabkan oleh 3 faktor yaitu:

#### **1. Efek perbedaan jarak (eddy diffusion)**

Perbedaan jarak yang dilalui oleh molekul yang satu dengan yang lain disebabkan perbedaan bentuk, ukuran partikel-partikel pengisi kolom, cara pengisian kolom, dan diameter dari kolom. Perbedaan ini mengakibatkan perbedaan waktu keluarnya

molekul-molekul dari kolom. Untuk memperkecil efek ini, digunakan partikel-partikel kecil yang serba sama tetapi tidak menyebabkan penurunan tekanan dalam kolom terlalu tinggi, diameter kolom yang kecil, pengepakan yang mampat dan serba sama tanpa memecahkan partikel-partikel pengisi kolom tersebut.

### 2. Difusi molekul sepanjang kolom

Molekul-molekul cenderung untuk berdifusi dari daerah yang konsentrasinya tinggi ke daerah yang konsentrasinya rendah. Akibatnya, waktu melintasi kolom, molekul-molekul akan menyebar (berdifusi) ke belakang dan ke depan.


### 3. Efek ketidaksinambungan

Aliran yang terus-menerus dari fase gerak menyebabkan penyimpangan dari keseimbangan dimana  $C_s/C_m$  selalu lebih kecil dari  $K$  pada tepi zona yang didepan dan selalu lebih besar pada tepi zona yang di belakang seperti terlihat pada gambar di atas (c). Pada partition chromatography, efek ini makin nyata bila kekentalan fase diam makin tinggi.

## Resolusi

Merupakan ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lain. Perubahan kecil pada nilai  $\alpha$  akan menyebabkan nilai resolusi berubah secara signifikan, sebagai contoh

$$R = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (\sqrt{N}) \left( \frac{k'}{1 + k'} \right)$$


  
 selektifitas  $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$

$$\alpha = 1,1 \rightarrow \frac{1,1 - 1}{1,1} = 0,09$$

$$\alpha = 1,4 \rightarrow \frac{1,4 - 1}{1,4} = 0,29$$

Diringkas Dari Kuliah Kromatografi : DR. Harmita, Apt  
Dept. Farmasi UI

