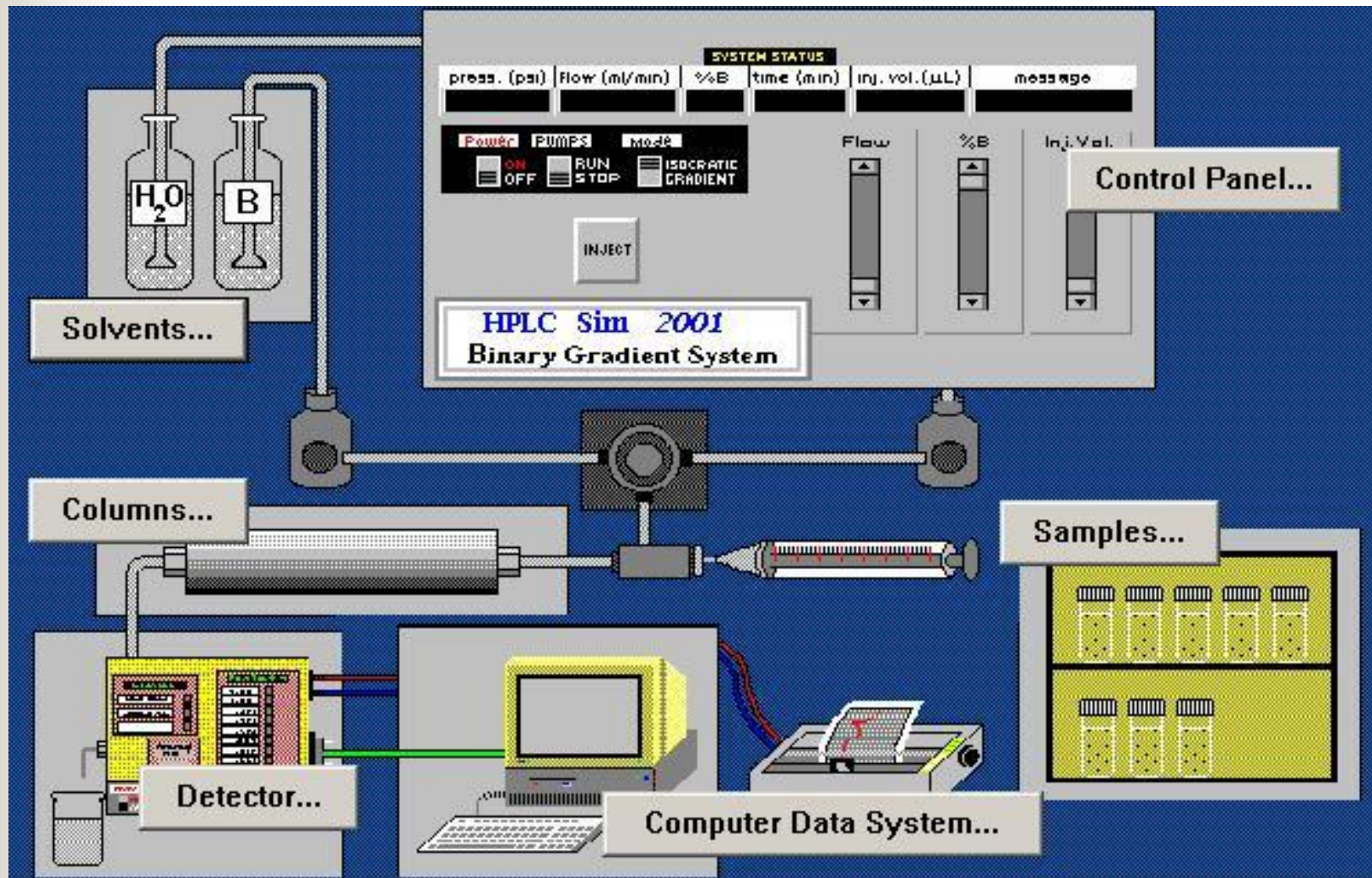



KCKT/HPLC



JURUSAN PENDIDIKAN KIMIA
U P I
BANDUNG 2001

Skema Alat HPLC



- 
- Keunggulan KCKT :**
- Untuk zat yg labil & tidak mudah menguap
 - dilakukan pada suhu kamar
 - dapat untuk senyawa anorganik & M_r besar

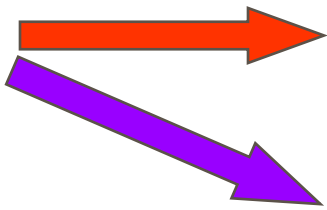
Prinsip kerja & Instrumentasi

I. Fasa gerak → zat cair (eluen/pelarut)

- Syarat :** Pelarut yang baik untuk cuplikan, murni, jernih, tidak kental, sesuai dengan detektor.
- Jenis :**
 - interaktif → t_r dipengaruhi
 - non interaktif → t_r tidak dipengaruhi
 - kepolaran

b. Jenis : - interaktif $\rightarrow t_r$ dipengaruhi

- non interaktif $\rightarrow t_r$ tidak dipengaruhi

- kepolaran  - fasa normal
(fasa gerak non polar)

- fasa terbalik
(fasa gerak non polar)

c. Dasar pemilihan \rightarrow trial & error

- untuk 2 – 3 komponen $K' = 2 - 5$

- untuk multikomponen $K' = 0,5 - 20$



II. Pompa → motor penggerak fasa gerak

- a. Syarat :
- tekanan, $P = 6000 \text{ psi (pons/inc}^2\text{)}$
 - bebas pulsa, $V = 0,1 - 10 \text{ mL/menit}$
 - tahan korosi

b. Jenis :

- P. reciprocating :ger. Piston ada peredam udara vol kecil
($35 - 400 \mu\text{L}$), $P > 10.000 \text{ psi}$, V konstan
- P. displacement :spt siring, V konstan
- P. pnematik :pendorong adalah gas bertekanan tinggi,
bebas pulsa, $P < 20.000 \text{ psi}$, V tidak konstan

III. Pemasukkan cuplikan

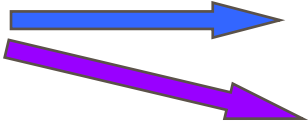
a. Syarat : tekanan tidak turun

b. Teknik :

- injeksi syringe: disuntikkan melalui septum,

(tahan $P = 1500$ psi)

- injeksi stop-flow: aliran pelarut dihentikan sementara

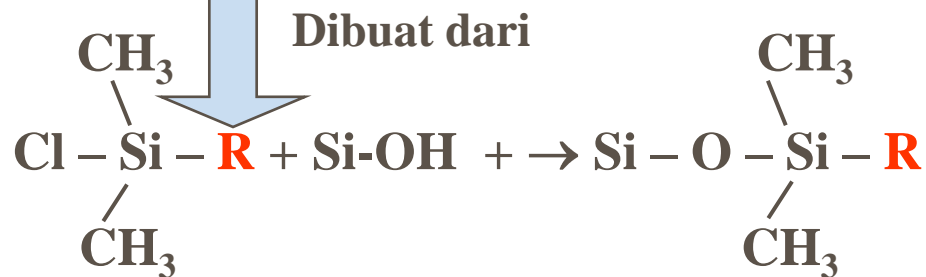
- loop (kran cuplikan)  Posisi load
Posisi injek

IV. Kolom

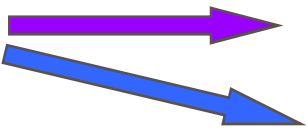
a. Kolom analitik :

- $\phi = 5 - 30$ cm, $\phi = 4 - 10$ mm, paking dengan $\phi = 3 - 10$ cm, $N = 40.000 - 60.000$ plat/meter.

- jenis : C-18, C-8, sianopropil, penukar ion



b. Kolom pengaman/guard kolom:

- $\phi = 5$ cm, $\phi = 4 - 6$ mm, ϕ partikel $>$ dari a
- fungsi:  Menyaring kotoran
Menjenuhkan fasa diam

V. Detektor

a. Syarat :

- respon v_s solut linier,
- t respon pendek,
- tidak merusak cuplikan

b. Jenis :

- UV → untuk senyawa organik, λ biasanya 254 nm
- elektrokimia  Konduktometri → penukar ion
 Polarografi → redoks



Tinjauan teoritis

1. Retensi

perbedaan daya ikat solut terhadap fasa diam

2. Band Broadening

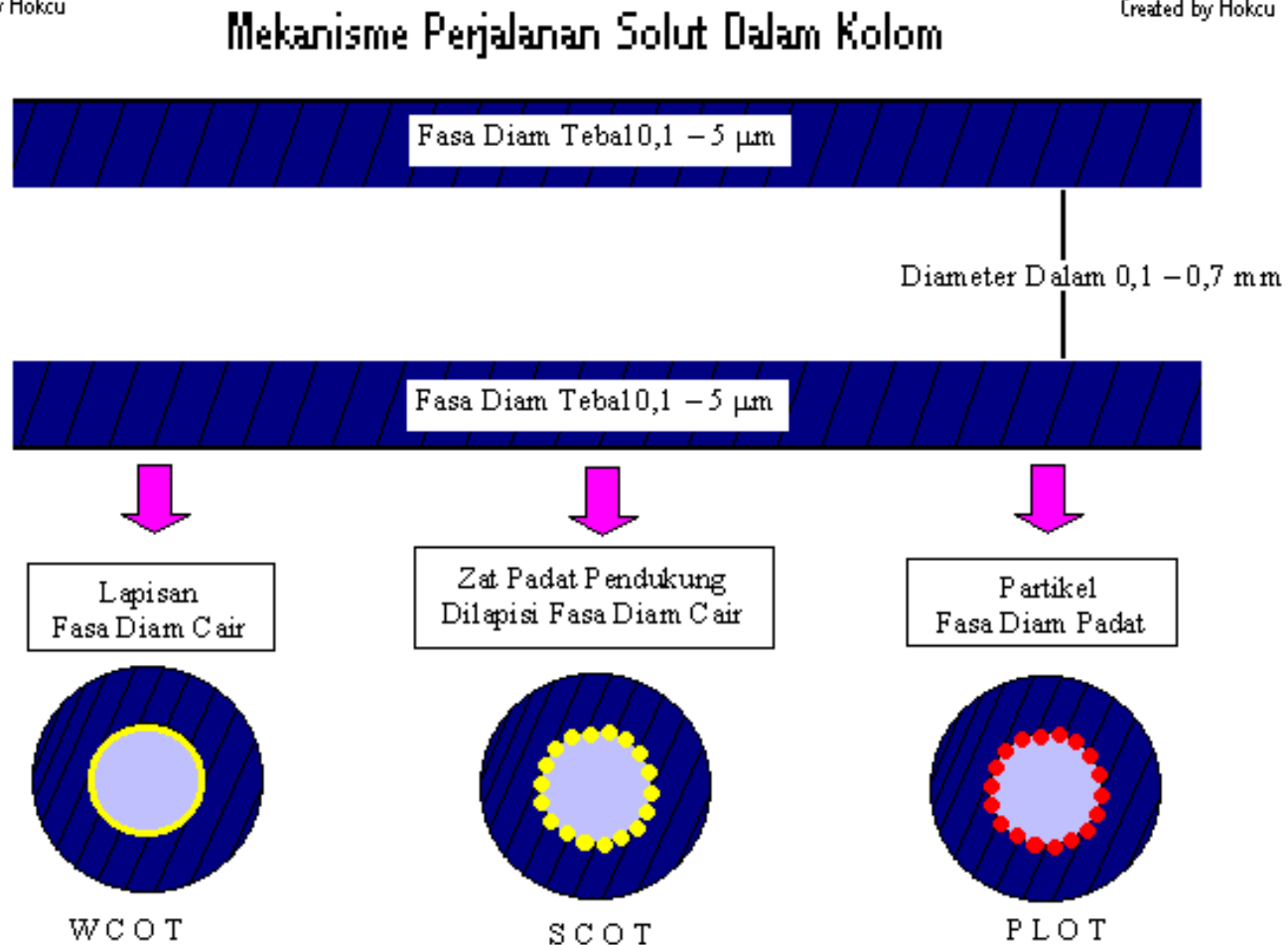
diakibatkan oleh:

- penyebaran & pengenceran senyawa dalam kolom
- partikel fasa diam tidak merata → difusi Eddy
- transfer massa → terperangkapnya fasa gerak pada pori-pori paking kolom

Mekanisme Perjalanan Solut Dalam Kolom

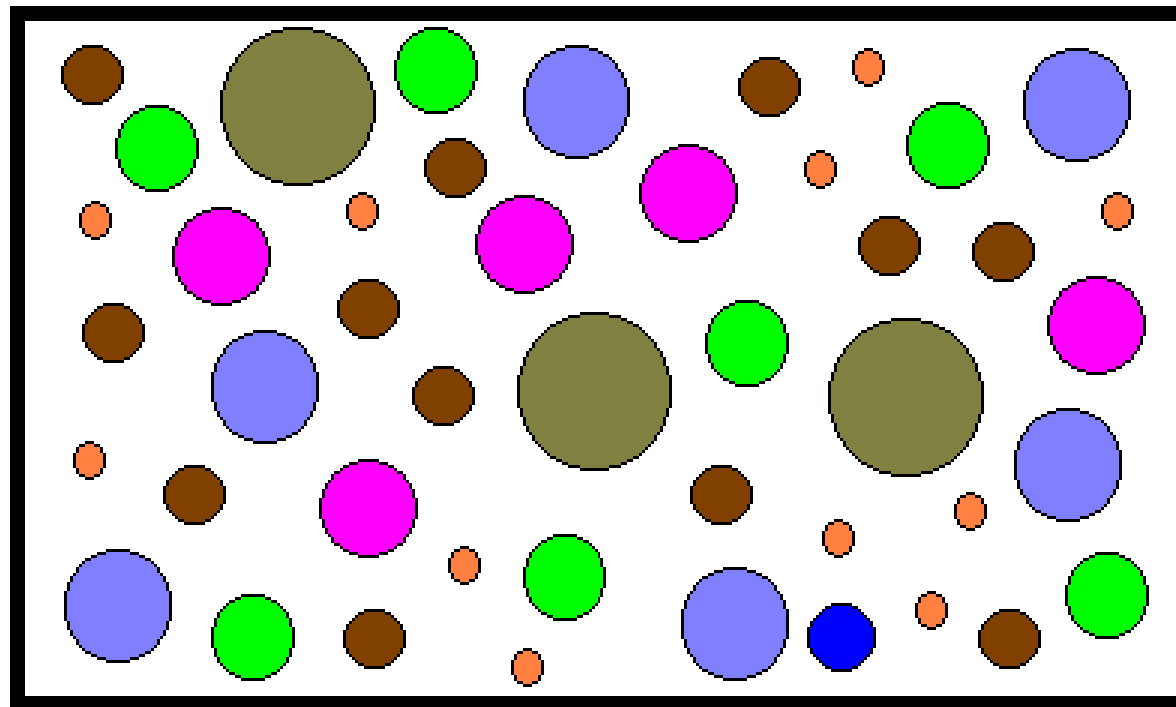
Created by Hokcu

Created by Hokcu



Mekanisme Perjalanan Solut Dalam Kolom

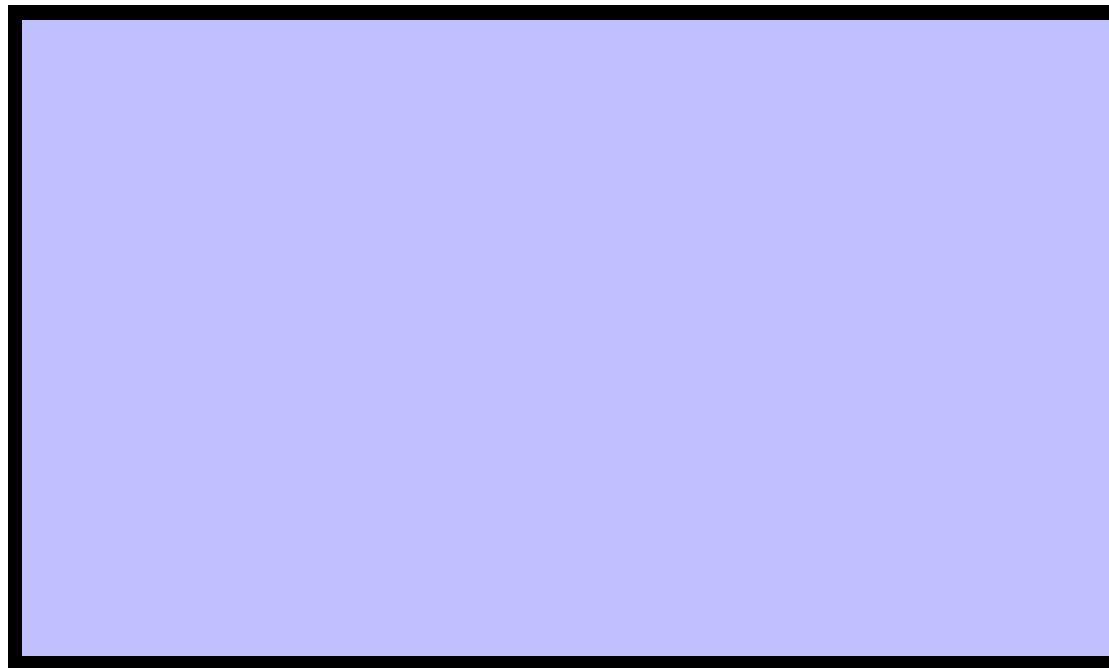
Eddy Diffusion



Created by Hokcu

Mekanisme Perjalanan Solut Dalam Kolom

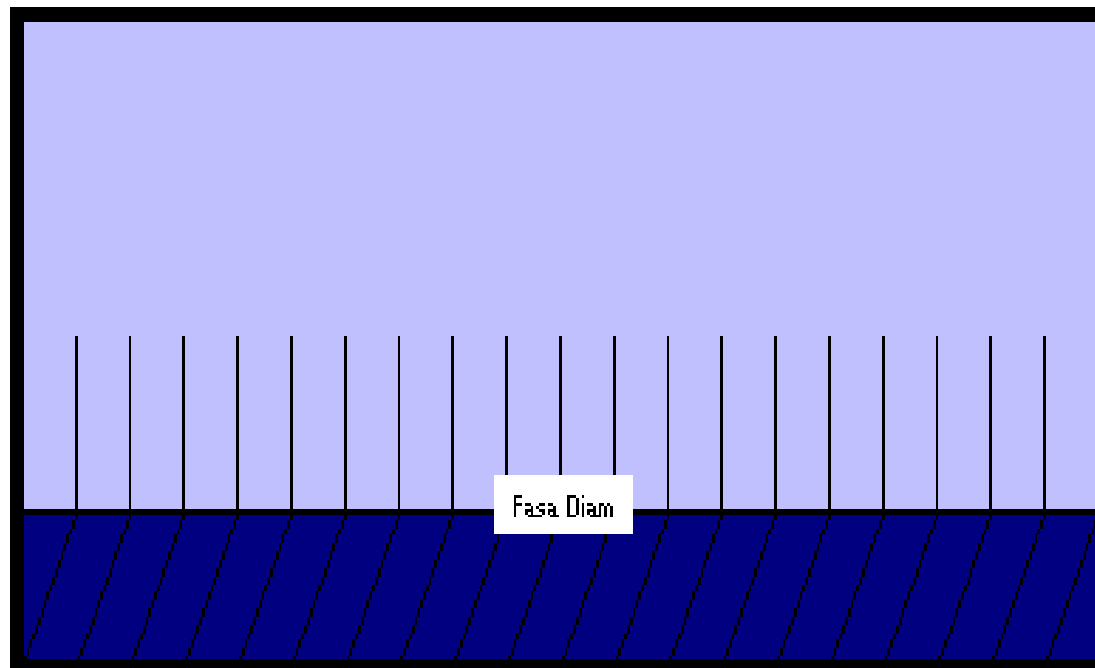
Longitudinal Diffusion



Created by Hokcu

Mekanisme Perjalanan Solut Dalam Kolom

Transfer Massa Non-Equilibrium



Created by Hokcu

3. Efisiensi

- untuk peak tak simetridiam

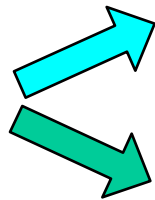
$$N = \frac{41,7 \left(\frac{t_r}{\omega \cdot 0,1} \right)^2}{\frac{A}{B} + 1,25}$$

- persamaan Knox

$$H = AV^3 + \frac{B}{A} + CV$$

4. Resolusi

Mode operasional



Isokratik : tetap

Gradien : variasi



ANALISIS LEMAK

I. Pendahuluan

1.1. Pengertian

- Lemak adalah bagian dari senyawa lipid berupa triasil gliserol
- Ada macam-macam lemak:
 - + lemak hewani → banyak mengandung kolesterol
 - + lemak nabati → banyak mengandung fitosterol dan asam lemak tak jenuh
↓ sehingga
bentuk cair disebut minyak



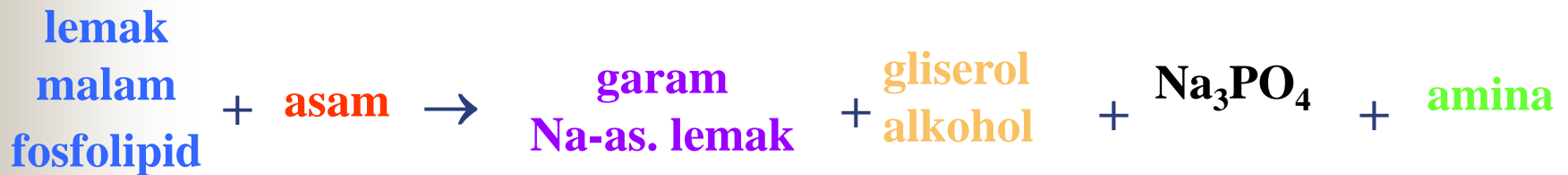
Selain itu minyak nabati mengandung asam-asam lemak essensial, seperti:

- asam linoleat:**
- asam linolenat**
- asam arakidonat → untuk mencegah penyempitan pembuluh darah akibat penumpukan kolesterol.**

1.2. Hidrolisis dan Penyabunan

- dengan adanya air, lemak dapat terurai menjadi: gliserol dan asam lemak, reaksi ini dikatalisis oleh adanya basa, asam dan enzim-enzim**

- Penyabunan adalah terhidrolisisnya lemak oleh pemanasan dengan alkali menghasilkan sabun dari komponen asam lemaknya.



1.3. Asam Lemak

- di alam berupa:
 - **asam-asam monokarboksilat**
 - **rantai tak bercabang jenuh dan tak jenuh**
 - **jumlah atom C genap ($C_2 - C_{30}$)**
- **contoh-contoh asam lemak**
 - C_4 : asam butirat/butanoat
 - C_6 : **asam kaproat/heksanoat**
 - C_{18} : asam stearat/oktadekanoat
 - $C_{18:1}$: **asam oleat/9-oktadekanoat**
 - $C_{18:2}$: asam linoleat/9,12-oktadekadienoat
 - $C_{18:3}$: **asam linolenat/9,12,15-oktadekadienoat**



1.4. Lemak sebagai emulsifier

- emulsi adalah suatu dispersi/suspensi suatu cairan dalam cairan yang lain, dimana molekul-molekul kedua cairan tidak saling bercampur
- emulsifier adalah senyawa yang mempunyai bentuk molekul yang dapat terikat pada minyak maupun air
 - o/w → contoh susu
 - w/o → contoh mentega & margarin



II. Analisis

2.1. Penetapan Lemak Kasar

A. Metode Ekstraksi soxhlet

- untuk sampel berbentuk padat/tepung
- prinsip: lemak diekstraksi dengan dietil eter, pelarut diuapkan, lemak ditimbang dan dihitung %



- Langkah kerja

- timbang sampel, bungkus rapat dengan kertas saring
- refluks sampai larutannta jernih
- distilasi → untuk pemisahan pelarut
- keringkan dalam oven sampai suhu larutan 105°C
- timbang

$$\% \text{ lemak} = \frac{\text{berat lemak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$



A. Metode Babcock

- biasanya untuk sampel susu cair
- prinsip: penggunaan H_2SO_4 untuk menghancurkan emulsi sehingga fasa air dan lemak terpisah
- Langkah kerja
 - susu + $\text{H}_2\text{SO}_{4(p)}$ dikocok sampai larut (dlm botol Babcock)
 - disentrifuse pada suhu $\pm 60^\circ\text{C}$
 - ukur panjang kolom lemak pada bagian atas

2.2. Pengujian Ketakjenuhan

- biasanya menggunakan bilangan iodium, yaitu jumlah gram I_2 yang diserap oleh 100 gram lipid.
- prinsip: I_2 mengadisi ikatan rangkap asam lemak tidak jenuh bebas maupun esternya.
- Langkah kerja
 - sampel + I_2 berlebih
 - kelebihan I_2 dititrasi dengan natrium tiosulfat.



Ada 2 macam metode yang biasa digunakan



A. Metode Hanus

- **pereaksi: larutan I_2 dalam CH_3COOH glasial + Brom**
- **Langkah kerja**
 - **timbang sampel + kloroform + pereaksi Hanus, dibiarkan 1 jam ditempat gelap**
 - **tambah larutan KI, kocok, titrasi dengan $Na_2S_2O_3$ dan tambah indikator pati**
 - **buat blanko dan bandingkan dengan sampel**

B. Metode Wijjs

- pereaksi: kedalam larutan I_2 dilewatkan gas Cl_2
- Langkah kerja
 - timbang sampel + kloroform + pereaksi Wijjs, dibiarkan 1 jam ditempat gelap
 - tambah larutan KI, kocok, titrasi dengan $Na_2S_2O_3$ dan tambah indikator pati
 - buat blanko dan bandingkan dengan sampel

$$\text{Bilangan } I_2 = \frac{(\text{titer blanko} - \text{titer sampel}) \times N_{Na_2S_2O_3}}{\text{berat sampel (g)}} \times 126,9$$

2.3. Penggolongan Fraksi Lipid (Bil. enyabunan)

- **Pengertian** : jumlah mg KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan 1 g lemak.
- **Prinsip**: lemak dapat terhidrolisis oleh alkali menghasilkan sabun dari komponen asam lemaknya.
- **Langkah kerja**
 - timbang sampel + KOH beralkohol
 - refluks sampai larutan bebas dari butiran lemak
 - dinginkan + 1 mL indikator p_p dan titrasi dengan HCl

$$\text{Bil. Penyabunan} = \frac{(\text{titer blanko} - \text{titer sampel}) \times N_{\text{HCl}}}{\text{berat sampel (g)}} \times 56,1$$



2.4. KCKT Senyawa Lipid

- **Kendala:**- pemilihan fasa diam dan fasa gerak sulit karena polaritas lemak sangat berbeda.
 - ekstrak lipid perlu disiapkan khusus.
- **Detektor:**
 - spektrofotometri
 - indeks bias
 - fluorimetri



A. KCKT Asam Lemak

- Jenis kolom:- kolom normal**
 - kolom fasaterbalik**

- Contoh :**
 - 1. Menggunakan kolom C-18 dan detektor indeks bias, asam-asam lemak jenuh dan tak jenuh dapat dipisahkan sebagai metil ester.**

 - 2. Asam-asam lemak dengan gugus OH dapat dideteksi pada 254 nm tanpa derivatisasi, tetapi agar rantai pendek dapat terpisahkan dilakukan derivatisasi dengan trifluoroasetilasi**



A. KCKT Gliserida

- banyak dilakukan pemisahan trigliserida berdasarkan jumlah atom C
- ada hubungan linier antara log. Waktu retensi dengan jumlah atom C dan kejenuhan.
- setiap tambahan ikatan rangkap dua atom memperpendek waktu retensi .