



**PROGRAM STUDI KIMIA
UNIVERSITAS MA CHUNG**

Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151, Jawa Timur

**Modul
Praktikum Analisis Instrumentasi 2
SKI 2206**

NAMA :

NIM :

Jadwal Praktikum:

- Ruang Laboratorium MRCPP.
- Semester 4 dengan jumlah 2/6 (sks/js).
- Harus datang 5 menit di lab sebelum jam mulai – kalau tidak maka tidak diperkenankan masuk.
- Prasyarat: Lulus dalam Analisis Instrumentasi 1 dan lulus dalam Praktikum Analisis Instrumentasi 1.

JADWAL KEGIATAN PRAKTIKUM

- Absensi dan diskusi
- Sesi Eksperimen
- Sesi Penutup

Tim Penyusun Modul dan Pengampu Matakuliah:

1. Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
2. Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.

LEMBAR PENGESAHAN

No. Dokumen : 005
Revisi : -
Mata Kuliah Praktikum : Praktikum Analisis Instrumentasi 2
Kode Mata Kuliah Praktikum : SKI 2206
SKS : 2
Program Studi : Kimia
Semester : 4 (empat)

Tim Penyusun:

Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.

Malang, 01 Agustus 2017

Menyetujui,
Ketua Program Studi Kimia



Dr. Yuyun Yuniati, ST, MT
20140008

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi



Rudy Setiawan, S.Si., MT
20080042

Daftar isi

Contents

Lembar Pengesahan.....	Error! Bookmark not defined.
Daftar isi	ii
Kata Pengantar	iv
Pengantar Keamanan dan Keselamatan Laboratorium.....	1
Pengantar	1
Poin-Poin Keamanan dan Keselamatan Laboratorium.....	1
<i>Definisi</i>	1
Prinsip Keselamatan Secara Umum	1
Pencegahan Dan Pemadaman Kebakaran	2
Pertolongan Pertama Pada Kecelakaan	2
Antisipasi Gempa Bumi.....	2
Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Listrik.....	3
Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Gas	3
Penggunaan Bahan Kimia Dengan Aman	3
Pembuangan Limbah	3
Prinsip Keselamatan Ketika Melakukan Eksperimen Biologis	4
BAB 1 Dasar Teori Kromatografi.....	5
Teori kromatografi.....	5
<i>Konstanta distribusi</i>	6
<i>Waktu retensi</i>	7
<i>Hubungan antara laju migrasi dan konstanta distribusi</i>	8
<i>Faktor retensi, K</i>	8
<i>Resolusi kolom</i>	9
BAB 2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	11
Instrumentasi dalam KCKT	11
Pompa.....	13
Injektor	13
Kolom.....	14
Detektor.....	15
Degasser	15
Pemanas (oven) kolom	15
Kolom fase terbalik (<i>reverse-phase column</i>)	16
Kolom fase normal.....	17
Kolom Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC).....	18
BAB 3 Kromatografi Cair – Spektroskopi Massa (LC-MS)	19
Komponen-komponen dalam Sistem LC-MS.....	20
Sistem Ionisasi – <i>Electrospray Ionization (ESI)</i>	21
Spektra Massa.....	22
Perhitungan Ion Mutivalen	24
Quadropole MS.....	24
Karakteristik Quadropole MS.....	25
BAB 4 Kromatografi Gas.....	27

Pengantar	27
Tekanan	27
Polaritas Senyawa Analit vs. Polaritas Fase Diam dalam Kolom.....	28
Panjang Kolom	28
Ketebalan Fase Diam dalam Kolom.....	29
Internal Diameter Kolom	29
Temperatur Kolom.....	30
Kecepatan Gas Alir	30
Jumlah Sampel.....	30
BAB 5 Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa (GC-MS).....	31
Tipe-tipe Ion.....	32
Konfigurasi GC-MS	33
Metode Ionisasi	34
Electron Ionization (EI).....	34
Positif Chemical Ionization (PCI)	35
Negative Chemical Ionization (NCI).....	38
Mode-Mode Akuisisi	40
Analisis Kualitatif dengan GC-MS	40
BAB 6 Analisa Pigmen dengan LC-MS.....	42
BAB 7 Analisa Senyawa Volatil dengan GC-MS.....	43
Daftar Pustaka	44

Kata Pengantar

Praktikum Analisis Instrumentasi 2 dirancang untuk membekali mahasiswa tentang prinsip kerja, pengoperasian, analisa sampel dan pengolahan data menggunakan kromatografi cair spektrometri masa (liquid chromatography mass spectrometry (LCMSMS)) dan kromatografi gas spektrometri masa (gas chromatography mass spectrometry (GCMS)) serta melakukan penelitian sederhana atau penelitian dalam lingkup kecil (mini-research) dengan topik pangan fungsional dan energi terbarukan.

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah (CPMK) dari matakuliah praktikum analisis instrumentasi 2 ini adalah melakukan mini-research dengan topik pangan fungsional dan energi terbarukan (Psikomorik 4) menggunakan instrumentasi LCMSMS dan GCMS (Kognitif 3) serta menyajikan laporan (Afektif 4) secara berkelompok dan bertanggung jawab.

Sedangkan sub-CPMK terdiri dari:

1. Mahasiswa menentukan judul mini-research dengan topik pangan fungsional dan energi terbarukan (PD2).
2. Mahasiswa memahami prinsip kerja dan mengetahui cara pengoperasian, analisa sampel dan pengolahan data menggunakan kromatografi cair spektrometri masa (liquid chromatography mass spectrometry (LCMSMS)) (P1, P2, P4, KK2, KK3).
3. Mahasiswa memahami prinsip kerja dan mengetahui cara pengoperasian, analisa sampel dan pengolahan data menggunakan kromatografi gas spektrometri masa (gas chromatography mass spectrometry (GCMS)) (P1, P2, P4, KK2, KK3).
4. Mahasiswa memahami dan mengetahui cara melakukan mini-research yang dibimbing oleh peneliti MRCPP (P4, KU3, KK1, K 2).
5. Mahasiswa memahami dan mengetahui cara melakukan analisa data dan memuat laporan hasil mini-research yang dibimbing oleh peneliti MRCPP (KU1, KU2, KK3, PD2, PD3).

Modul ini dirancang fokus untuk memberikan ulasan umum terkait dengan metode LC-MS dan GC-MS. Sedangkan dalam menentukan judul mini-riset tugas dalam praktikum analitik instrumentasi 2 ini, maka mahasiswa akan langsung diarahkan oleh dosen terkait.

Malang, 20 April 2018

Pengantar Keamanan dan Keselamatan Laboratorium

Pengantar

Dalam melakukan praktikum kimia instrumentasi mahasiswa akan bekerja dengan beberapa alat dan bahan yang memiliki resiko terhadap kemanan dan keselamatan diri oleh sebab itu sebelum memulai praktikum wajib diberikan pengantar mengenai kesehatan dan keselamatan kerja. Melalui pengantar keamanan dan keselamatan laboratorium ini diharapkan laboratorium menjadi tempat yang aman untuk bekerja, sistem yang aman untuk melakukan penelitian dan pengajaran, dan menyediakan bahan-bahan dan peralatan yang aman untuk digunakan. Seluruh isi dari pengantar ini merupakan satu kesatuan yang mengikat seluruh praktikan sehingga wajib untuk dilaksanakan. Setiap pelanggaran dapat berakibat kepada keamanan dan keselamatan diri praktikan sendiri.

Poin-Poin Keamanan dan Keselamatan Laboratorium

Definisi

- a. Universitas = Universitas Ma Chung
- b. MRCPP = Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments
- c. Laboratorium MRCPP = Laboratorium Preparasi, Analisis dan Mikrobiologi (gedung R&D lantai 3)
- d. Staf MRCPP = staf Peneliti dan Asisten Peneliti di Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments
- e. Pihak Internal = dosen, peneliti, atau mahasiswa Universitas Ma Chung
- f. Pihak Eksternal = dosen, peneliti, atau mahasiswa di luar Universitas Ma Chung
- g. Kondisi darurat = kejadian yang tidak normal, terjadi tiba-tiba, mengganggu kegiatan dan perlu segera ditanggulangi
- h. Kebakaran = suatu reaksi oksidasi eksotermis yang berlangsung cepat dari suatu bahan yang disertai dengan timbulnya nyala api
- i. APAR = alat pemadam api ringan
- j. P3K = pertolongan pertama pada kecelakaan
- k. UGD = unit gawat darurat
- l. *Emergency exit* = pintu keluar darurat yang dapat diakses ketika terjadi kondisi darurat
- m. *Emergency route* = rute yang dapat diakses ketika terjadi kondisi darurat
- n. Gempa bumi = terjadinya pergeseran lempengan tanah di bawah permukaan bumi yang mengakibatkan guncangan
- o. Furnace = tungku pemanas
- p. Fume hood = sungkup asap atau lemari asap
- q. Disinfection = teknik pembasmian mikroba dengan bahan kimia untuk mencegah terjadinya infeksi atau pencemaran
- r. Sterilisasi = teknik pembasmian mikroba menggunakan panas suhu tinggi
- s. Aseptis = teknik bekerja dengan menjaga kesterilan ketika menangani mikroba untuk mencegah kontaminasi
- t. Mutagen = bahan kimia yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan materi genetik

Prinsip Keselamatan Secara Umum

1. Pengguna laboratorium diharapkan bekerja dengan rapi, menempatkan barang sebagaimana mestinya dan menjaga kebersihan ruangan

2. Pengguna laboratorium wajib mengenakan pakaian dan alas kaki tertutup yang sesuai dan nyaman untuk bekerja di dalam laboratorium.
3. Pengguna laboratorium diharapkan untuk tidak bekerja secara terburu-buru.
4. Pengguna laboratorium dapat melakukan relaksasi badan terutama selama bekerja dalam laboratorium secara terus-menerus.
5. Pengguna laboratorium diharapkan mengerti cara penggunaan fasilitas penanggulangan kondisi darurat, seperti APAR. Instruksi penggunaan fasilitas tersebut dapat dibaca pada manual alat.

Pencegahan Dan Pemadaman Kebakaran

1. Ruangan laboratorium harus dilengkapi dengan alarm penanda kebakaran.
2. Hindari penggunaan api di tempat-tempat yang mudah terbakar.
3. Perhatikan batas aman penggunaan bahan berbahaya
4. Jika bekerja dengan melibatkan api, bekerjalah pada meja/bangku yang tidak mudah terbakar.
5. Jangan meletakkan benda yang mudah terbakar dekat dengan sumber panas.
6. Pastikan pintu keluar ruangan tidak terkunci dan tidak terhalang benda apapun.
7. Sebelum pulang, pastikan lampu sudah dimatikan dan tidak ada api yang menyala.
8. Larangan merokok berlaku di setiap tempat di Universitas Ma Chung, termasuk MRCPP.
9. Jika terjadi kebakaran, beri peringatan kepada orang-orang di sekitar.
10. Usahakan untuk memadamkan api dengan APAR sebelum api bertambah besar.
11. Jika api bertambah besar hingga mencapai atap, segera mengungsikan diri ke luar gedung menggunakan tangga darurat. Jangan gunakan elevator.
12. Sebisa mungkin pastikan peralatan elektronik sudah dimatikan.
13. Informasikan kepada Direktorat Pemeliharaan dan Pelayanan Kampus dan Dinas Pemadam Kebakaran.

Pertolongan Pertama Pada Kecelakaan

1. Gunakan perlengkapan P3K untuk mengatasi luka ringan. Untuk luka serius, segera bawa korban ke UGD rumah sakit terdekat atau hubungi layanan ambulans.
2. Jika terjadi kesulitan bernapas pada korban, berikan pertolongan pernapasan buatan dengan metode mulut-ke-mulut atau metode Holger-Nielsen.
3. Untuk penyelamatan pada korban terkena bahan kimia pada mata segera bilas mata yang terkena bahan kimia dengan air mengalir sebanyak-banyaknya kemudian segera bawa ke UGD.
4. Untuk penyelamatan pada korban terkena bahan kimia pada badan segera bilas anggota tubuh yang terkena bahan kimia dengan air mengalir sebanyak-banyaknya kemudian segera bawa ke UGD.

Antisipasi Gempa Bumi

1. Pastikan tidak ada sumber api yang menyala. Jika ada api yang menyala, segera padamkan.
2. Berhati-hatilah dengan peralatan yang terbuat dari kaca.
3. Selamatkan diri dengan bersembunyi di bawah meja.
4. Jangan berada terlalu dekat dengan tembok atau gerbang.
5. Buka pintu ruangan dan pastikan pintu tidak terkunci dan tidak ada yang menghalangi.

6. Gunakan tangga darurat untuk evakuasi ke luar gedung menuju tanah lapang.
7. Jangan keluar dengan terburu-buru.
8. Pastikan keberadaan dan keselamatan rekan kerja dengan saling menghubungi satu sama lain.

Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Listrik

1. Pastikan untuk menggunakan kabel yang tepat sesuai arus listrik yang ada
2. Berhati-hatilah saat menyekat kabel
3. Berhati-hatilah terhadap resiko tersengat listrik
4. Berhati-hatilah jika terjadi hubungan pendek arus listrik.
5. Hindari terbentuknya genangan air di dekat peralatan listrik.
6. Jangan menggunakan peralatan elektronik jika tangan dalam keadaan basah.
7. Gunakan bahan glass-fiber atau porselen untuk menyekat kabel yang berada dekat dengan *furnace*.
8. Selalu perhatikan polaritas dari komponen elektronik agar tidak menyebabkan arus pendek yang berpotensi menyebabkan kebakaran.
9. Gunakan alas kaki untuk menghindari listrik statis.

Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Gas

1. Pastikan tidak ada kebocoran pada tabung gas.
2. Pasang detektor/alarm untuk menandai adanya kebocoran gas.
3. Pastikan ventilasi udara berjalan dengan baik.
4. Jangan menyalakan api di dekat gas.
5. Gunakan masker pelindung wajah ketika bekerja dengan gas berbahaya.
6. Jika terjadi kebocoran gas, segera buka jendela lalu matikan gas.
7. Pastikan tabung gas selalu berada dalam tempat yang disediakan dan dalam kondisi terantai ke dinding bangunan.

Penggunaan Bahan Kimia Dengan Aman

1. Jangan menyentuh bahan kimia secara langsung
2. Gunakan fume hoods jika bekerja dengan bahan kimia berbahaya
3. Pastikan setiap kontainer penampung bahan kimia dilabel dengan keterangan bahaya.
4. Bahan yang dipindahkan ke botol kaca juga harus diberi label dengan mencantumkan nama bahan kimia, konsentrasi (jika ada), tanggal preparasi, dan personel yang menyiapkan.
5. Berhati-hatilah jika mencampur bahan kimia.
6. Benda-benda yang berbahaya disimpan dan dikunci di lemari penyimpanan yang terbuat dari logam.
7. Kembalikan bahan-bahan kimia yang telah digunakan ke tempat semula.
8. Jika terjadi kecelakaan segera lihat petunjuk pada poin C.

Pembuangan Limbah

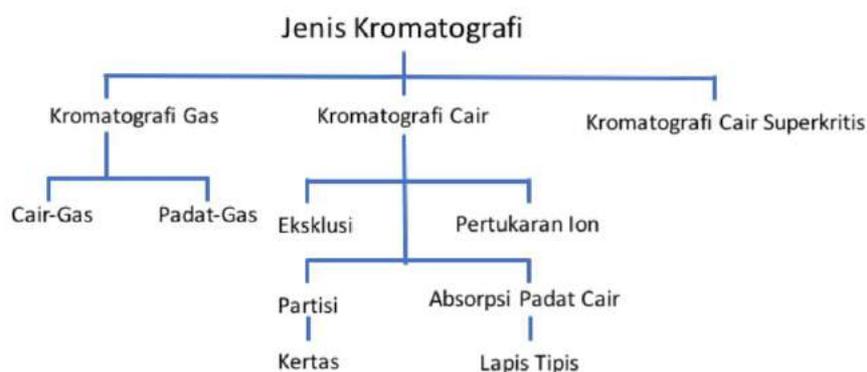
1. Limbah cair harus disaring dari endapan-endapan yang masih tersisa.
2. Tempatkan limbah cair pada kontainer.
3. Letakkan kontainer pada tempat yang sesuai.

Prinsip Keselamatan Ketika Melakukan Eksperimen Biologis

1. Jangan makan, minum, menyiapkan atau menyimpan makanan dalam laboratorium.
2. Kenakan jas laboratorium berwarna putih selama berada di dalam laboratorium biologi. Lepaskan jas laboratorium ketika keluar dari laboratorium.
3. Selalu pasang label untuk setiap kontainer penampung bahan kimia.
4. Pengguna laboratorium biologi harus menguasai teknik *disinfection*, sterilisasi dan aseptis.
5. Bahan yang digunakan dalam eksperimen biologis harus disterilisasi sebelum dibuang.
6. Jika berhubungan dengan hewan uji coba, gunakan sarung tangan kulit yang tebal.
7. Pastikan ruang pengembangbiakkan selalu dalam keadaan bersih.
8. Penanganan pembuangan organ tubuh atau karkas dari hewan uji coba serta jarum suntik atau pisau yang digunakan dalam eksperimen yang menggunakan hewan uji diserahkan kepada pihak tertentu.
9. Ambil langkah-langkah yang memadai (memakai bola hisap dan kaca mata) terhadap kemungkinan bahan biologis berbahaya ketika menangani darah manusia atau jaringan.
10. Gunakan pelindung wajah dan sarung tangan ketika bekerja dengan sinar ultraviolet.
11. Gunakan sarung tangan ketika bekerja dengan mutagen.
12. Limbah cair harus diproses.

BAB 1 Dasar Teori Kromatografi

Seorang analis memiliki beberapa peralatan seperti kromatografi untuk mengukur analit yang berbeda dalam sampel yang kompleks. Kekuatan kromatografi berasal dari kemampuannya untuk memisahkan campuran senyawa yang akan dianalisa, atau "analit", dan menentukan identitas masing-masing (struktur kimia) dan konsentrasinya. Kromatografi dapat dibagi menjadi tiga tipe dasar yang meliputi kromatografi gas, cairan, dan superkritis. Kromatografi cair selanjutnya dapat dibagi menjadi pertukaran ion, pemisahan berdasarkan ukuran, dan bahkan diperluas ke teknik elektroforesis berbasis gel. Bab ini akan memberikan pengenalan dasar untuk berbagai kromatografi, khususnya cair yang paling sering digunakan dalam separasi pigmen fotosintesis dan beberapa senyawa lainnya. Hubungan antara masing-masing jenis kromatografi diilustrasikan pada Gambar 3.



Gambar 1. Kategori kromatografi dan hubungannya satu dengan lain menurut Dunnivant dan Ginsbach.

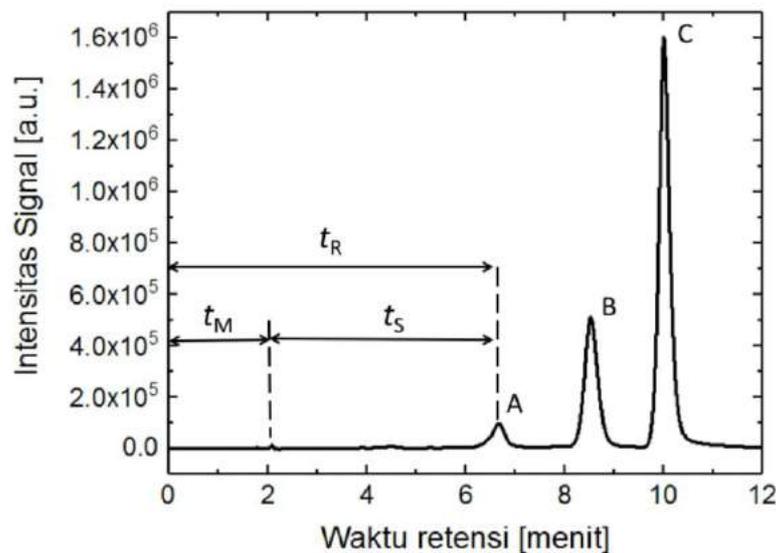
Secara umum, setiap jenis kromatografi terdiri dari dua langkah yang berbeda yaitu kromatografi (atau pemisahan senyawa individu dalam pita elusi yang berbeda) dan identifikasi (deteksi setiap pita elusi). Pada metode kromatografi cair pemisahan terjadi dalam fase cair. Setiap pita atau puncak yang keluar dari kolom dan identifikasi terjadi oleh detektor yang relatif universal. Salah satu detektor yang sangat umum untuk kromatografi cair adalah detektor UV-VIS yang mendeteksi spektrum absorpsi dari analit. Detektor yang umum lainnya misalnya adalah spektrometri massa (MS) yang mengubah setiap analit dari spesies netral secara kimia menjadi kation positif, biasanya memecah berbagai ikatan dalam proses. Pendeteksian massa potongan individu (disebut sebagai fragmen) tersebut memungkinkan untuk identifikasi secara konklusif dari struktur kimia analit.

Teori kromatografi

Semua sistem kromatografi memiliki fase gerak yang mengangkut analit melalui kolom dan fase diam yang berupa resin di dalam kolom. Fasa diam secara berinteraksi dengan masing-masing analit berdasarkan struktur kimianya, menghasilkan pemisahan masing-masing analit sebagai fungsi waktu yang dihabiskan dalam kolom pemisahan. Semakin sedikit analit berinteraksi dengan fase diam, semakin cepat mereka diangkat melalui sistem oleh fase gerak. Demikian sebaliknya terjadi pada analit yang berinteraksi lebih kuat. Dengan demikian, banyak analit dalam sampel diidentifikasi oleh waktu retensi (atau waktu tambat) dalam sistem untuk satu set kondisi tertentu. Dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, tekanan fase gerak (cair), laju aliran, laju linier, dan polaritas fase gerak, semuanya, mempengaruhi waktu retensi senyawa. Ilustrasi waktu retensi ditunjukkan pada Gambar 5. Persamaan di bagian atas gambar akan dibahas nanti.



Gambar 2. Pemisahan ekstrak pigmen fotosintesis yang terjadi pada kromatografi kolom. Tampak pita-pita berwarna terpisah akibat interaksi dengan resin pada kolom



Gambar 3. Diagram plot kromatogram yang menunjukkan analisa identifikasi senyawa A, B dan C berdasarkan waktu retensi dan luas pita.

Diagram plot pada gambar 5 dinamakan **kromatogram**, yang sangat penting untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Posisi pita pada sumbu x menunjukkan waktu retensi dalam satuan menit yang digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif komponen dalam sampel, sedangkan luas area pita memberikan data pengukuran kuantitatif dari jumlah setiap komponen yang terdeteksi. Dalam gambar 5 ditunjukkan adanya pemisahan yang baik dari tiga pita yaitu A, B dan C yang merepresentasikan komponen yang terpisah dan teridentifikasi dengan baik. Kita akan membahas lebih detail dibawah untuk memahami informasi yang diberikan pada gambar 5 tersebut.

Konstanta distribusi

Efektivitas dari kolom kromatografi dalam memisahkan dua komponen bergantung salah satunya pada laju elusi relatif dari kedua komponen tersebut. Laju tersebut dapat dideterminasi dari rasio konsentrasi komponen pada setiap fasenya. Semua pemisahan berbasis kromatografi adalah berdasarkan perbedaan interaksi yang terjadi pada komponen

yang terdistribusi antara fase gerak dan fase diam (stasioner). Untuk komponen A, maka kesetimbangan dapat diekspresikan dengan rumus:

$$A(\text{fase gerak}) \rightleftharpoons A(\text{fase diam}) \quad (2.1)$$

Konstanta kesetimbangan K_c untuk reaksi tersebut dinamakan **konstanta distribusi**, yang didefinisikan sebagai berikut,

$$K_c = \frac{(a_A)_S}{(a_A)_M} \quad (2.1)$$

dimana $(a_A)_S$ merupakan aktifitas komponen A dalam fase stasioner (fase diam) dan $(a_A)_M$ adalah aktivitas komponen A dalam fase gerak (*mobile phase*). Seringkali kita mensubstitusikan c_S , konsentrasi molar dari komponen dalam fase stasioner, dengan $(a_A)_S$, dan c_M untuk konsentrasi molarnya dalam fase gerak, $(a_A)_M$. Dengan demikian, kita dapat dengan lebih singkat menuliskan rumus diatas menjadi:

$$K_c = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.2)$$

Secara ideal, konstanta distribusi adalah konstan untuk semua konsentrasi komponen, sehingga c_S proporsional langsung terhadap c_M .

Waktu retensi

Kalau kita perhatikan kembali gambar 5, kita melihat pita kecil paling kiri pada waktu retensi 2 menit. Pita kecil tersebut adalah spesies yang tidak diperoleh oleh fase diam. Waktu yang ditunjukkan dengan symbol t_M dinamakan **waktu hampa** atau **waktu mati** (*void time* atau *dead time*) yaitu waktu antara injeksi sampel dan kenampakan pita kecil ini. Dengan kata lain waktu hampa memberikan informasi besaran laju rata-rata migrasi dari fase gerak dan merupakan parameter yang penting dalam mengidentifikasi pita-pita analit. Sedangkan waktu yang dibutuhkan oleh komponen A terdeteksi oleh detektor setelah injeksi sampel dinamakan **waktu retensi** yang direpresentasikan dengan symbol t_R . Analit yang didapatkan karena telah melewati waktu t_S dalam fase stasioner. Dengan demikian waktu retensi dapat dipahami dengan rumus:

$$t_R = t_S + t_M \quad (2.4)$$

Laju linear rata-rata dari migrasi komponen, \bar{v} (biasanya dalam cm/detik), adalah sebagai berikut dibawah, dimana L merupakan panjang dari kolom yang digunakan.

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (2.5)$$

Sedangkan laju linear rata-rata dari molekul fase gerak adalah

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (2.6)$$

Hubungan antara laju migrasi dan konstanta distribusi

Untuk mengkorelasikan antara laju migrasi dari komponen dan konstanta distribusinya, maka kita mengekspresikan laju sebagai fraksi dari laju fase gerak:

$$\bar{v} = u \times \text{fraksi waktu dari komponen yang dihabiskan dalam fase gerak}$$

Fraksi tersebut merupakan jumlah rata-rata mol komponen dalam fase gerak dibagi dengan jumlah total mol komponen dalam kolom:

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{mol komponen dalam fase gerak}}{\text{mol total komponen}} \quad (2.7)$$

Jumlah mol total komponen dalam fase gerak adalah sama dengan konsentrasi molar, c_M , dari komponen pada fase tersebut dikalikan dengan volumenya, V_M . Sehingga didapatkan:

$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M} \quad (2.8)$$

Dengan memasukkan konstanta distribusi (persamaan 2.2), maka kita mendapatkan ekspresi dibawah ini,

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_c V_S / V_M} \quad (2.9)$$

dengan demikian kita telah mendapatkan korelasi antara laju migrasi dan konstanta distribusi.

Faktor retensi, K

Faktor retensi merupakan parameter yang sangat penting untuk menganalisa dan membandingkan laju migrasi komponen melalui kolom. Dengan demikian seorang analis dapat membandingkan kolom satu dengan kolom yang lain dengan lebih tepat. Untuk komponen A, maka faktor retensi k_A didefinisikan sebagai berikut:

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (2.10)$$

dimana K_A adalah konstanta distribusi dari komponen A. Dengan melakukan substitusi persamaan 2.10 dengan 2.9, serta mempertimbangkan laju linear migrasi komponen (persamaan 2.5) dan laju linear rata-rata dari fase gerak (persamaan 2.6), maka persamaan faktor retensi dapat disederhanakan menjadi:

$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_S}{t_M} \quad (2.11)$$

Dengan demikian faktor retensi, k_A , untuk komponen A berelasi dengan laju dimana A bermigrasi melewati kolom, dan dapat dihitung berdasarkan data kromatogram seperti gambar 4 diatas.

Faktor Selektivitas

Faktor selektivitas untuk dua komponen A dan B dalam kolom memberikan informasi terkait seberapa baik kolom akan memisahkan kedua komponen tersebut. Oleh sebab itu faktor selektivitas dari komponen A dan B dapat didefinisikan sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (2.12)$$

dimana K_B adalah konstanta distribusi dari komponen B dan K_A adalah konstanta distribusi dari komponen A. Apabila disubstitusi dengan persamaan 2.10 akan didapatkan hubungan antara faktor selektivitas untuk kedua komponen tersebut dengan faktor retensinya. Sedangkan apabila disubstitusi dengan persamaan 2.11, maka akan dihasilkan persamaan bahwa faktor selektivitas dapat dihitung dari data waktu retensi dan waktu hampa pada kromatogram.

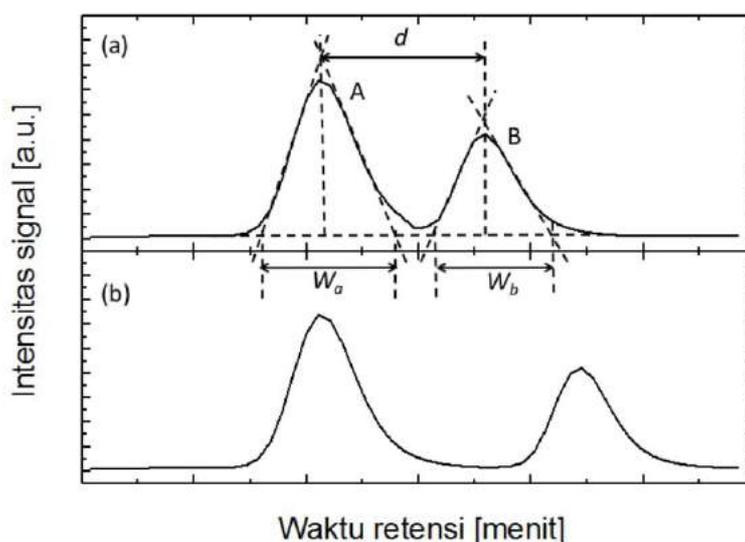
Resolusi kolom

Resolusi kolom (R_S) merupakan dasar kuantitatif dimana dua pita terpisah satu dengan yang lainnya dalam jarak (d) relatif terhadap lebar pita. Secara jelas pengertian dari resolusi kolom ini dapat diilustrasikan pada gambar 5 yang menunjukkan kromatogram pemisahan komponen A dan B. Secara persamaan, maka resolusi kolom dapat didefinisikan sebagai berikut:

$$R_S = \frac{2d}{W_a + W_b} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_a + W_b} \quad (2.13)$$

dimana d merupakan jarak antara puncak pita A dan B, atau dapat dihitung dengan data waktu retensi puncak A dan B. Sedangkan lebar pita (W) dapat dihitung seperti yang diilustrasikan pada gambar 6.

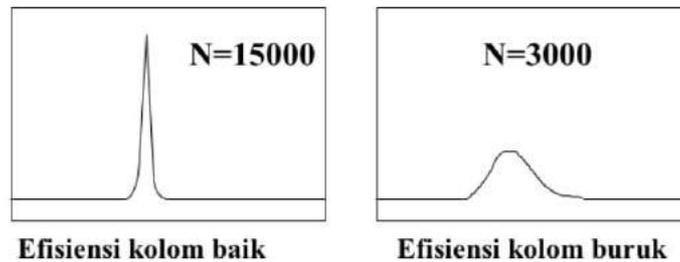
Resolusi juga merupakan suatu ukuran efisiensi kolom. Parameter lain yang digunakan untuk menghitung efisiensi kolom adalah jumlah pelat teoritis (*number of theoretical plates, N*). Jumlah pelat teoritis (N) dan tinggi pelat atau jarak setara dengan pelat teoritis (*height equivalent to a theoretical plate, H*) digunakan resmi dalam literatur dan oleh perusahaan pembuat kolom selalu dicantumkan dalam informasi spesifikasi kolom sebagai informasi yang menunjukkan ukuran performansi kolom tersebut.



Gambar 4. Pita-pita komponen A dan B yang terpisah dengan baik dan parameter untuk determinasi resolusi (R_S). Tampak jelas resolusi pemisahan pita A dan B pada kromatogram (b) lebih tinggi dibanding pemisahan pada kromatogram (a).

Jumlah pelat teoritis (N) dapat dideterminasi dari data kromatogram, tepatnya dari data waktu retensi dari suatu pita (t_R) dan lebar pita tersebut (W) yang dicatat, dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.14)$$



Gambar 5. Jumlah pelat teoritis menunjukkan efisiensi kolom sehingga dapat membedakan antara kolom yang baik dan kolom yang buruk. Informasi jumlah pelat teoritis dapat diketahui dari lembar spesifikasi kolom yang dikeluarkan oleh pabrikannya.

Pelat dapat dibayangkan sebagai suatu jarak sepanjang kolom dimana terdapat kesetimbangan penuh dari sampel diantara dua fase yang ada. Semakin tinggi jumlah pelat dari suatu kolom dengan panjang tertentu artinya semakin pendek tinggi pelat (H), dan semakin efisien kolom bekerja. Jarak melalui kolom yang dideskripsikan sebagai tinggi, karena sejak awal penemuan kolom kromatografi, kolom tersebut kebanyakan dipasang secara vertikal:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.15)$$

dimana L adalah panjang dari kolom.

Persamaan yang telah merelasikan antara resolusi kolom dan jumlah pelat, serta faktor retensi dan faktor selektivitas dari sepasang komponen (A dan B) pada kolom dapat diekspresikan sebagai berikut:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1+k_B} \right) \quad (2.16)$$

dimana k_B adalah faktor retensi dari spesies yang bergerak paling lambat dan α adalah faktor selektivitas.

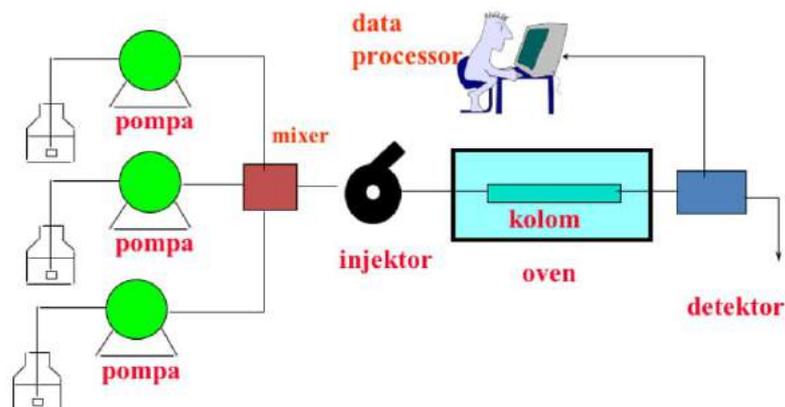
BAB 2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high-performance liquid chromatography (HPLC)* merupakan metode kromatografi elusi cair yang paling banyak digunakan pada bidang yang luas. Teknik ini digunakan oleh kimiawan untuk memisahkan dan mendeterminasi senyawa baik organik, anorganik dan material biologis. KCKT menggunakan teknik kromatografi cair, sehingga fase gerak yang digunakan adalah pelarut cair. Sedangkan fase diam bersifat padat, berpori, material aktif permukaan dalam bentuk partikel kecil atau pendukung padat yang dilapisi lapisan tipis cairan. Tipe-tipe KCKT biasanya diklasifikasikan berdasarkan mekanisme separasi atau jenis fase stasioner yang digunakan. Tipe-tipenya antara lain

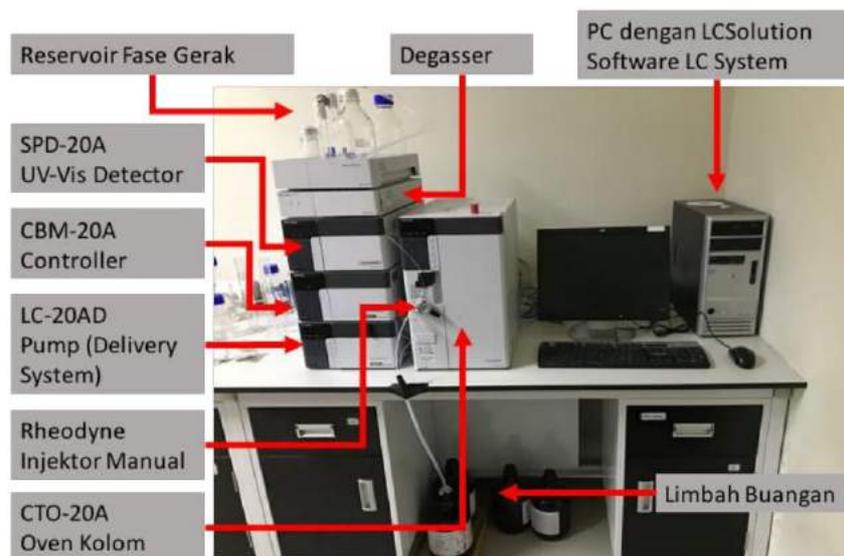
1. kromatografi partisi,
2. kromatografi adsorpsi,
3. kromatografi pertukaran ion,
4. kromatografi eksklusi ukuran (*size-exclusion*),
5. kromatografi afinitas, dan
6. kromatografi kiral.

Instrumentasi dalam KCKT

Metode isokratik and metode gradien (*low pressure* dan *high pressure*) merupakan metode elusi kromatografi cair yang sering digunakan pada KCKT. Metode isokratik pada umumnya menggunakan jenis dan rasio pelarut yang sama, sedangkan metode gradient jenis dan rasio pelarut bisa diatur selama proses analisa. Berikut adalah skema instrumentasi dari tipe elusi gradient *high-pressure* (Gambar 8) dan sistem HPLC yang digunakan mahasiswa S1 kimia Universitas Ma Chung beserta daftar bagian dari KCKT beserta fungsi dan tipenya masing-masing (Tabel 1).



Gambar 6. Skema diagram blok instrumentasi KCKT tipe *high-pressure*



Gambar 7. Sistem KCKT analitik dari Shimadzu yang terdapat di laboratorium MRCPP yang digunakan oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung.

Tabel 1. Bagian KCKT beserta fungsi yang didasarkan pada setup dari produk Shimadzu yang digunakan di laboratorium MRCPP oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung.

No	Bagian KCKT	Fungsi	Tipe
1	Pengontrol sistem	Untuk menghubungkan antara bagian KCKT dan komputer	CBM-20Alite; CBM-20A
2	Tempat pelarut	Untuk menampung pelarut tunggal atau pelarut campuran	-
3	<i>Degasser</i>	Untuk menghilangkan gelembung udara yang terjadi saat dua jenis pelarut bercampur (misalnya etanol dan air)	DGU-20A3 (isokratik dan high pressure), DGU20A5 (low pressure)
4	Pencampur pelarut; <i>low pressure gradient valve</i>	Untuk mencampur pelarut sesuai dengan metode KCKT yang digunakan	-
5	Unit pengantar pelarut (pompa)	Untuk mengalirkan pelarut keseluruh bagian KCKT	LC-20AD (Isokratik), LC-20AB (high pressure), LC-20AT (low pressure)
6	Auto-sampler	Tempat sampel yang dilengkapi dengan pendingin dan untuk menginjek sampel secara otomatis	SIL-20AC
	Manual injector	Tempat untuk menginjek sampel menggunakan micro syringe	Rheodyne 7725
7	Oven kolom	Untuk menjaga suhu kolom dan mendukung analisa yang stabil	CTO-20AC
8	kolom	Kolom fase normal atau kolom fase terbalik	C8, C18, C30 (fase terbalik), silica (fase normal)
9	Detektor	Untuk mendeteksi senyawa yang	SPD-20AV (UV-Vis

		sudah terpisahkan	Detector), SPD-M20A (PDA detector), MS
10	Computer + LC solution	Untuk pengoperasian KCKT	-
11	Pengkoleksi fraksi (tambahan)	Untuk mengoleksi fraksi yang sudah dipisahkan	FRC-10A
12	Keran penyeleksi arah alir (tambahan)	Untuk mengatur arah alir pelarut ke tempat pembuangan atau ke detector MS	FCV-20AH

Pompa

Dalam perkembangan KCKT, pompa adalah bagian terpenting dari sistem. Perkembangan teknologi KCKT dapat dikatakan seiring dengan perkembangan teknologi sistem pompa. Pompa diposisikan di aliran paling atas dari sistem kromatografi cair dan menghasilkan aliran eluen dari reservoir pelarut ke sistem. Pada tahap awal perkembangan kromatografi cair, untuk dapat menghasilkan tekanan tinggi adalah salah satu persyaratan sistem yang paling penting. Namun, saat ini, tekanan tinggi sudah merupakan persyaratan yang lazim dari KCKT yang standar, sehingga yang lebih diutamakan saat ini adalah mampu memberikan tekanan yang konsisten pada kondisi apa pun, menyediakan laju aliran yang dapat dikontrol dan konsisten, karena perubahan dalam laju aliran sangat mempengaruhi sebagian besar analisis. Kebanyakan pompa yang digunakan dalam sistem kromatografi cair saat ini menghasilkan aliran dengan gerakan maju dan mundur dari piston yang digerakkan motor (*reciprocating pump*). Karena gerakan piston tersebut, maka pompa menghasilkan "pulsa". Ada perbaikan sistem yang besar untuk mengurangi denyutan pulsa dan pompa baru-baru ini menciptakan lebih sedikit pulsa dibandingkan dengan yang generasi lama. Namun, analisis terbaru membutuhkan sensitivitas yang sangat tinggi untuk mengukur jumlah analit yang sedikit, dan bahkan sedikit perubahan dalam laju aliran dapat mempengaruhi analisis. Oleh karena itu, pompa yang diperlukan untuk analisis sensitivitas tinggi harus sangat tepat.

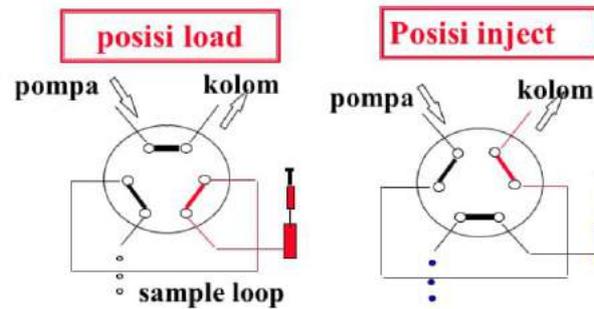


Gambar 8. Pompa KCKT dari Shimadzu seri LC-20AD

Injektor

Sebuah injektor ditempatkan di sebelah pompa. Metode yang paling sederhana adalah dengan menggunakan jarum suntik, dan sampel dimasukkan dengan jarum suntik ke aliran fase gerak. Karena ketepatan pengukuran kromatografi cair sangat dipengaruhi oleh reproduktibilitas injeksi sampel, desain injektor menjadi faktor penting. Metode injeksi yang paling banyak digunakan adalah berdasarkan *sampling loop*. Penggunaan sistem *autosampler* atau injektor

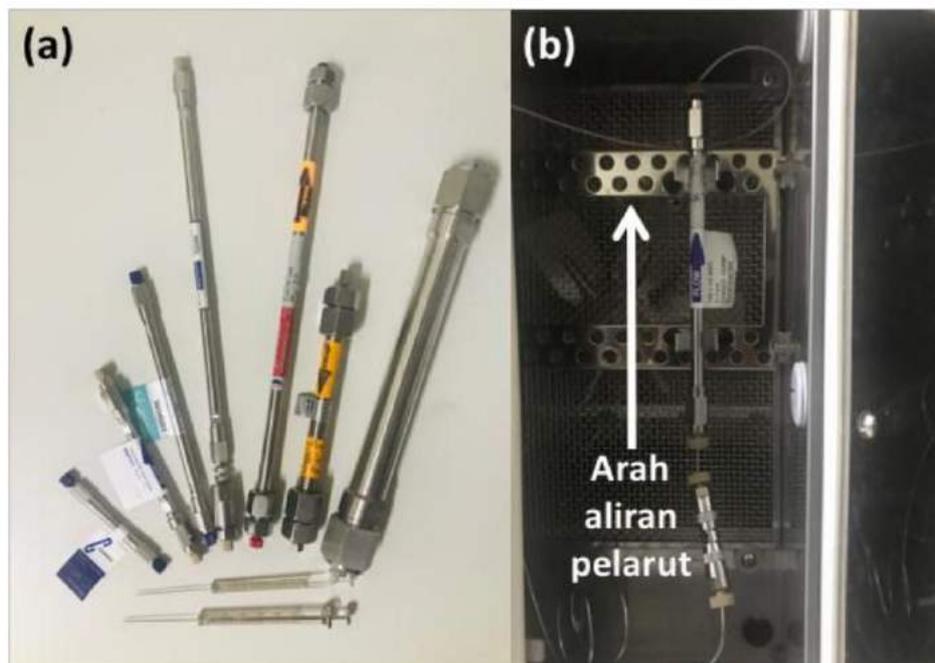
otomatis juga digunakan secara luas yang memungkinkan injeksi berulang dalam satu set waktu yang dijadwalkan.



Gambar 9. Gambar skematis sistem injektor KCKT

Kolom

Pemisahan dilakukan di dalam kolom, oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa kolom adalah jantung dari sistem kromatografi cair. Teori kolom kromatografi belum berubah sejak masa Tswett, namun ada perbaikan terus-menerus dalam pengembangan kolom. Kolom baru-baru ini sering disiapkan dalam perumahan baja tahan karat, bukan kolom kaca yang digunakan dalam eksperimen Tswett. Bahan pengepakan yang umumnya digunakan adalah silika atau gel polimer dibandingkan dengan kalsium karbonat yang digunakan oleh Tswett. Eluen yang digunakan untuk kromatografi cair bervariasi dari pelarut asam hingga basa. Kebanyakan rumah kolom terbuat dari baja tahan karat, karena stainless tahan terhadap berbagai macam pelarut. Namun, untuk analisis beberapa analit seperti biomolekul dan senyawa ionik, kontak dengan logam tidak diinginkan, sehingga digunakan perumahan polieter eter keton (*PEEK*) kolom sebagai gantinya (lihat perumahan selang pada gambar 12(b) yang menghubungkan selang dengan kolom).



Gambar 10. (a) Berbagai jenis dan tipe kolom dan injektor yang digunakan oleh mahasiswa. (b) Pemasangan yang tepat dari kolom dengan memperhatikan arah aliran pelarut dan

penempatan kolom penjaga (*guard column*) untuk mengamankan kolom dari kemungkinan pengotor yang masuk.

Detektor

Pemisahan analit dilakukan di dalam kolom, sedangkan detektor digunakan untuk mengamati pemisahan yang diperoleh. Komposisi eluen konsisten ketika tidak ada analit yang hadir. Sedangkan kehadiran analit mengubah komposisi eluen. Detektor apa yang dilakukan untuk mengukur perbedaan ini. Perbedaan ini dimonitor sebagai bentuk sinyal elektronik. Ada berbagai jenis detektor yang tersedia, diantaranya yang digunakan dalam laboratorium MRCPP, Universitas Ma Chung adalah detektor diode array (DAD) yang dapat mengukur spektrum absorpsi dari panjang gelombang 190 s.d. 800 nm, dan detektor spektrometer massa (MS/MS).

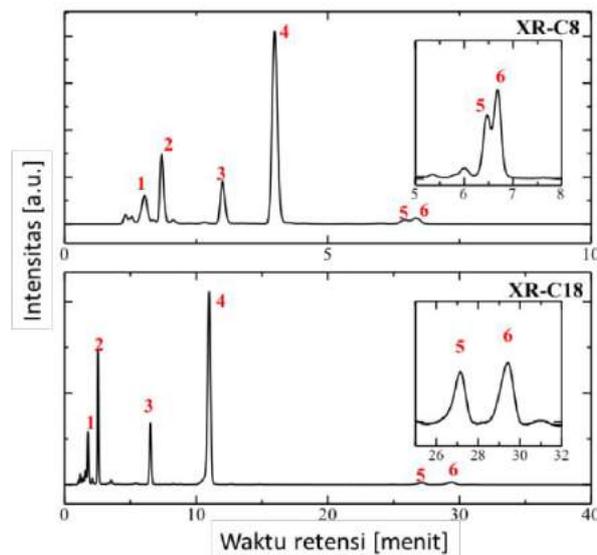
Degasser

Eluen yang digunakan untuk analisis kromatografi cair mungkin mengandung gas seperti oksigen yang tidak terlihat oleh mata kita. Ketika gas hadir dalam eluen, ini dideteksi sebagai kebisingan dan menyebabkan baseline tidak stabil. Metode yang umum digunakan meliputi penyemprotan (penggelembungan gas lembam), penggunaan aspirator, sistem distilasi, dan / atau pemanasan dan pengadukan. Namun, metode ini tidak nyaman dan juga ketika pelarut dibiarkan untuk jangka waktu tertentu (misalnya, selama analisis panjang), gas akan larut kembali secara bertahap. *Degasser* menggunakan membran membran polimer khusus untuk menghilangkan gas. Banyaknya pori-pori yang sangat kecil di permukaan tabung polimer memungkinkan udara masuk sambil mencegah cairan apa pun masuk melalui pori-pori. Dengan menempatkan tabung ini di bawah kontainer tekanan rendah, itu menciptakan perbedaan tekanan di dalam dan di luar tabung (lebih tinggi di dalam tabung). Perbedaan ini membiarkan gas terlarut bergerak melalui pori-pori dan mengeluarkan gas. Dibandingkan dengan degassing tipe batch klasik, *degasser* dapat digunakan secara on-line, lebih mudah dan efisien. Banyak sistem unit KCKT baru mengandung *degasser*.

Pemanas (oven) kolom

Pemisahan kromatografi cair sering sangat dipengaruhi oleh suhu kolom. Untuk mendapatkan hasil yang dapat diulang, penting untuk menjaga kondisi suhu yang konsisten. Juga untuk beberapa analisis, seperti gula dan asam organik, resolusi yang lebih baik dapat diperoleh pada suhu tinggi (50 hingga 80 °C). Hal ini juga penting untuk menjaga suhu stabil untuk mendapatkan hasil yang dapat diulang bahkan dianalisis di sekitar suhu kamar. Ada kemungkinan bahwa perbedaan suhu yang kecil menyebabkan hasil pemisahan yang berbeda (gambar 13). Jadi kolom umumnya disimpan di dalam oven kolom (pemanas kolom).

Sebagai ilustrasi, beberapa orang mungkin mengambil selebaran, tetapi yang lain mungkin tidak memperhatikan. Demikian pula, beberapa senyawa dapat "dihentikan" oleh kelompok fungsional tertentu, tetapi yang lain mungkin tidak. Ini mendefinisikan waktu elusi dari setiap komponen. Dengan menggunakan kata-kata yang lebih ilmiah, dapat dikatakan pemisahan adalah hasil dari afinitas yang berbeda antara gel dan komponen dalam sampel. Afinitas ini disebut "partisi" atau "adsorpsi" sehingga jenis pemisahan ini juga disebut kromatografi partisi atau adsorpsi, lebih tepatnya dinamakan mode fase terbalik adalah bagian dari mode partisi atau adsorpsi.



Gambar 13. Ilustrasi perbandingan penggunaan kolom yang berbeda (C8 dan C18) untuk memisahkan pigmen fotosintesis dari ekstrak daun suji (*Pleomele angustifolia*). Pita-pita diberikan nomor secara berurutan adalah pigmen violaksantin, zeaksantin, klorofil *a*, klorofil *b*, alfa-karoten dan beta-karoten.

Gel yang terbuat dari basa silika dan dimodifikasi dengan gugus fungsional oktadesil disebut gel *octadecyl silica* (ODS). Juga kolom yang dikemas dengan gel ODS disebut kolom ODS (atau disebut kolom C18). Di antara kolom berbasis silika yang tersedia di pasar, sekitar 80% dari mereka adalah kolom ODS. Idealnya, seluruh permukaan gel ODS dimodifikasi dengan gugus fungsi C18; Namun akan ada ruang tersisa yang tidak dimodifikasi. Bagian tersebut disebut "silanol sisa" dan keberadaan silanol sisa dapat mempengaruhi pemisahan. Seringkali "end capping" diterapkan pada gel untuk melumpuhkan sisa silanol. Hampir semua kolom ODS saat ini tertutup, namun tergantung pada jenis analit, kehadiran silanol dapat memberikan hasil pemisahan yang lebih baik.

ODS adalah kolom fase terbalik yang paling populer digunakan, namun karena C18 adalah rantai panjang, ia mungkin mempertahankan senyawa terlalu banyak dan akibatnya menghasilkan waktu analisis yang panjang. Jadi dalam kasus-kasus itu, lebih baik menggunakan kelompok fungsional dengan rantai yang lebih pendek, seperti C8 (oktil), C4 (butil), dan C3 (trimetil).

Kolom fase normal

Agak rumit untuk menjelaskan perbedaan teoritis rinci antara fase terbalik dan fase normal, sehingga kita akan tetap sederhana di sini sebagai pengantar. Gel dan fase gerak yang

digunakan untuk analisis KCKT memiliki polaritas yang berbeda. Air dan minyak adalah contoh terkenal dari sesuatu yang tidak bercampur: Air dikategorikan sebagai sesuatu dengan polaritas tinggi sementara minyak dikategorikan sebagai sesuatu dengan polaritas rendah. Minyak adalah jenis karbohidrat, terbuat dari karbon dan hidrogen; senyawa tersebut memiliki polaritas rendah. Sebaliknya, air terbuat dari oksigen dan hidrogen; senyawa tersebut memiliki polaritas yang lebih tinggi. Silika gel tanpa dimodifikasi memiliki polaritas yang tinggi, tetapi ketika gugus fungsi C18 dimodifikasi, polaritasnya menjadi rendah. Mode fase terbalik menggunakan gel dengan polaritas rendah (misalnya, ODS) dan fasa gerak dengan polaritas tinggi (misalnya air atau asetonitril). Mode fase normal menggunakan gel dengan polaritas tinggi (misalnya silika) dan fasa gerak dengan polaritas rendah (misalnya heksana atau kloroform). Alih-alih menggunakan kata polaritas rendah atau tinggi, juga umum digunakan kata-kata, hidrofobik atau hidrofobik. Sesuatu yang mudah larut dalam air (yaitu, polaritas tinggi) disebut hidrofilik dan sesuatu yang mudah larut dalam minyak (yaitu, polaritas rendah) disebut hidrofobik.

Pada tahap awal pengembangan HPLC, silika gel tanpa gugus fungsional hanya digunakan. Dengan demikian, mode normal-fase historis dikembangkan pertama dan dinamakan "normal". Kemudian mode pemisahan yang menggunakan teori pemisahan berlawanan dengan fase normal dikembangkan dan diberi nama "terbalik". Mode fase terbalik jauh lebih populer digunakan daripada fase normal saat ini, tetapi kita tidak dapat mengubah latar belakang historis, dan dengan demikian mereka masih disebut mode fase normal dan terbalik.

Kolom Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

HILIC adalah konsep yang relatif baru dalam kromatografi partisi. HILIC dianggap sebagai bagian dari fase normal karena polaritasnya yang tinggi pada permukaan gel. Bahan dasar dapat berupa silika atau polimer dan mereka dapat dimodifikasi dengan berbagai jenis fungsi polar seperti amida, amino, diol, dan siano. Namun dibandingkan dengan mode normal, fasa gerak yang digunakan untuk HILIC sangat mirip dengan fasa gerak fase terbalik seperti campuran air dan asetonitril. Dari sudut pandang praktis, HILIC berada di antara fase terbalik dan pemisahan fase normal. Senyawa hidrofilik yang "terlalu polar" untuk ditahan oleh fase terbalik dapat dianalisis oleh HILIC menggunakan fasa gerak yang mirip dengan kondisi fase terbalik. Karena fitur ini HILIC populer digunakan untuk pemisahan karbohidrat, terutama sakarida yang hidrofilik. Kolom Shodex misalnya membawa kolom amino berbasis polimer, bernama seri Asahipak NH2P. NH₂ menunjukkan "gugus fungsi amino" dan P kembali merupakan polimer. Kolom ini diisi dengan gel berbahan dasar polivinil alkohol, dimodifikasi dengan poliamina. Sedangkan untuk kolom fase terbalik, basis polimer dibandingkan dengan kolom basa silika akan memberikan umur kolom yang lebih lama, daya tahan dalam kondisi alkalin, dan pengulangan yang baik.

BAB 3 Kromatografi Cair – Spektroskopi Massa (LC-MS)

Saat ini spektrometer massa kromatografi cair (LC-MS) semakin banyak digunakan dalam berbagai bidang, seperti farmasi, lingkungan, makanan, dan bahan industri. Pada praktikum ini mahasiswa akan dilatih keterampilannya untuk menguasai teknik LC-MS, khususnya tipe LCMS 8030 dari Shimadzu.



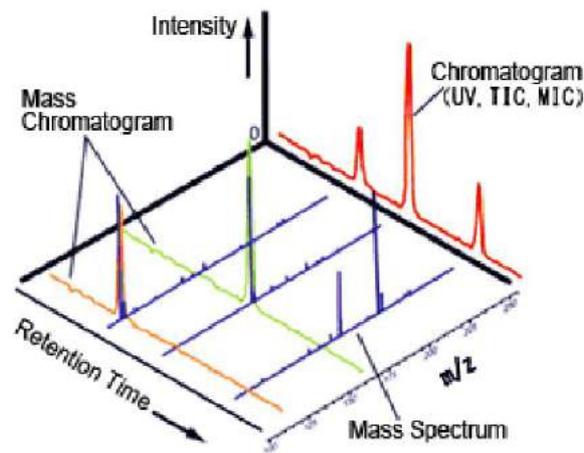
Gambar 14. KCKT yang terkoneksi dengan spektroskopi massa (HPLC-ESI-MS/MS) dengan tipe LCMS 8030 dari Shimadzu yang digunakan mahasiswa dalam praktikum ini.

Secara umum, kromatografi cair (LC) memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan afinitas (atau kekuatan retensi) untuk fasa stasioner atau fasa gerak, kemudian mendeteksi komponen yang terpisah menggunakan UV, fluoresensi, atau konduktivitas listrik berdasarkan sifat-sifatnya. Detektor-detektor tersebut terutama memenuhi syarat zat berdasarkan waktu retensi dan jumlah substansi berdasarkan intensitas puncak dan daerah puncak. Kromatografi menawarkan resolusi yang bagus, tetapi zat yang mengkuantifikasi dan mengkuantifikasi secara akurat dapat menjadi sulit jika beberapa komponen melulusi kurang lebih pada saat yang sama, seperti selama analisis multianalyte simultan.

Sebaliknya, spektrometri massa (MS) menawarkan teknik deteksi yang sangat sensitif yang mengionisasi komponen sampel menggunakan berbagai metode, kemudian memisahkan ion yang dihasilkan dalam ruang hampa berdasarkan rasio massa-ke-muatan dan mengukur intensitas masing-masing ion. Karena spektrum massa yang disediakan oleh MS dapat menunjukkan tingkat konsentrasi ion yang memiliki massa tertentu, itu sangat membantu untuk analisis kualitatif. Itu karena massa adalah informasi khusus untuk molekul tertentu dan MS memungkinkan memperoleh informasi itu secara langsung. Namun, itu hanya berlaku ketika mengukur komponen tunggal. Jika beberapa komponen disuntikkan secara bersamaan, menjadi sangat sulit untuk menganalisis spektrum.

Oleh karena itu, sistem LC-MS menggabungkan resolusi pemisahan kromatografi cair yang luar biasa dengan kemampuan kualitatif spektrometri massa yang luar biasa. Spektrum massa

yang diperoleh dari pengukuran pemindaian ini memberikan informasi massa molekul dan struktural untuk komponen eluted, yang melengkapi informasi kualitatif berdasarkan waktu retensi yang diperoleh dengan menggunakan detektor LC lain (Gambar 15).

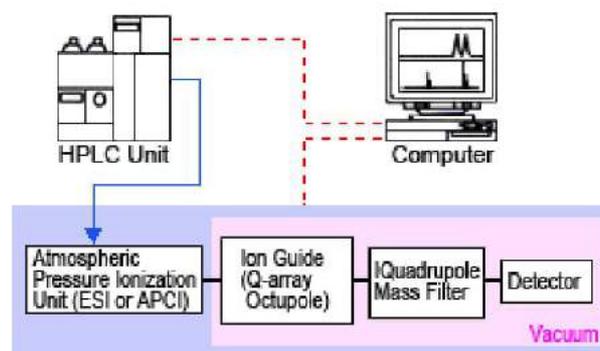


Gambar 15. Ilustrasi data yang dihasilkan berupa kromatogram dan spektrum MS

Selain itu, pengukuran SIM (*selected ion monitoring*, pemantauan ion yang dipilih) mendeteksi substansi berdasarkan massa, yang merupakan parameter yang sangat selektif. Ini memungkinkan analisis kuantitatif yang menghindari efek pengotor bahkan ketika pemisahan dengan LC tidak memadai. Dalam hal memberikan penerapan yang luas untuk berbagai zat dan selektivitas tinggi, spektrometer massa menawarkan karakteristik yang sangat baik sebagai detektor LC.

Komponen-komponen dalam Sistem LC-MS

Sistem spektrometer massa termasuk perangkat untuk memperkenalkan sampel (seperti unit HPLC atau GC), antarmuka untuk menghubungkan perangkat tersebut, sumber ion yang mengionisasi sampel, lensa elektrostatik yang secara efisien memperkenalkan ion yang dihasilkan, unit analisa massa yang memisahkan ion berdasarkan rasio mass-to-charge (m/z) mereka, dan unit detektor yang mendeteksi ion-ion yang terpisah.



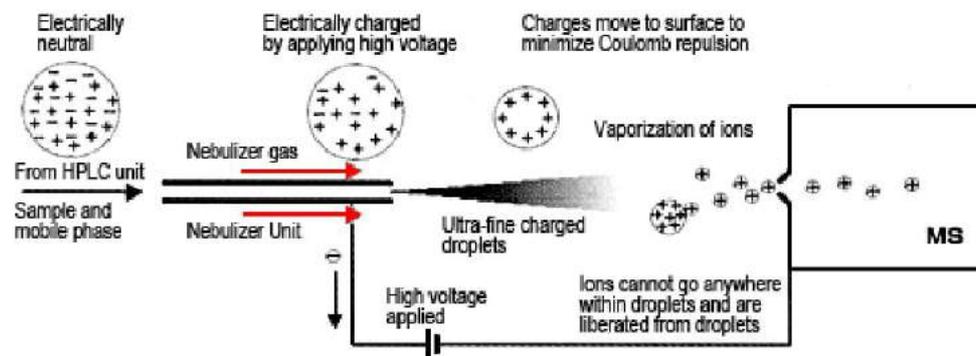
Gambar 16. Skema komponen-komponen dalam sistem LC-MS

Banyak jenis sistem MS tersedia tergantung pada metode yang digunakan untuk memisahkan ion. Contoh ini menunjukkan komponen dari sistem MS quadrupole ionisasi atmosfer khas, yang umum digunakan sebagai detektor LCMS (Gambar 16). Unit ionisasi atmosfer didasarkan pada ionisasi elektro spray (ESI), ionisasi kimia atmosfer (APCI), atau metode ionisasi lainnya, dan berfungsi sebagai sumber ion dan antarmuka dengan sistem HPLC. Ion

yang dihasilkan dalam unit ini dilucuti dari pelarut, kemudian difokuskan ke balok menggunakan octupole atau cara lain, kemudian dikirim ke quadrupole. Baik arus langsung dan frekuensi tinggi arus bolak-balik diterapkan ke quadrupole, sehingga hanya ion dengan target m/z ratio berhasil melewati quadrupole. Jumlah ion yang mencapai detektor diubah menjadi sinyal dan output ke komputer.

Sistem Ionisasi – *Electrospray Ionization (ESI)*

Ketika ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization, API*) muncul belum lama ini, antarmuka yang ditingkatkan memungkinkan memperoleh ion dengan cara yang dapat diandalkan. Seperti namanya, itu mengionisasi sampel di bawah kondisi tekanan atmosfer, yang membuatnya sangat berguna untuk menghilangkan pelarut di luar ruang hampa. Saat ini, ada dua jenis antarmuka API. Salah satunya adalah ionisasi elektropray (ESI), yang paling cocok untuk senyawa ionik dengan polaritas tinggi (Gambar 17).



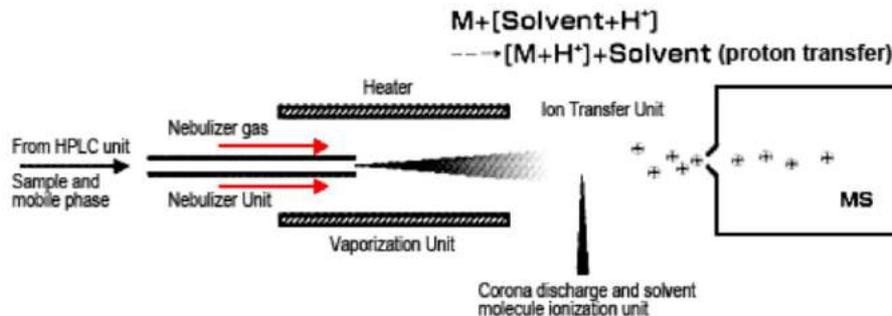
Gambar 17. Sistem evaporasi dalam metode ionisasi elektropray (ESI)

ESI menarik solusi sampel ke ujung tabung kapiler, di mana ia menerapkan tegangan tinggi sekitar 3 hingga 5 kV. Gas nebulizer mengalir dari luar kapiler untuk menyemprotkan sampel. Ini menciptakan kabut halus tetesan bermuatan dengan polaritas yang sama dengan tegangan yang diterapkan. Saat partikel bermuatan ini bergerak, pelarut terus menguap, sehingga meningkatkan medan listrik pada permukaan tetesan. Ketika gaya saling tolak dari muatan melebihi tegangan permukaan cair, maka terjadi fusi. Diperkirakan bahwa karena siklus penguapan dan fusi ini diulang, tetesan akhirnya menjadi cukup kecil sehingga ion sampel dilepaskan ke fase gas (model penguapan ion).

ESI menyediakan metode ionisasi terlembut yang tersedia, yang berarti dapat digunakan untuk senyawa yang sangat polar, paling tidak stabil, atau panas tidak stabil. Karena sebagian besar ion yang dihasilkan adalah molekul terprotonasi (atau molekul deprotonated), ion fragmen yang rumit tidak dihasilkan. Ini membuatnya mudah untuk menentukan massa molekul senyawa. Selain itu, karena menghasilkan ion multivalen, tergantung pada senyawa, bahkan jika suatu senyawa memiliki massa molekul 10.000, misalnya, ion dengan valensi 20 hanya akan memiliki rasio m/z 501 dan ion dengan valensi 10 hanya akan memiliki rasio m/z 1001, yang dapat dideteksi menggunakan spektrometer massa kecil. Juga dimungkinkan untuk menggunakan pemrosesan komputer untuk memprediksi massa molekul dari ion multivalen tersebut. ESI digunakan untuk menganalisis berbagai sampel, seperti bahan alami, makromolekul biologis, dan obat-obatan.

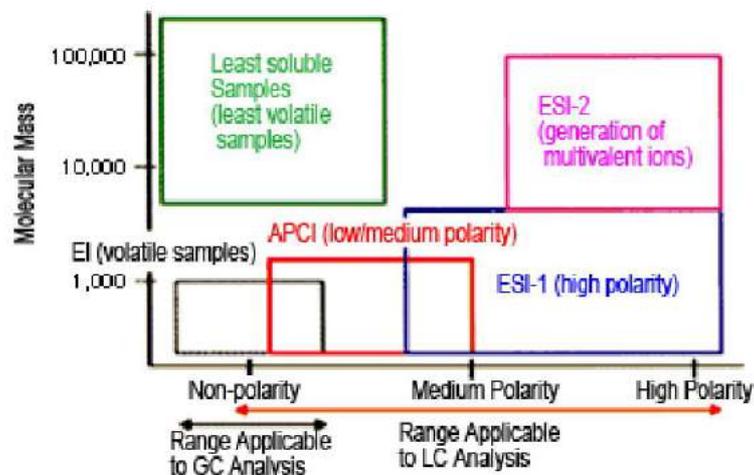
Metode lainnya adalah ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI), yang merupakan jenis ionisasi kimia, seperti CI untuk GC-MS (Gambar 18). Meskipun desain antarmuka mirip dengan ESI, prinsip ionisasi berbeda, membuatnya lebih cocok untuk senyawa polaritas

rendah dan menengah. APCI menguapkan molekul pelarut dan sampel dengan menyemprotkan larutan sampel ke dalam pemanas (dipanaskan sampai sekitar 400 ° C) menggunakan gas, seperti N₂. Molekul pelarut terionisasi oleh pelepasan korona untuk menghasilkan ion reaksi yang stabil.



Gambar 18. Reaksi ion-molekul dari sistem APCI

Proton ditransfer antara ion-ion reaksi dan molekul sampel (reaksi ion-molekul) untuk mengionisasi molekul sampel dengan menambahkan atau mengeluarkan proton. Reaksi ion-molekul ini diketahui melibatkan beberapa pola, seperti reaksi transfer proton dan reaksi adisi elektrofilik. Seperti halnya ESI, molekul terprotonasi (atau molekul deprotonasi) terdeteksi. Akibatnya, ini digunakan untuk menganalisis senyawa yang sangat larut dalam lemak atau senyawa yang tidak terionisasi dalam larutan.

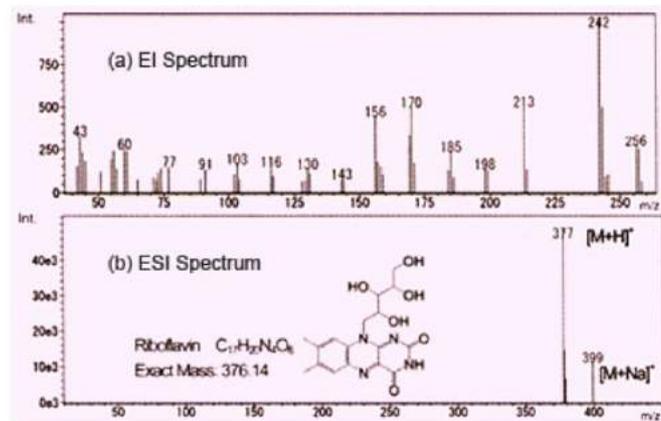


Gambar 19. Skema menunjukkan hubungan antara metode ionisasi dan analit yang berlaku. Karena berbagai senyawa yang sangat besar dapat diukur menggunakan HPLC saja, penggunaan ESI atau APCI secara selektif karena metode ionisasi sekarang memungkinkan pengukuran jangkauan yang lebih luas dari senyawa organik juga.

Spektra Massa

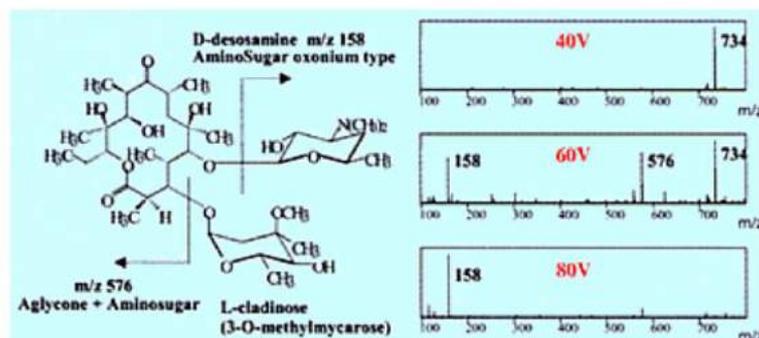
Seperti yang dijelaskan sebelumnya, ESI dan APCI menghasilkan pendeteksian molekul terprotonasi dan juga ion adisi logam atau pelarut. Pada halaman ini, kami membandingkan metode ini dengan ionisasi elektron (EI) yang umum digunakan dalam GC-MS. Gambar 20 menunjukkan spektrum untuk vitamin B2 (riboflavin) yang diperoleh menggunakan EI dan ESI. Ini digambarkan dengan intensitas ion pada sumbu vertikal dan rasio massa-ke-muatan (m/z) pada sumbu horizontal.

EI menggunakan berkas elektron untuk membebaskan satu elektron dari molekul dalam fase gas untuk menciptakan ion molekuler (kation radikal). Ini langsung meledak untuk menghasilkan sekelompok fragmen ion. Informasi struktural dapat diperoleh dengan mempertimbangkan pola dari fragmen ion ini. Namun, dalam banyak kasus, tidak ada peaks ion molekuler yang terdeteksi. Dalam kasus Gambar 1a, tidak ada ion molekuler yang terdeteksi, tetapi lebih tepatnya, hanya fragmen ion yang terdeteksi. Memperoleh informasi massa molekul sulit menggunakan EI, yang membutuhkan menggunakan metode analitik komplementer seperti ionisasi kimia (CI).



Gambar 20. Spektra massa dari vitamin B2

Sebaliknya, menggunakan ESI, yang merupakan metode ionisasi lembut, memberikan spektrum sederhana dengan molekul terprotonasi yang terdeteksi pada m/z 377 dan ion natrium adisi yang terdeteksi pada m/z 399, dan hampir tidak ada fragmen ion. Dengan cara ini, informasi massa molekul, yang penting untuk memprediksi struktur senyawa yang tidak diketahui, dapat diperoleh dengan mudah menggunakan API. (Dalam contoh ini, karena vitamin B2 memiliki kelompok fungsional dasar, maka mode ion positif digunakan.) Namun, karena penggunaan API cenderung tidak menghasilkan fragmen ion, tampaknya sulit untuk mendapatkan informasi struktural dari kelompok fungsional dan lainnya dengan menganalisis ion fragmen.



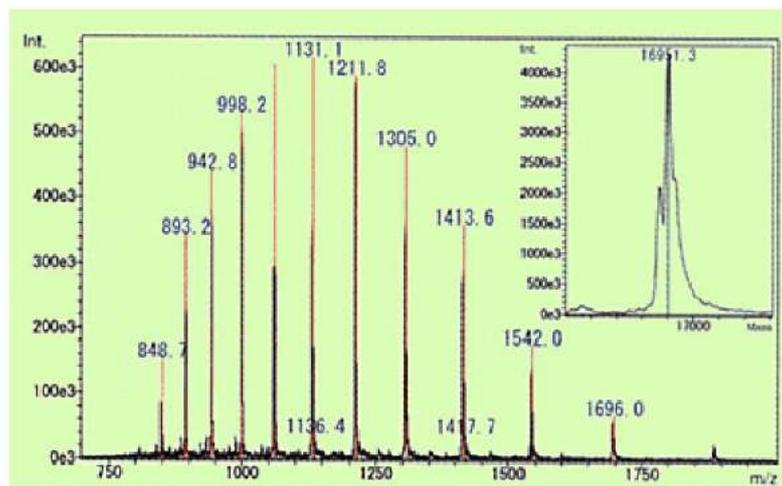
Gambar 21. Spektrum disosiasi tabrakan terinduksi dari senyawa eritromisin

Namun demikian, informasi struktural dapat diperoleh dengan menggunakan API jika menggunakan metode yang disebut disosiasi tubrukan-induksi (CID) untuk membuat fragmen ion, kemudian mengukur ion fragmen tersebut. CID dapat terjadi di area lensa elektrostatik (Gambar 21) atau menggunakan spektrometer massa jenis tandem yang dilengkapi dengan ruang tubrukan, yang dijelaskan di bawah ini. Gambar 21 menunjukkan contoh menghasilkan ion fragmen dari antibiotik eritromisin dengan meningkatkan tegangan

yang diterapkan pada lensa elektrostatis. Ion-ion ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi komponen minor yang muncul di kromatogram (lihat Shimadzu Application News, LCMS No. C21)

Perhitungan Ion Multivalen

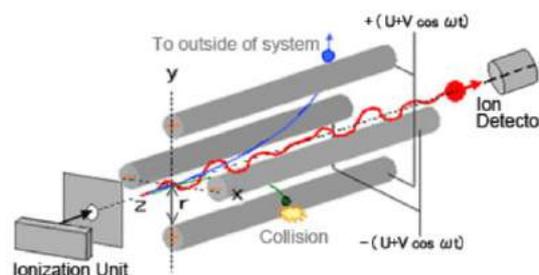
Dari metode API, penggunaan ESI secara khusus, diketahui kadang-kadang menghasilkan ion molekul dengan muatan ganda untuk senyawa yang memiliki beberapa titik ionisasi potensial. (Dalam kasus kation, ini berarti banyak proton ditambahkan $[M + nH]^{n+}$) Tingkat protonasi sangat dipengaruhi oleh tingkat pKa senyawa atau tingkat pH larutan. Ketika jenis ion multivalen ini diamati, informasi massa molekul dapat diperoleh bahkan untuk senyawa dengan massa molekul yang melebihi rentang pengukuran spektrometer massa. Oleh karena itu, ini digunakan untuk mengukur makromolekul biologis yang sangat besar dan sangat polar, seperti protein dan asam nukleat. Gambar 22 menunjukkan spektrum ESI dari myoglobin kuda sebagai contoh protein. Dalam hal ini, ion dengan valensi dari 9 hingga 20 terdeteksi dan massa molekul dihitung dengan dekonvolusi menjadi 16951.3. Dibandingkan dengan massa molekul teoritis, 16951,5, dihitung dari komposisi asam amino, kesalahan itu kurang dari 0,002%, yang menunjukkan bahwa nilai yang sangat akurat diperoleh. Ini adalah perbedaan besar dari GC-MS, yang biasanya hanya menyediakan puncak untuk $z = 1$.



Gambar 22. Massa molekul myoglobin otot jantung kuda dihitung menggunakan spektrum ESI dan dekonvolusinya

Quadrupole MS

Seperti namanya, sistem quadrupole MS mengandung empat batang logam silinder silindris (elektroda dengan permukaan interior hiperboloidal) di dalam ruang vakum, diposisikan berjarak sama dari sumbu tengah (Gambar 23)



Gambar 23. Diagram quadrupole MS

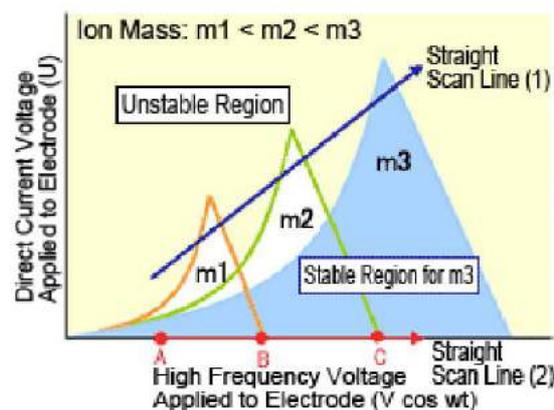
Ion yang dihasilkan dalam unit ionisasi dipercepat dalam arah-Z oleh tegangan yang relatif lemah hanya beberapa lusin volt. Ion-ion ini melewati lubang kecil dan memasuki area quadropole. Tegangan polaritas yang sama diterapkan ke kutub yang berlawanan secara diagonal dan polaritas tegangan berlawanan diterapkan ke kutub yang berdekatan. Ketika kombinasi tegangan arus searah U dan frekuensi tinggi tegangan arus bolak-balik $V \cos \omega t$ diterapkan ke setiap kutub (di mana, ω adalah frekuensi dan t adalah waktu), medan listrik dengan fase yang berubah dengan cepat dihasilkan dalam quadropole.

Akibatnya, ion yang melewati medan listrik ini beresilasi dalam arah X dan Y. Ketika satu set kondisi tertentu (untuk U , V , dan ω) diterapkan, **ion tertentu dalam rasio massa-muatan tertentu (m/z) mempertahankan osilasi stabil dan melewati quadropole untuk mencapai detektor**. Sebaliknya, osilasi ion dengan nilai m/z lainnya menjadi tidak stabil, menyebabkan mereka bertabrakan dengan kutub, terbang keluar dari sistem, atau tidak terdeteksi.

Osilasi ion dalam quadropole diketahui terjadi sesuai dengan persamaan yang disebut persamaan Mathieu. Terlepas dari kecepatan awal atau posisi awal ion, gerakan ion memenuhi persamaan:

$$m/z = K \frac{V}{r^2 \omega^2}$$

Diagram sederhana menggambarkan bagaimana persamaan diselesaikan (Gambar 24). Kondisi yang diperlukan untuk osilasi ion stabil ditentukan oleh massa m dan frekuensi osilasi ω dari ion. Ini diilustrasikan sebagai area yang tertutup oleh garis pada Gambar 24. Wilayah stabilitas berbeda untuk ion dengan massa m_1 , m_2 , dan m_3 . Akibatnya, jika tegangan divariasikan sambil menjaga rasio antara tegangan arus searah dan frekuensi tinggi tegangan arus bolak-balik (garis pemindaian lurus (1)), sehingga garis (1) melewati masing-masing daerah stabilitas untuk m_1 , m_2 , dan m_3 , ion dengan massa m_1 , m_2 , dan m_3 dapat dilewatkan melalui quadropole secara berurutan. Dengan cara ini, spektrum massa dapat diperoleh untuk ion dengan massa mulai dari kecil hingga besar.



Gambar 24. Wilayah Stabil untuk Ion di Sistem Quadropole MS (diagram Mathieu)

Karakteristik Quadropole MS

Karena sistem quadropole MS kompak dan sederhana, mereka lebih mudah dioperasikan dan lebih mudah dirawat dan relatif lebih murah. Akibatnya, mereka telah banyak diadopsi sebagai instrumen tujuan umum. Spektrometer massa membutuhkan tingkat vakum yang

tinggi, sedangkan sistem MS quadropole mampu memisahkan ion pada tingkat vakum yang lebih rendah (10^{-2} hingga 10^{-3} Pa) daripada metode pemisahan massa lainnya. Oleh karena itu, bahkan jika mereka dihubungkan dengan unit GC atau LC, penurunan tingkat vakum yang disebabkan oleh antarmuka memiliki efek minimal pada kinerja pemisahan massa, membuatnya paling cocok untuk berinteraksi dengan kromatografi.

Selanjutnya, dengan kecepatan pemindaian maksimum sekitar 6000 amu/detik, ia mampu mengukur pada kecepatan pemindaian yang lebih tinggi daripada sistem MS sektor magnetik, dan rentang pengukuran massanya hingga sekitar 2000 m/z memungkinkan analisis kualitatif dalam rentang praktis dari massa molekul. Selain itu, ia memungkinkan switching berkecepatan tinggi, yang memungkinkan pemantauan simultan beberapa ion terpilih (SIM) untuk analisis kuantitatif simultan-sensitivitas tinggi dari beberapa komponen. Dengan cara ini, sistem MS quadropole dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, menjadikannya sistem standar *de-facto* di antara spektrometer massa.

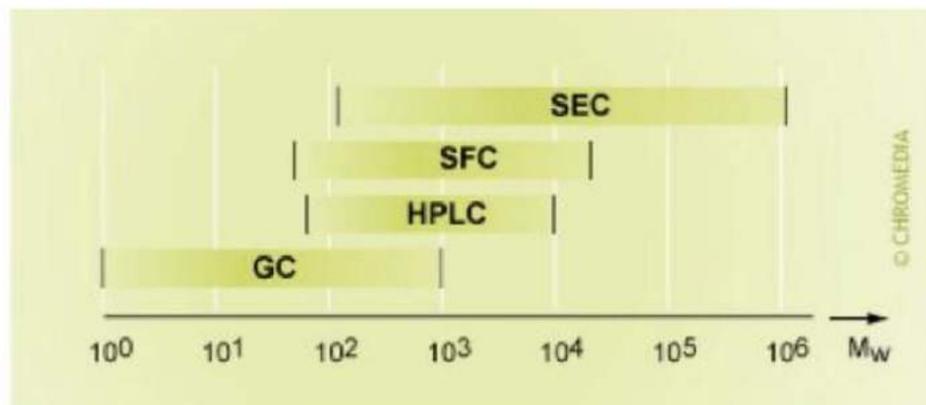
BAB 4 Kromatografi Gas

Pengantar

Kromatografi gas, khususnya kromatografi gas-cair, melibatkan sampel yang diuapkan dan disuntikkan ke kepala kolom kromatografi. Sampel kemudian diangkut melalui kolom oleh aliran inert, fase gerak gas. Kolom itu sendiri mengandung fase diam cair yang teradsorpsi ke permukaan padatan inert. Parameter yang perlu diperhatikan dalam analisa kromatografi gas antara lain:

1. Sampel diuapkan dan disuntikkan ke kepala kolom kromatografi. Jadi senyawa analit harus mudah menguap atau dapat dibuat mudah menguap oleh derivatisasi, stabil secara termal dan berat molekul rendah (<800 amu)
2. Elusi disebabkan oleh aliran fase bergerak gas inert.
3. Fase gerak tidak berinteraksi dengan molekul analit; satu-satunya fungsi adalah untuk mengangkut analit melalui kolom.

Pemisahan senyawa didasarkan pada kekuatan interaksi yang berbeda dari senyawa dengan fase diam yaitu prinsip *like dissolve like*. Semakin kuat interaksi, semakin lama senyawa berinteraksi dengan fase diam, dan semakin banyak waktu yang diperlukan untuk bermigrasi melalui kolom (= waktu retensi lebih lama). Dalam contoh di atas, senyawa X berinteraksi lebih kuat dengan fase diam, dan karena itu kekurangan senyawa O dalam gerakannya melalui kolom. Akibatnya, senyawa O memiliki waktu retensi yang jauh lebih pendek daripada senyawa X.



Gambar 25. Pemilihan pengukuran dengan kromatografi gas didasarkan pada berat molekul analit.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemisahan senyawa dalam kromatografi gas, antara lain:

1. Tekanan
2. Polaritas senyawa analit dan polaritas fase diam dalam kolom
3. Panjang kolom
4. Ketebalan fase diam dalam kolom
5. Internal diameter kolom
6. Temperatur kolom
7. Kecepatan gas alir
8. Jumlah sampel yang diinjeksi

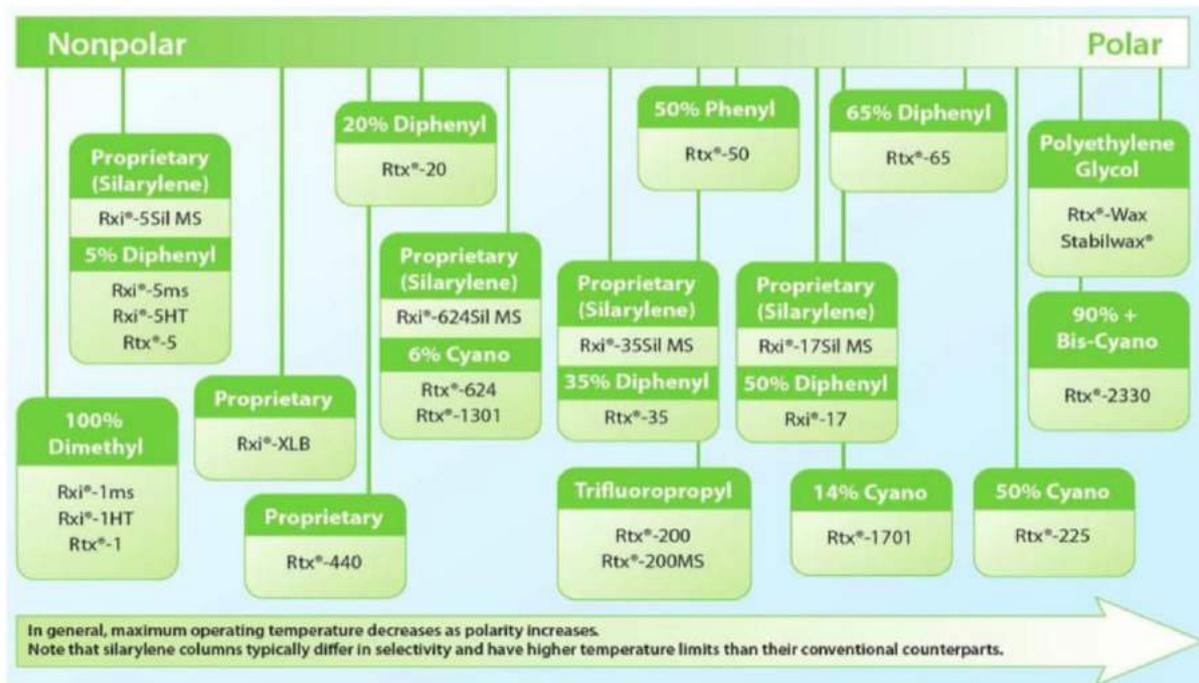
Tekanan

Titik didih senyawa sering terkait dengan polaritasnya. Semakin rendah titik didihnya, semakin tinggi tekanan uap dari senyawa dan waktu retensi yang lebih pendek biasanya

karena senyawa akan menghabiskan lebih banyak waktu dalam fase gas. Itulah salah satu alasan utama mengapa pelarut mendidih rendah (yaitu, dietil eter, diklorometana) digunakan sebagai pelarut untuk melarutkan sampel. Suhu kolom tidak harus di atas titik didih karena setiap senyawa memiliki tekanan uap non-nol pada suhu tertentu, bahkan padatan. Itulah alasan mengapa kita dapat mencium senyawa seperti kamper ($0,065 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$), isoborneol ($0,0035 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$), naftalena ($0,084 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$), dll. Namun, tekanan uap mereka rendah dibandingkan dengan cairan (yaitu air ($24 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$), etil asetat ($95 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$), dietil eter ($520 \text{ mmHg} / 25 \text{ }^\circ\text{C}$)).

Polaritas Senyawa Analit vs. Polaritas Fase Diam dalam Kolom

Jika polaritas fase diam dan senyawa sama, waktu retensi meningkat karena senyawa tersebut berinteraksi lebih kuat dengan fase diam. Akibatnya, senyawa polar memiliki waktu retensi yang lama pada fase stasioner polar dan waktu retensi yang lebih pendek pada kolom non-polar menggunakan suhu yang sama. Fase diam kiral yang didasarkan pada turunan asam amino, siklodekstrin dan silane kiral mampu memisahkan enantiomer karena satu enansiomer berinteraksi sedikit lebih kuat daripada yang lain dengan fase diam, sering karena efek sterik atau interaksi yang sangat spesifik lainnya. Misalnya, kolom termodifikasi-siklodekstrin digunakan dalam penentuan kelebihan enansiomer dalam percobaan epoksidasi kiral.



Gambar 26. Tipe-tipe kolom dengan fase diamnya yang cocok dalam pemisahan senyawa dari polar hingga non-polar.

Panjang Kolom

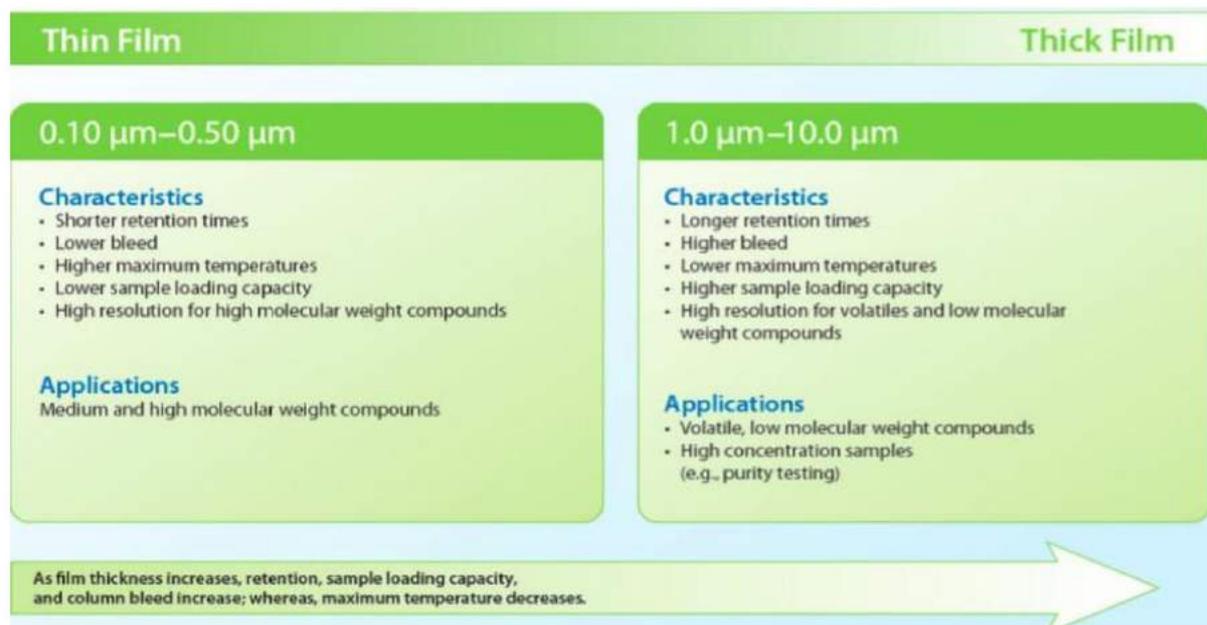
Kolom yang lebih panjang umumnya meningkatkan pemisahan. Perlu dipertimbangkan adalah bahwa waktu retensi meningkat secara proporsional dengan panjang kolom dan pelebaran puncak yang signifikan akan diamati juga karena peningkatan difusi longitudinal di dalam kolom. Kita harus ingat bahwa molekul-molekul gas tidak hanya bergerak dalam satu arah tetapi juga ke samping dan ke belakang. Perluasan ini berbanding terbalik dengan laju aliran. Pelebaran juga diamati karena tingkat transfer massa yang terbatas antara fase dan karena molekul mengambil jalur yang berbeda melalui kolom.



Gambar 27. Diagram perbandingan panjang kolom dimana dapat meningkatkan resolusi tapi juga meningkatkan biaya dan waktu analisis.

Ketebalan Fase Diam dalam Kolom

Ketebalan fasa diam (μm) secara langsung mempengaruhi retensi, resolusi, suhu elusi untuk tiap komponen sampel.



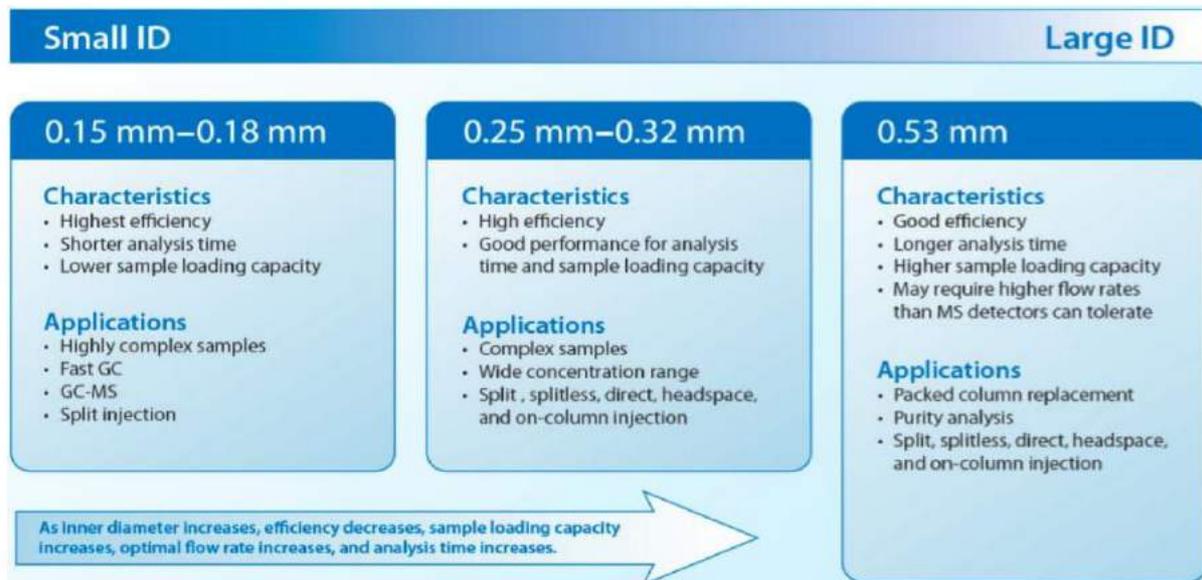
Gambar 28. Korelasi ketebalan fase diam dan pemisahan

Internal Diameter Kolom

Ada dua tipe umum kolom, dikemas dan kapiler (juga dikenal sebagai tubular terbuka). Kolom yang dikemas mengandung bahan pendukung padat yang terbagi, lembam, dan padat (umumnya berdasarkan diatomaceous earth) yang dilapisi dengan fase diam cair. Kolom yang paling banyak dikemas adalah 1,5 - 10m panjangnya dan memiliki diameter internal 2 - 4mm.

Kolom kapiler memiliki diameter internal beberapa sepersepuluh milimeter. Mereka bisa menjadi salah satu dari dua jenis; wall-coated open tubular (WCOT) atau tubular terbuka dukungan-berlapis (SCOT). Dinding berlapis kolom terdiri dari tabung kapiler yang dindingnya dilapisi dengan fase diam cair. Dalam kolom berlapis suplai, dinding bagian

dalam kapiler dipagari dengan lapisan tipis dari bahan pendukung seperti tanah diatom, ke mana fase diam telah teradsorpsi. Kolom SCOT umumnya kurang efisien daripada kolom WCOT. Kedua jenis kolom kapiler lebih efisien daripada kolom yang dikemas.



Gambar 29. Korelasi ketebalan Internal Diameter dari kolom terhadap pemisahan

Temperatur Kolom

Suhu kolom yang terlalu tinggi menghasilkan waktu retensi yang sangat singkat tetapi juga dalam pemisahan yang sangat buruk karena semua komponen terutama berada dalam fase gas. Namun, agar pemisahan terjadi komponen harus dapat berinteraksi dengan fase diam. Jika senyawa tidak berinteraksi dengan fase diam, waktu retensi akan berkurang. Pada saat yang sama, kualitas pemisahan memburuk, karena perbedaan waktu retensi tidak lagi diucapkan. Perpisahan terbaik biasanya diamati untuk gradien suhu, karena perbedaan dalam polaritas dan titik didih digunakan di sini.

Kecepatan Gas Alir

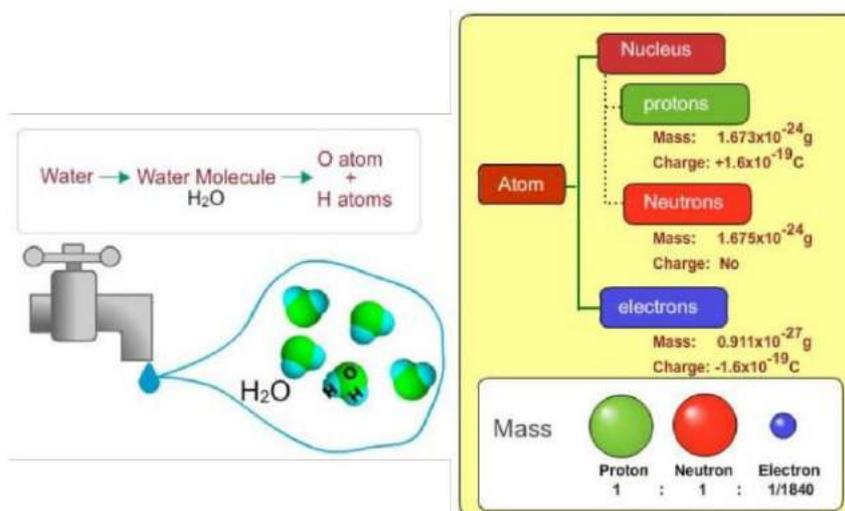
Tingkat aliran yang tinggi mengurangi waktu retensi, tetapi pemisahan yang buruk juga akan diamati. Seperti di atas, komponen memiliki sedikit waktu untuk berinteraksi dengan fase diam dan hanya didorong melalui kolom.

Jumlah Sampel

Idealnya, puncak dalam kromatogram menampilkan bentuk simetris (kurva Gaussian). Jika terlalu banyak sampel yang disuntikkan, puncak menunjukkan tailing yang signifikan, yang menyebabkan pemisahan yang lebih buruk. Kebanyakan detektor relatif sensitif dan tidak membutuhkan banyak material untuk menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi. Secara tegas, dalam kondisi standar hanya 1-2% dari senyawa yang disuntikkan ke dalam port injeksi melewati kolom karena sebagian besar instrumen GC dioperasikan dalam mode split untuk mencegah overloading kolom dan detektor. Mode splitless hanya akan digunakan jika sampel sangat rendah dalam konsentrasi dalam hal analit.

BAB 5 Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa (GC-MS)

Material terdiri dari banyak molekul, yang merupakan zat terkecil yang diketahui untuk menentukan fitur kimia dari bahan. Molekul selanjutnya diuraikan menjadi atom atau elemen. Saat ini, sekitar 110 jenis elemen diketahui ada di alam. Sebagai contoh, molekul air H₂O terdiri dari dua atom hidrogen (H) dan satu atom oksigen (O).



Gambar 30. Ilustrasi molekul dalam setetes air dan komponen penyusun atom-atomnya.

Inti atom disebut nukleus, terdiri dari proton dan neutron, yang ada dalam jumlah yang sama di sekitar nukleus. Proton dan neutron memiliki massa yang hampir sama; sementara itu, massa elektron adalah sekitar 1/1840 dari massa proton. Oleh karena itu, massa atom dan massa molekul kira-kira ditentukan oleh jumlah total proton dan neutron.

Massa atom sebagian besar dianggap berasal dari nukleus, yang terdiri dari proton dan neutron. Jumlah total proton dan neutron disebut nomor massa. Oleh karena itu, jumlah massa juga mendekati massa atom atau molekul. Sementara itu, jumlah proton disebut nomor atom, yang mencirikan fitur kimia dari elemen. Sedangkan isotop adalah kelompok yang unsur-unsurnya termasuk unsur kimia yang sama tetapi memiliki bilangan massa yang berbeda. Karbon memiliki dua isotop: ¹²C dan ¹³C. Keduanya menunjukkan fitur kimia yang sama karena nomor atom yang sama. Tetapi massa ¹³C lebih besar dari ¹²C, karena ¹³C memiliki satu neutron lagi.

Ada dua isotop karbon stabil di dunia alami: ¹²C dan ¹³C. Rasio kelimpahan ¹³C adalah sekitar 1% dari ¹²C. Menurut hasil eksperimen, kelimpahan relatif dari isotop alami adalah konstan di bumi. Rasio isotop disebut kelimpahan isotop. Untuk atom karbon, substansi yang paling melimpah adalah ¹²C, dan atom ¹³C diamati pada tingkat ¹²C.

Gambar 31 dibawah menunjukkan tabel kelimpahan relatif dari beberapa isotop penting dalam analisis GC/MS. H dan C tidak memiliki isotop A + 2. Perhatikan bahwa Cl dan Br tidak memiliki isotop A + 1, tetapi kelimpahan relatif A + 2 relatif besar. Ketika HCl dianalisis, dua puncak molekuler yang sesuai dengan m / z 36 dan 38 diamati dengan rasio kekuatan 3 hingga 1 dalam spektrum massa. F, P dan saya tidak memiliki isotop. Kelimpahan relatif mudah tercermin dalam spektrum massa dan, oleh karena itu, kadang-kadang kita dapat menentukan berapa banyak elemen yang hadir dari pola spektrum.

■ Isotopic Abundance Table

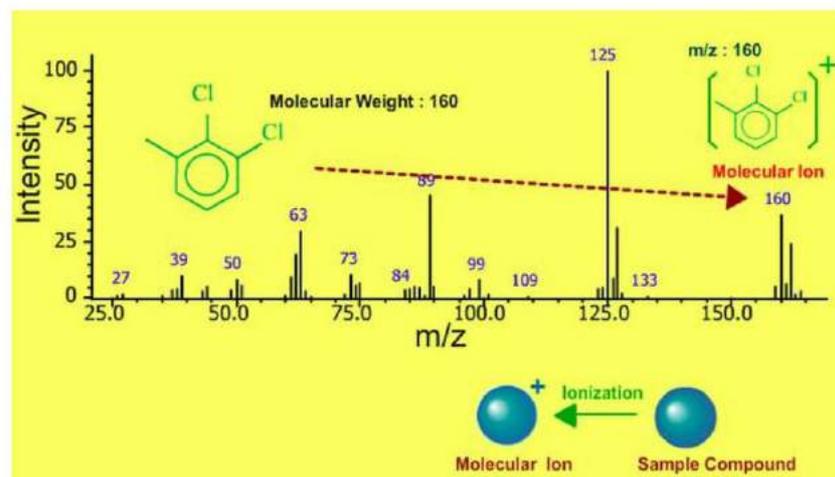
Element (A)		Element (A+1)		Element (A+2)	
¹ H	100 %	² H	0.012 %	-	-
¹² C	100 %	¹³ C	1.08 %	-	-
¹⁴ N	100 %	¹⁵ N	0.37 %	-	-
¹⁶ O	100 %	¹⁷ O	0.04 %	¹⁸ O	0.2 %
²⁸ Si	100 %	²⁹ Si	5.1 %	³⁰ Si	3.3 %
³² S	100 %	³³ S	0.8 %	³⁴ S	4.5 %
³⁵ Cl	100 %	-	-	³⁷ Cl	32.0 %
⁷⁹ Br	100 %	-	-	⁸¹ Br	97.3 %
¹⁹ F	100 %	-	-	-	-
³¹ P	100 %	-	-	-	-
¹²⁷ I	100 %	-	-	-	-

Based on *Isotopic Compositions of the Elements 1997* by IUPAC

Tabel 2. Tabel berdasarkan IUPAC terkait kelimpahan relatif beberapa isotop penting.

Tipe-tipe Ion

Berbagai jenis ion diproduksi ketika molekul terionisasi dalam kotak ionisasi. Spektrum Massa adalah representasi grafis dari distribusi massa ion. Dari spektrum massa, kita dapat memperoleh informasi tentang berat molekul dan struktur molekul, dan mengidentifikasi sampel yang tidak diketahui. Gambar 31 ini menggambarkan beberapa jenis ion penting yang muncul dalam spektrum, dengan mengutip contoh spektrum 2,3-Dichlorotoluene. Sumbu horizontal menunjukkan m/z , di mana m adalah massa ion dalam satuan u dan z adalah jumlah muatan ion. Secara umum, metode ionisasi yang digunakan oleh GC / MS menghasilkan ion bermuatan tunggal, yaitu $z = 1$; oleh karena itu, m/z dapat dianggap sebagai massa ion.



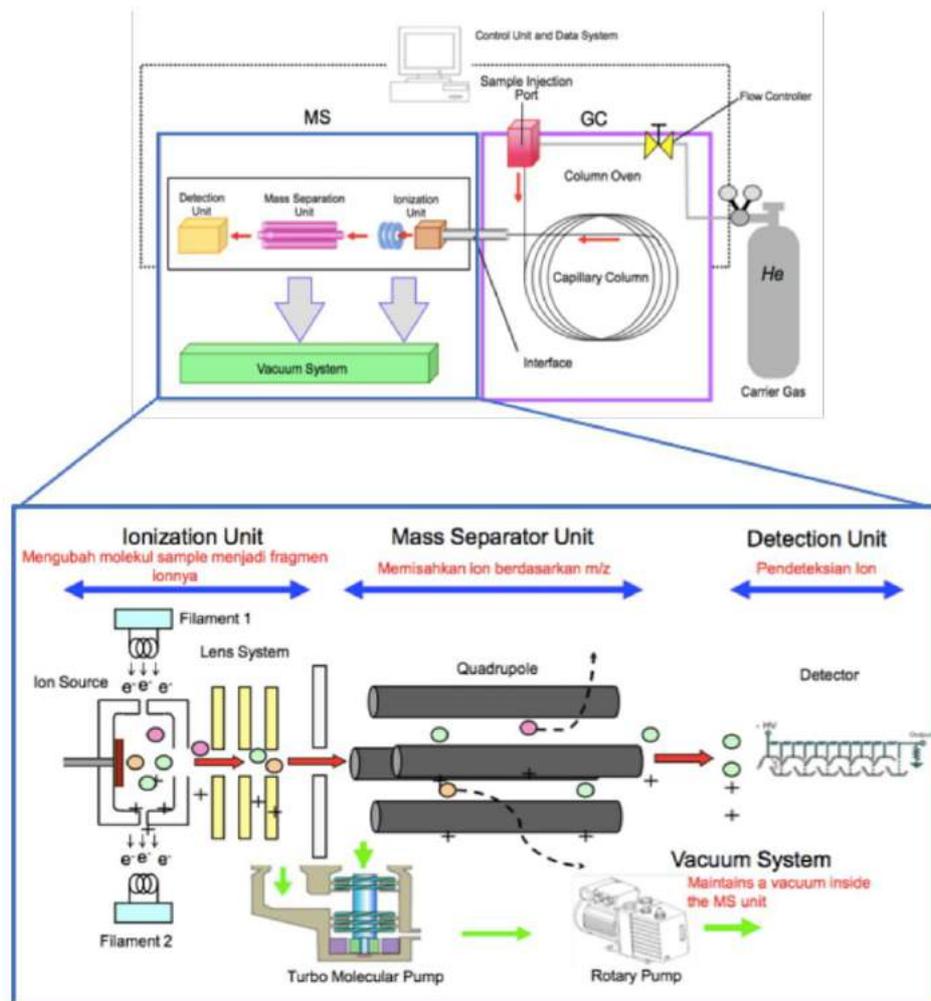
Gambar 31. Beberapa jenis ion penting yang muncul dari spektrum massa 2,3-Diklorotoluen

Bila dilihat dari Gambar 31 tersebut, sumbu vertikal menunjukkan intensitas kelimpahan relatif ion. Puncak paling intensif dalam spektrum disebut "Base Peak", yang intensitasnya diambil sebagai 100 persen. Ion ini ada paling banyak di sumber ion dan mewakili ion paling stabil, yang berguna untuk mengidentifikasi senyawa. Dalam spektrum massa, intensitas

relatif setiap ion biasanya ditemukan menggunakan puncak dengan intensitas tertinggi sebagai puncak "standar" atau "dasar".

Emisi elektron dari senyawa netral listrik menyebabkan produksi ion molekuler. Ion ini memberikan informasi tentang berat molekul, karena massa elektron sangat kecil dibandingkan dengan massa molekul yang massa ion molekuler dianggap sebagai massa molekul. Fragmen ion diproduksi oleh dekomposisi ion molekuler (fragmentasi) di sumber ion. Ada banyak jenis fragmen ion, yang distribusinya mencerminkan struktur kimia suatu senyawa, menurut berbagai cara fragmentasi. Ion fragmen memiliki massa lebih kecil dari ion molekuler. Banyak elemen memiliki isotop alami. Misalnya, Klor dengan massa nomor 37 ada di samping Klorin 35. Keberadaan isotop dengan mudah menghasilkan ion isotop dalam spektrum disertai dengan puncak ion molekuler utama dan puncak fragmen. Selain itu, kita kadang-kadang mengamati puncak latar belakang, yang timbul dari bahan kimia selain sampel; misalnya, air, udara, eluting bahan dari kolom dan sebagainya.

Konfigurasi GC-MS



Gambar 32. Diagram konfigurasi sistem GC-MS

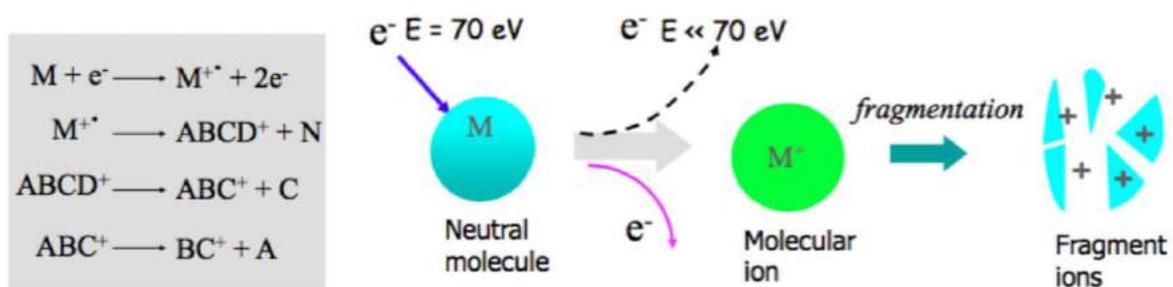
Konfigurasi sistem GC-MS secara umum dapat dilihat di gambar 32. Secara berurutan sampel yang diinjeksikan masuk dalam sistem inlet akan dibawa oleh gas dan masuk dalam fase diam pada kolom untuk mengalami proses pemisahan. Senyawa-senyawa yang telah

terpisah tersebut masuk dalam unit ionisasi untuk mengubah molekul sampel menjadi fragmen ionnya dan mengirim ion ke *mass analyzer* atau *mass separation unit* yang akan memisahkan ion-ion berdasarkan m/z -nya. Setelah itu ion akan diproyeksikan menuju detektor untuk mendeteksi ion-ion yang telah terpisahkan. Proses dalam spektrometri massa ini dalam kondisi vakum.

Metode Ionisasi

Electron Ionization (EI)

EI (Ionisasi Elektron), PCI (Ionisasi Kimia Positif) dan NCI (Ionisasi Kimia Negatif) adalah mode ionisasi utama yang umumnya digunakan dalam analisis GCMS. Penting untuk memahami fitur dari masing-masing metode ionisasi untuk memilih yang paling sesuai.

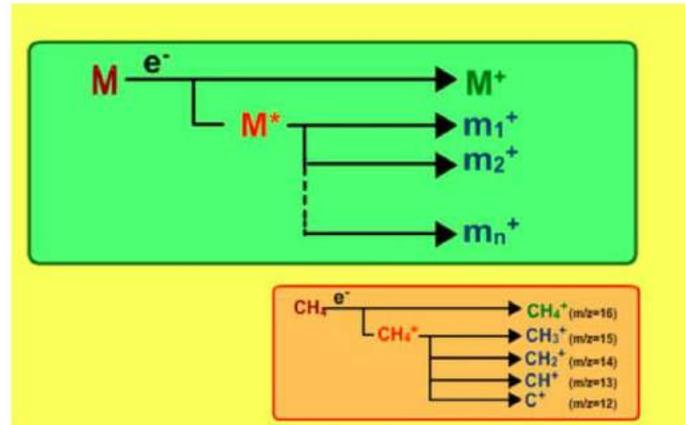


Gambar 33. Ilustrasi kerja ionisasi dengan metode EI

EI, ionisasi elektron atau dampak elektron, adalah metode ionisasi yang paling umum dan merupakan alat yang kuat untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. EI memiliki ciri khas antara lain:

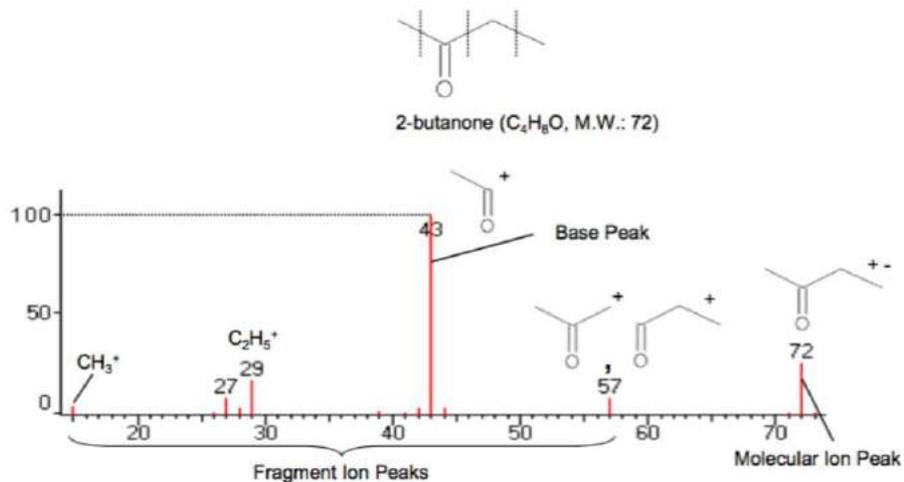
1. EI adalah mode ionisasi yang paling banyak digunakan dalam analisis GC / MS. Hampir semua instrumen GCMS komersial melengkapi mode ini sebagai ionisasi standar.
2. EI menyebabkan banyak fragmentasi dari sebuah molekul yang pola spektralnya berguna untuk mengidentifikasi senyawa sampel.
3. Pencarian perpustakaan tersedia. Spektrum massa EI yang diperoleh dengan pengeboman elektron 70eV dapat digunakan untuk identifikasi dengan membandingkan dengan spektrum yang terdaftar di perpustakaan spektral massa.
4. Jenis sumber ion terbuka digunakan. Tekanan vakum di dalam sumber, terutama ditentukan oleh gas pembawa, sekitar kurang dari 10^{-2} Pa .

Dalam ionisasi elektron, elektron dari filamen terkadang melumpuhkan elektron molekul dan mengionisasi senyawa yang sama tanpa putus. Ion yang dihasilkan memiliki massa yang sama dengan senyawa asli kecuali untuk massa elektron yang sangat kecil. Kami menyebutnya ion "ion molekuler". Ion ini sangat penting untuk menentukan berat molekul.



Gambar 34. Ilustrasi ionisasi dalam metode EI serta ion-ion yang dihasilkan

70eV-elektron, biasanya digunakan dalam EI, memiliki energi yang cukup untuk memecah senyawa. Kami menyebutnya dekomposisi molekul "fragmentasi". Secara umum, ion molekuler M^{+*} dalam keadaan getaran pertama kali diproduksi, maka ion fragmen m^+ dihasilkan dari ion molekuler yang tidak stabil ini karena kelebihan energi dalam M^{+*} . Ikatan kimia biasanya pecah pada ikatan lemah. Analisis spektrum fragmen memberi kita informasi tentang struktur kimia suatu senyawa.



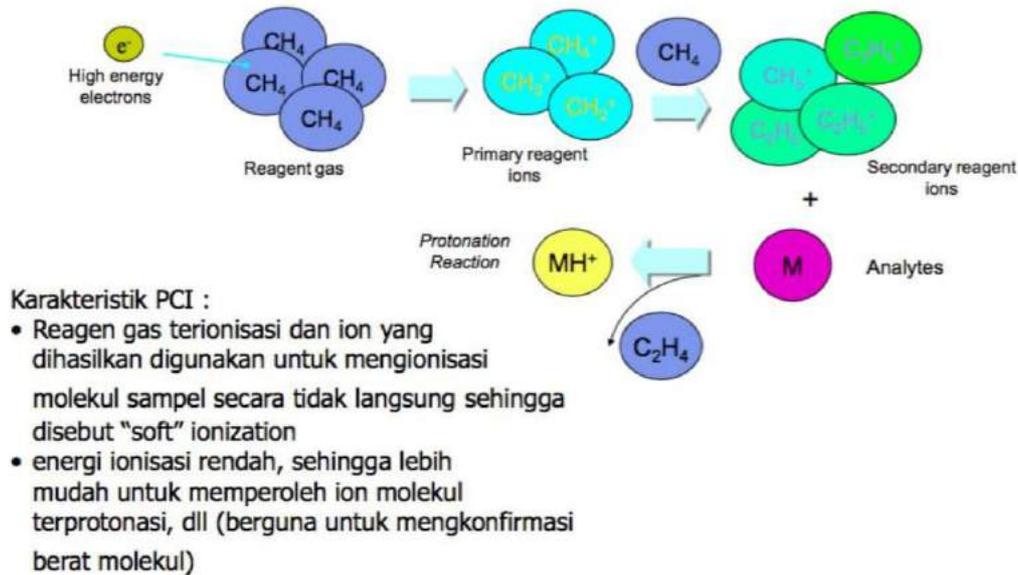
Gambar 35. Spektrum massa 2-butanone dengan ionisasi metode EI.

Dikatakan bahwa baik ion molekul stabil M^+ atau ion molekuler M^{+*} yang tidak stabil dihasilkan oleh dampak elektron, hasilnya tergantung pada senyawa. Misalnya, hidrokarbon rantai lurus dengan banyak karbon jarang menunjukkan puncak molekul, terutama untuk senyawa yang memiliki banyak karbon, karena ion molekuler yang tidak stabil M^{+*} mudah terurai menjadi ion fragmen. Untuk metana, ion molekuler adalah CH_4^+ . Jika hidrogen dihilangkan, ion fragmen CH_3^+ terbentuk. Probabilitas formasi dari masing-masing ion adalah konstan, sehingga kita bisa mendapatkan spektrum yang dapat direproduksi selama kondisi analitiknya sama.

Positif Chemical Ionization (PCI)

EI (Ionisasi Elektron), PCI (Ionisasi Kimia Positif) dan NCI (Ionisasi Kimia Negatif) umumnya digunakan dalam analisis GCMS. Penting untuk memahami fitur dari masing-masing metode ionisasi untuk memilih yang paling sesuai. PCI adalah metode ionisasi lembut,

yang menghasilkan lebih sedikit fragmen ion, dan merupakan cara yang efektif untuk menentukan berat molekul.



Gambar 36. Prinsip ionisasi dengan metode PCI dan karakteristiknya.

Metode umum ini memperoleh ion dari molekul sampel. Elektron dari filamen dipercepat menjadi 70eV dan diarahkan ke ruang ionisasi, di mana mereka berdampan dengan molekul sampel yang ada. Karena ini adalah metode ionisasi "keras", molekul dibelah dan fragmen diproduksi. Informasi struktural dapat diperoleh dari fragmen, dan basis data spektrum memungkinkan pencarian perpustakaan. Ini adalah metode yang sangat dapat direproduksi dan dapat diandalkan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

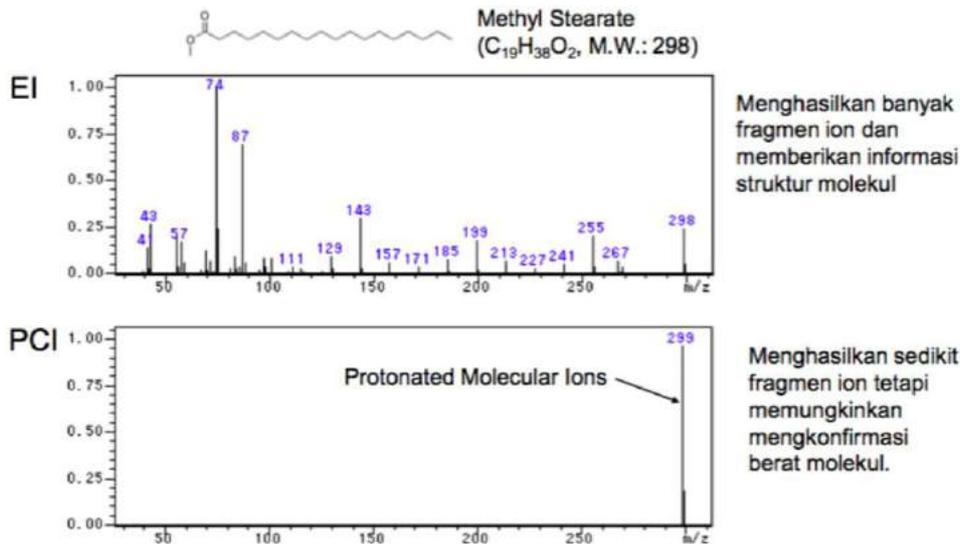
PCI adalah ionisasi tidak langsung melalui reaksi molekuler antara senyawa sampel dari GC dan ion reaktan yang dihasilkan oleh ionisasi gas reagen. PCI memiliki beberapa fitur berikut:

1. PCI adalah metode ionisasi lembut yang mengurangi fragmentasi
2. Spektrum PCI menunjukkan puncak terkait molekul yang intens seperti molekul terprotonasi dan ion adisi. Puncak ini berguna untuk menentukan berat molekul senyawa
3. Gas reagen digunakan untuk ionisasi ini: metana, iso-butana atau amonia
4. Jenis sumber ion tertutup digunakan

Puncak molekul penting untuk menentukan berat molekul. Namun, spektrum EI kadang-kadang menunjukkan seperti puncak molekul kecil yang sulit untuk menentukan berat molekul. Dibandingkan dengan spektrum EI, spektrum PCI menunjukkan puncak terkait molekul yang intens dengan fragmentasi yang lebih sedikit. Menggunakan metana atau iso-butana biasanya menghasilkan molekul protonated, yang massanya $M + 1$, di mana M adalah massa molekul. Sebagai contoh, puncak basis spektrum PCI methylstearate adalah 239; berat molekul metilstearat 238 ditambah massa ion hidrogen 1

PCI membutuhkan kondisi berikut, minimal:

1. Gas reagen dipasok ke sumber ion. Sebagai gas reagen, Metana, iso-butana atau amonia biasa digunakan.
2. Tekanan dalam sumber ion adalah sekitar 10 hingga 100 Pa. Untuk mewujudkan tekanan ini, sumber ion PCI hampir tertutup.



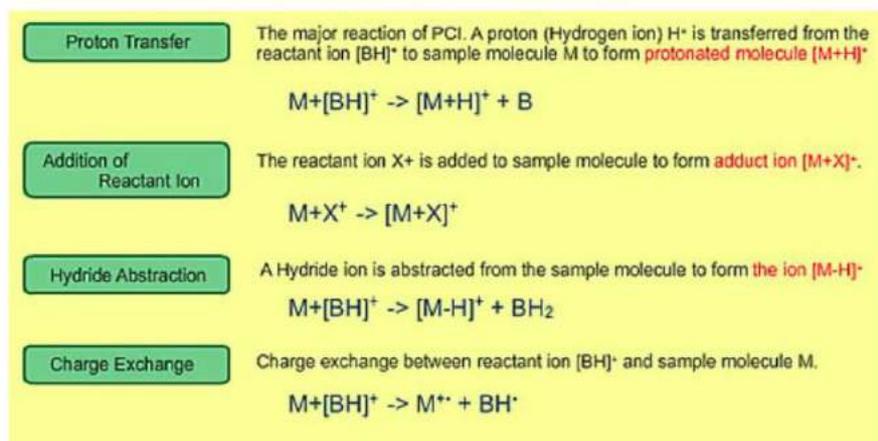
Gambar 37. Spektrum massa dari methylstearate dengan metode PCI dibandingkan dengan EI.

Spektrum metana EI menunjukkan puncak dasar pada m/z 16. Spektrum ini sangat berbeda dari spektrum di bawah kondisi PCI yang sesuai, di mana banyak ion kompleks dihasilkan. Jika spektrum gas reagen metana yang diamati dalam mode PCI tampak seperti spektrum EI, Anda dapat memeriksa tekanan gas reagen atau menduga pemasangan sumber ion yang salah.

Proses ionisasi PCI terdiri dari tiga langkah berikut:

1. Gas reagen terionisasi oleh EI.
2. Ion reaktan diciptakan oleh reaksi antara ion yang dihasilkan dalam (1) dan molekul gas reagen.
3. Molekul-molekul sampel terionisasi oleh reaksi dengan ion-ion reaktan.

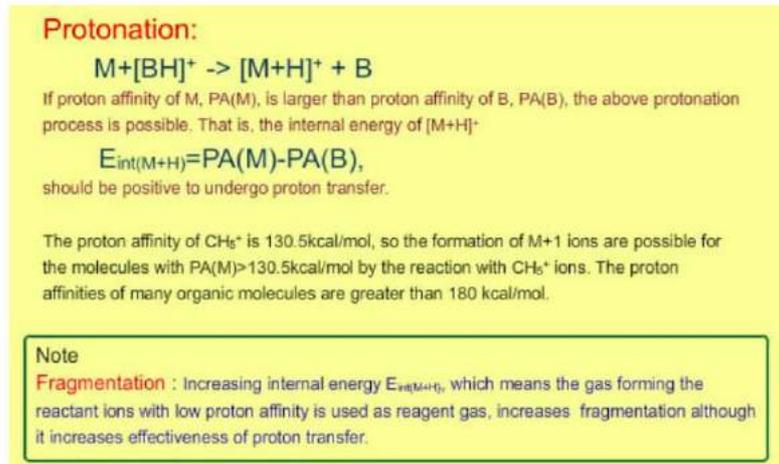
Dalam PCI, sampel terionisasi oleh reaksi antara molekul sampel dan ion reaktan dengan beberapa cara. Beberapa reaksi penting dirangkum pada gambar 35.



Gambar 38. Reaksi-reaksi ionisasi molekul sampel.

Transfer proton adalah reaksi yang paling penting dalam PCI, karena puncak molekul terprotonasi, yang dihasilkan oleh reaksi ini, sangat diperlukan dalam menentukan berat

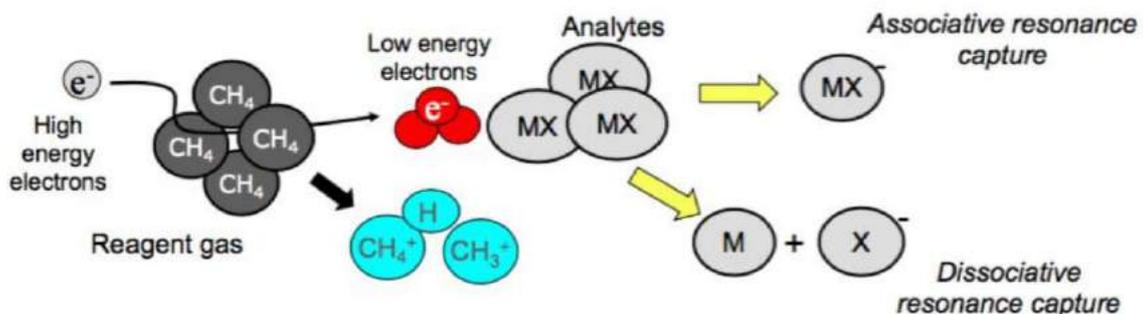
molekul. Kecenderungan molekul sampel untuk menerima proton diukur dengan afinitas proton P.A.



Gambar 39. Keterangan terkait transfer proton

Negative Chemical Ionization (NCI)

EI (Ionisasi Elektron), PCI (Ionisasi Kimia positif) dan NCI (Negative Chemical Ionization) umumnya digunakan dalam analisis GCMS. Penting untuk memahami fitur dari masing-masing metode ionisasi untuk memilih yang paling sesuai.



Gambar 40. Prinsip ionisasi dengan metode NCI.

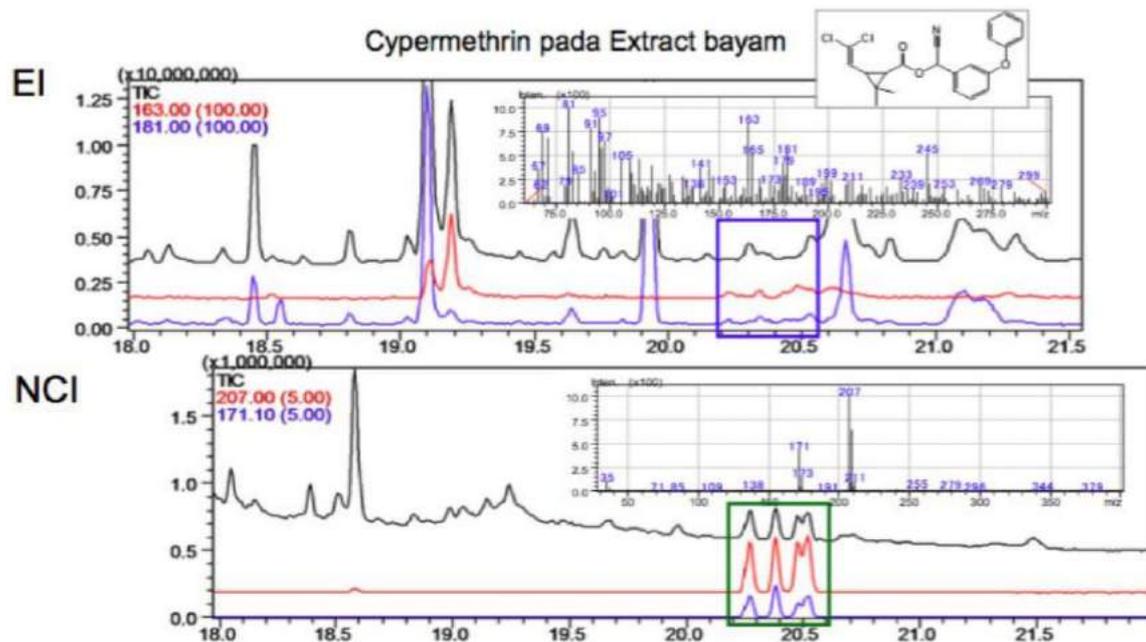
Secara umum, meskipun ion positif dan negatif terbentuk dalam sumber ion, hanya ion negatif yang diekstraksi secara elektrik dari sumber untuk analisis NCI. Ion negatif diproduksi terutama oleh proses penangkapan elektron, yang memberi kita alat kepekaan sangat tinggi untuk menganalisis sampel afinitas elektron tinggi seperti senyawa terhalogenasi.

Ion negatif terutama dibentuk dengan menangkap (atau melampirkan) elektron termal

1. NCI adalah metode ionisasi lembut, seperti PCI, sehingga spektrum NCI relatif sederhana.
2. NCI sangat sensitif dan sangat selektif untuk senyawa dengan afinitas elektron positif. Semua senyawa tidak dapat diion negatif. Sebagai contoh, hidrokarbon tidak dapat diion negatif. Oleh karena itu, NCI memungkinkan kami untuk melakukan analisis yang sangat selektif dan sangat sensitif, kira-kira setara dengan ECD, untuk senyawa ini.

3. Gas reagen digunakan untuk ionisasi ini: metana, iso-butana atau amonia. Gas ini memudahkan molekul sampel untuk menangkap elektron dengan memperlambat kecepatan elektron.
4. Jenis sumber ion semi tertutup digunakan. Tekanan dalam sumber ion adalah sekitar 1 hingga 10 Pa.
5. Mengionisasi menggunakan elektron berenergi rendah yang dihasilkan dari pengionan reagen gas
6. Elektron berenergi rendah akan ditangkap oleh molekul sampel dengan afinitas elektron untuk menciptakan ion negatif.
7. Senyawa dengan afinitas elektron meliputi senyawa halogen, senyawa nitro, dan senyawa
8. organophosphorus. Kelompok fungsional termasuk halogen, nitro, nitroso, amida, isocyan, cyan, aromatik polisiklik, organofosfat, karboksil, dan kelompok sulfon.
9. NCI sangat berguna untuk mendeteksi komponen yang sulit terdeteksi dengan EI

Energi elektron termal, ditangkap oleh senyawa untuk menghasilkan ion negatif, terlalu kecil untuk memecah senyawa sampel menjadi banyak fragmen kecil. Oleh karena itu, spektrum NCI menunjukkan pola sederhana dibandingkan dengan spektrum EI.



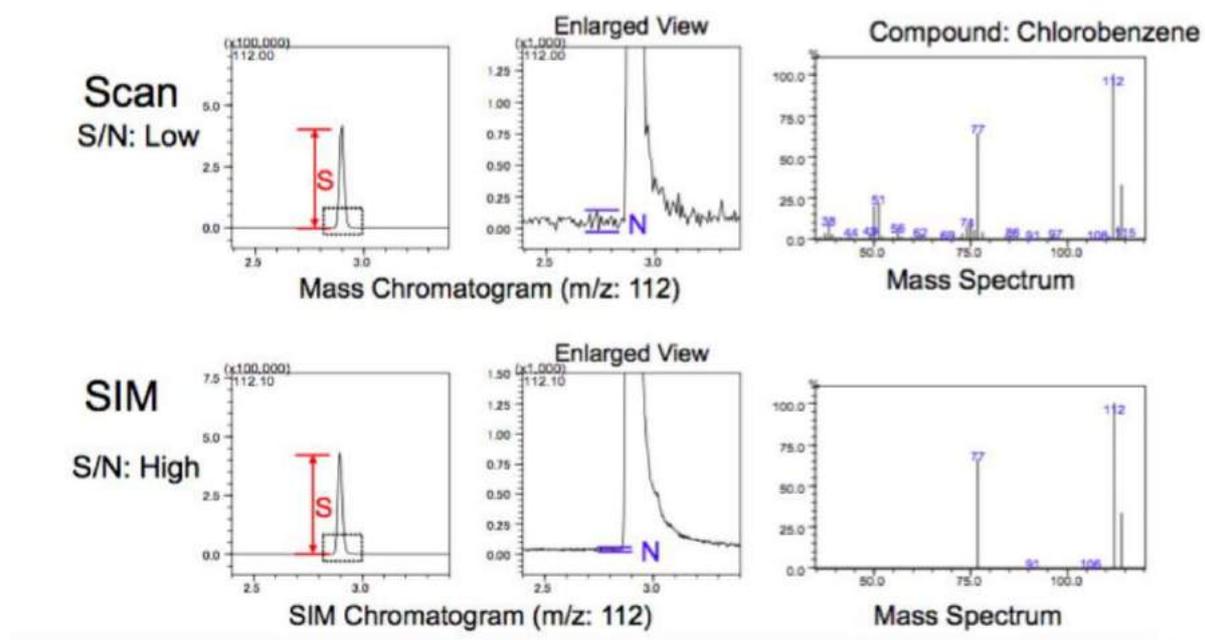
Gambar 41. Spektrum massa cypermethrin dari ekstrak bayam menunjukkan perbandingan antara EI dan NCI.

Ada dua proses ionisasi utama untuk NCI: penangkapan elektron resonansi yang menghasilkan ion molekuler dan penangkapan elektron disosiatif yang menyebabkan fragmentasi. Elektron yang dipancarkan dari filamen kehilangan energinya untuk menjadi elektron termal oleh tabrakan dengan gas reagen dan ionisasi molekul gas reagen. Hampir 0 eV elektron ditangkap oleh molekul sehingga ion molekuler diproduksi. Jika elektron memiliki energi yang cukup untuk memecah molekul, terjadi fragmentasi.

Mode-Mode Akuisisi

Ada dua mode akuisisi yang digunakan yaitu metode scan dan metode SIM. Metode scan digunakan secara umum untuk analisis kualitatif menggunakan spektrum *fingerprint* MS dan membandingkan dengan spektrum MS database. Sedangkan metode SIM (Selected Ion Monitoring) digunakan untuk analisis kuantitatif. Anda dapat menggunakan mode pindai atau mode SIM untuk analisis GC-MS. Pilihannya tergantung pada tujuan analisis. Jika Anda mengidentifikasi komponen sampel menggunakan spektrum massa, mode pemindaian sangat diperlukan. Mode SIM cocok untuk analisis kuantitatif komponen jejak. Ketika spektrum massa *pf* komponen jejak diketahui. Data spektral massa diperoleh secara berurutan pada interval tertentu, misalnya 0,5 detik, dengan mengubah tegangan yang diterapkan ke batang. Semua spektrum yang diukur disimpan di komputer untuk diproses.

Mode scan memiliki kelebihan yaitu informasi kualitatif dapat diperoleh dari spektrum massa dan dapat diperoleh informasi selain senyawa target. Sedangkan kekurangan mode scan adalah kurang sensitif dibandingkan mode SIM. Sedangkan mode SIM jelas lebih sensitif dibanding dengan mode scan. Namun kekurangan mode SIM adalah tidak diperoleh spektrum massa secara lengkap dan hanya informasi dari komponen target saja yang didapatkan. Contoh perbandingan spektrum massa yang diperoleh dari kedua mode ditunjukkan pada gambar berikut:

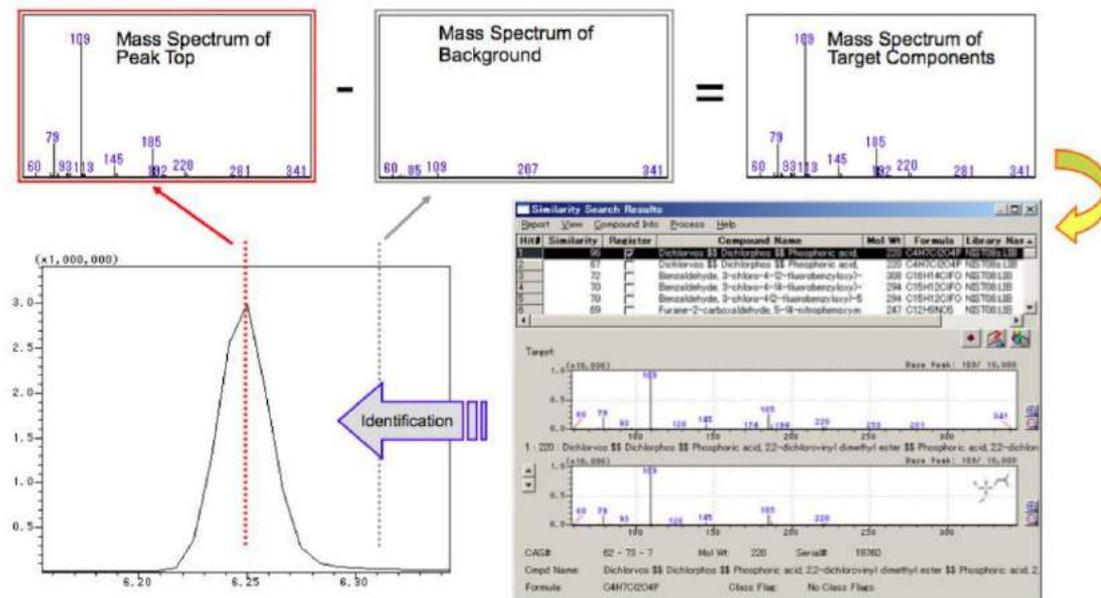


Gambar 42. Perbandingan hasil mode scan dan SIM dilihat dari rasio signal/derau (S/N-rasio).

Analisis Kualitatif dengan GC-MS

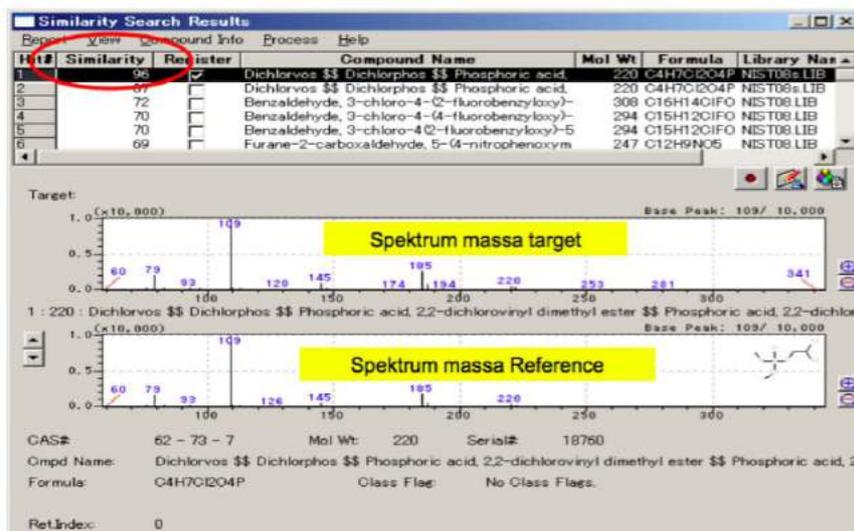
Dalam analisis kualitatif kita akan melakukan identifikasi semua/sebagian senyawa (puncak) yang terdeteksi oleh GC/MS Total Ion Chromatogram (TIC). TIC (Total Ion Chromatogram) adalah kromatogram yang dibuat dengan menjumlahkan intensitas semua puncak spektral massa yang termasuk dalam pemindaian yang sama. TIC dibandingkan dengan kromatogram GC. Perhatikan bahwa TIC termasuk kebisingan latar belakang serta komponen sampel.

Identifikasi senyawa dengan GC-MS biasanya dilakukan dengan membandingkan spektrum massa target dengan spektrum massa referensi yaitu spektrum massa pada library dan membandingkan waktu retensi dari puncak target dengan waktu retensi dari senyawa standar.



Gambar 43. Proses analisa kualitatif untuk identifikasi senyawa yang ada pada library.

Dengan menggunakan Software GCMSsolution dari Shimadzu, maka software akan mencari spektrum massa di library berdasarkan kesamaan spektrum yang mengacu pada spektrum massa target (Similarity Search), kemudian software akan memilih m/z karakteristik dari spektrum massa target dan mencari spektra massa di library yang terdiri dari m/z tersebut (Pre-Search), selanjutnya software akan melakukan perhitungan besarnya Indeks Kesamaan (similarity index) spektrum massa untuk setiap referensi yang ditemukan dari langkah Pra Search, berdasarkan pada algoritma pencarian standar.



Gambar 44. Penggunaan software GCMSsolution Shimadzu dalam melakukan pencarian *similarity* dari spektrum massa target.

BAB 6 Analisa Pigmen dengan LC-MS

BAB 7 Analisa Senyawa Volatil dengan GC-MS

Daftar Pustaka

Robinson, J.W., Skelly Frame, E.M., Frame II, G.M. (2014) Undergraduate instrumental analysis, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Shimadzu Cooperation,(2010-2012) High performance liquid chromatography mass spectrometer LCMS-8030 LCMS-8040 instruction manual, Shimadzu Cooperation, Kyoto.

Synder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. (2010) Introduction to modern liquid chromatography, John Willey & Sons, Inc., New Jersey.