



## **BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM KIMIA INSTRUMENTAL**



**Di Susun Oleh:**

**apt. Sundari Desi Nuryanti, M.Sc.  
apt. Feti Rahmawati, M.Sc**

**Kontributor:**

**Dr. Muh. Abdurrahman Munir, M.Sc  
apt. Laili Nailul Muna, M.Sc**

**LABORATORIUM BIOMEDIKA  
PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ALMA ATA  
YOGYAKARTA  
2023**

**HALAMAN PENGESAHAN**  
**Buku Petunjuk Praktikum Kimia Instrumental**  
**Disahkan di Yogyakarta pada bulan September 2023**

Ketua Prodi Farmasi,



apt. Rizal Fauzi, M.Clin. Pharm.

LnO Praktikum Kimia Instrumental,



apt. Sundari Desi Nuryanti, M. Sc.

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan



Dr. Yhona Paratmanitya, S.Gz., Dietisien., M.P.h

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang tak henti-hentinya memberikan nikmat kepada kita sehingga selalu terbuka jalan untuk kita meraih apa yang kita cita-citakan. Shalawat serta salam tercurah kepada Rasulullah Muhammad SAW sebagai teladan dan guru besar kita dalam menapaki kehidupan dunia.

Alhamdulillah sekali lagi penulis ucapkan atas terbitnya Petunjuk Praktikum Kimia Instrumental edisi revisi 2017 ini, semoga dapat memberikan manfaat bagi pembacanya. Buku ini hanyalah merupakan rangkuman dari beberapa buku acuan dengan maksud agar lebih sistematis dan mudah dipahami. Oleh karena itu, para pembaca hendaknya **tidak menjadikan** buku ini sebagai referensi standard dalam pembuatan laporan/karya ilmiah, akan tetapi penulis juga mencantumkan referensi-referensi acuan tersebut dalam buku ini. Tentu saja masih banyak kekurangan dalam berbagai sisi dari buku ini, untuk itu penulis menerima kritik dan saran demi penyempurnaan buku ini.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Tim Lab Kimia Farmasi UAA

**DAFTAR ISI**

<b>Halaman Cover</b> .....	
<b>Halaman Depan</b> .....	<b>i</b>
<b>Kata Pengantar</b> .....	<b>ii</b>
<b>Daftar Isi</b> .....	<b>iii</b>
<b>Tata tertib laboratorium kimia analisa</b> .....	<b>iv</b>
<b>Keamanan dan keselamatan kerja Laboratorium</b> .....	<b>v</b>
<b>Teknik Kerja Laboratorium</b> .....	<b>vii</b>
<b>Percobaan I</b> .....	<b>13</b>
<b>Percobaan II</b> .....	<b>15</b>
<b>Percobaan III</b> .....	<b>17</b>
<b>Percobaan IV</b> .....	<b>20</b>
<b>Percobaan V</b> .....	<b>22</b>
<b>Percobaan VI</b> .....	<b>26</b>

## TATA TERTIB LABORATORIUM KIMIA ANALITIK

### TATA TERTIB PRAKTIKUM

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai Praktikan.

Berikut tata tertib Praktikum Kimia:

1. Mahasiswa **melakukan pretes** dengan dosen pembimbing terhadap materi yang akan dipraktikkan **1 minggu sebelumnya**, mahasiswa diperkenankan praktikum apabila sudah lulus pretes dengan **bukti acc dari dosen** pada laporan sementara
2. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, **keterlambatan lebih dari 15 menit** sejak praktikum dimulai tanpa ada alasan yang dapat diterima, praktikan boleh mengikuti praktikum tapi tidak memperoleh **nilai praktikum** dan **nilai laporan**.
3. Setelah praktikum dibuka oleh asisten akan dilakukan **mini kuis**
4. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan mengenakan jas praktikum
5. Praktikan wajib membawa: laporan sementara yang sudah disahkan (ACC), laporan resmi hasil praktikum, tabung reaksi, pipet tetes, serbet, tisu dan masker
6. Praktikan wajib mengisi daftar presensi
7. Praktikan tidak diperbolehkan makan, minum dan atau merokok di dalam laboratorium selama praktikum berlangsung.
8. Praktikan tidak diperbolehkan bersenda gurau yang mengakibatkan terganggunya kelancaran praktikum
9. Praktikan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing, serta lantai disekitarnya
10. Setelah menggunakan reagen, praktikan wajib meletakkan kembali pada tempatnya semula
11. Praktikan dilarang menghambur-hamburkan reagen praktikum dan membuang sisa praktikum dengan memperhatikan kebersihan dan keamanan
12. Jika akan meninggalkan ruang laboratorium, praktikan wajib meminta ijin kepada dosen atau asisten jaga
13. Praktikan melakukan analisis sesuai bagiannya masing-masing, mencatat hasilnya pada lembar kerja praktikum, serta memintakan "ACC" pada dosen pembimbing praktikum.

## KEAMANAN & KESELAMATAN KERJA LABORATORIUM

1. Rencanakan percobaan yang akan dilakukan sebelum memulai praktikum
2. Sediakanlah alat-alat yang akan dipakai di atas meja. Alat-alat yang tidak digunakan sebaiknya disimpan didalam almari supaya tidak mengganggu dalam bekerja
3. Gunakan peralatan kerja seperti masker, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
4. Zat yang akan dianalisis disimpan dalam tempat tertutup agar tidak kena kotoran yang mempersulit analisis
5. Dilarang memakai perhiasan yang dapat rusak karena bahan kimia.
6. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
7. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
8. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia, tetapi kipaslah uap tersebut dengan tangan ke muka anda
9. Dilarang mencicipi atau mencium bahan kimia kecuali ada perintah khusus.
10. Bahan kimia dapat bereaksi langsung dengan kulit menimbulkan iritasi (pedih atau gatal).
11. Baca label bahan Kimia sekurang-kurangnya dua kali untuk menghindari kesalahan.
12. Pindahkan sesuai dengan jumlah yang diperlukan, jangan menggunakan bahan Kimia secara berlebihan.
13. Jangan mengembalikan bahan kimia ke dalam botol semula untuk mencega kontaminasi.
14. Biasakanlah mencuci tangan dengan sabun dan air bersih terutama setelah melakukan praktikum.
15. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
16. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
17. Dilarang menggunakan kontak lens pada saat praktikum.
18. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktiukm basah segera keringkan dengan lap
19. Hindarkan dari api bahan-bahan yang mudah terbakar seperti eter, kloroform, dsb.
20. Hati-hati dalam menggunakan bahan-bahan yang adapat menimbulkan luka bakar, misalnya asam-asam pekat ( $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $HCl$ ), basa-basa kuat ( $KOH$ ,  $NaOH$ , dan  $NH_4OH$ ), dan oksidator kuat (air brom, iod, senyawa klor, permanganat)
21. Percobaan dengan penguapan menggunakan asam-asam kuat dan menghasilkan gas-gas beracun dilakukan di almari asam
22. Jangan memanaskan zat dalam gelas ukur/labu ukur
23. Menetralkan asam/basa
  - asam pada pakaian: dengan amonia encer
  - basa pada pakaian : dengan asam cuka encer, kemudian amonia encer

- asam/basa pada meja/lantai: dicuci dengan air yang banyak
  - asam, basa, dan zat-zat yang merusak kulit: dicuci dengan air, kemudian diberi vaselin
24. Bila terjadi kecelakaan yang berkaitan dengan bahan kimia, laporkan segera pada dosen atau asisten dosen

## TEKNIK KERJA LABORATORIUM

### A. Teknik Analisis Kualitatif

1. *Reaksi pembentukan warna atau pembentukan endapan.* Jika tidak dinyatakan lain, ambil kira-kira 1 ml (20 tetes) larutan sampel, masukkan tabung reaksi (jika masih ada proses selanjutnya) atau druppel plat (jika tidak ada proses selanjutnya), tambahkan pereaksi secukupnya secara bertetes-tetes sampai terjadi perubahan warna. Jika pereaksi yang digunakan sudah cukup banyak ( $\pm 1$  ml) tetapi tidak terjadi perubahan warna ataupun menghasilkan endapan, maka hasil reaksi dinyatakan negatif.
2. *Cara memanaskan zat dalam cawan porselin/erlenmeyer/gelas beker*



- ambillah kaki tiga dan letakkan kasa kawat di atasnya
- letakkan gelas kimia yang berisi larutan di atas kasa dan panaskan dengan pemanas spiritus

Gambar 1. Cara Memanaskan

3. *Cara memanaskan zat dalam tabung reaksi*
  - jepit tabung reaksi yang berisi larutan dengan penjepit kayu/besi,
  - panaskan dengan nyala api spiritus, api pemanas hendaknya terletak pada bagian atas larutan
  - goyangkan tabung reaksi agar pemanasan merata
  - arahkan mulut tabung reaksi pada tempat yang aman agar percikannya tidak melukai orang lain maupun diri sendiri
4. *Cara menyaring endapan*



Gambar 2. Cara Menyaring

- gunakan kertas saring yang dibentuk seperti gambar disamping
- saringlah sedikit demi sedikit, kira-kira banyaknya larutan adalah sepertiga tinggi kertas

5. *Cara mencuci endapan pada kertas saring.* Arahkan aliran air dari sebuah botol pencuci pertama-tama di sekitar pinggir atas kertas saring menyusul gerakan spiral (memutar ke arah



dalam) menuju endapan dan tiap pencucian kertas saring terisi antara separuh sampai dua pertiganya

6. Cara reaksi kristal dengan mikroskop. 1 tetes larutan sampel pada objek glass, tambahkan 1 tetes pereaksi, tutup dengan deck glass. Tempatkan pada mikroskop, atur perbesaran hingga gambar kristal terlihat jelas.

## B. Teknik Analisis Kuantitatif

### 1. Penimbangan

#### a. Neraca Analitik Digital

Neraca analitik merupakan alat yang digunakan dalam analisis untuk penentuan bobot suatu bahan. Pengukuran dengan neraca analitik digital memiliki ketelitian tinggi, skala kecil/mikro (biasanya hingga 4 desimal 0,0001 gram). Neraca ini dibedakan menjadi empat berdasarkan ketelitiannya :



1. Timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg
2. Timbangan semi mikro dengan ketelitian 0,01 mg
3. Timbangan mikro dengan ketelitian 0,001 mg
4. Timbangan ultra mikro dengan ketelitian, 0,0001 mg

Gambar 3. Neraca Analitik Digital

#### b. Prosedur Pengoperasian

1. Disiapkan timbangan analitik dalam kondisi seimbang atau water pass (atur sekrup pada kaki neraca sehingga gelembung air di water pass tepat berada di tengah).
2. Neraca dibersihkan dengan menggunakan kuas terutama piringan neraca dan seluruh timbangan
3. Tancapkan stop kontak pada stavolt.
4. Tekan tombol On ( tunggu hingga muncul angka 0,0000 g)
5. Masukkan alas bahan ( gelas arloji, kertas atau benda tipis).
6. Tutup kaca neraca analitik dan tekan tombol zero
7. Buka kaca dan masukkan bahan yang akan ditimbang
8. Tutup kaca dan tunggu hingga angka di layar monitor neraca analitik tidak berubah
9. Ambil bahan yang telah ditimbang kemudian matikan neraca (tekan tombol Off)
10. Lepaskan stop kontak dari stavolt
11. Bersihkan kembali ruang dalam neraca analitik dengan menggunakan kuas.

c. Pengontrolan Neraca

Timbangan/Neraca dikontrol dengan menggunakan anak timbangan yang sudah terpasang atau dengandua anak timbangan eksternal, misal 10 gr dan 100 gr. Timbangan/Neraca elektronik harus menunggu30 menit untuk mengatur temperatur. Jika menggunakan timbangan yang sangat sensitif hanya dapatbekerja pada batas temperatur yang ditetapkan. Timbangan harus terhindar dari gerakan (angin)sebelum menimbang angka 'nol' harus dicek dan jika perlu lakukan koreksi. Penyimpangan berat dicatatpada lembar/kartu kontrol, dimana pada lembar tersebut tercantum pula berapa kali timbangan harusdicek. Jika timbangan tidak dapat digunakan sama sekali maka timbangan harus diperbaiki.

d. Proses Pengukuran

Proses penimbangan menggunakan neraca digital perlu diperhatikan beberapa hal berikut :

1. Pastikan bahwa timbangan sudah menyala.
2. Pastikan timbangan menunjukkan angka 'nol' ( jika tidak perlu di koreksi).
3. Letakkan benda yang massanya akan diukur pada piringan tempat benda.
4. Baca skala yang tertera pada display digital sesuai skala satuan timbangan tersebut.
5. Untuk pengukuran yang sensitivitasnya tinggi perlu menunggu 30 menit, karena hanya dapat bekerjapada batas temperatur yang ditetapkan.

e. Jenis Penimbangan



*Penimbangan.* Gunakan sendok untuk mengambil zat yang akan ditimbang. Pilih timbangan yang tepat sesuai kapasitasnya. Jangan menimbang zat melebihi kapasitas maksimal timbangan yang digunakan. Catat hasil timbangan. Perhatikan contoh perintah penimbangan berikut:

Gambar 4. Cara Menimbang

\* *“Timbang dengan saksama...”* artinya: deviasi penimbangan tidak boleh lebih dari 0,1% dari jumlah yang ditimbang. Misalnya dengan pernyataan timbang seksama 500 mg, berarti batas kesalahan penimbangan tidak boleh lebih dari 0,5 mg. Oleh karena itu, penimbangan harus dilakukan dengan neraca analitik kepekaan minimal 0,5 mg. Penimbangan saksama dapat juga dinyatakan dengan menambahkan angka 0 dibelakang koma pada akhir bilangan bersangkutan. Misalnya, dengan pernyataan timbang 200,0 mg dimaksudkan bahwa penimbangan harus dilakukan dengan saksama

\* *“Timbang lebih kurang...”* artinya: jumlah yang harus ditimbang tidak boleh kurang dari 90% dan tidak boleh lebih dari 110% dari jumlah yang harus ditimbang.

Menimbang teliti atau seksama ada dua cara yaitu :

a) Menimbang Langsung

Cara menimbang langsung

- berat botol timbang kosong = 10.2368 g

- berat botol timbang + zat = 10.8796 g -

→ **berat zat = 0.6428 g**

b) Menimbang tidak langsung

Cara menimbang tidak langsung

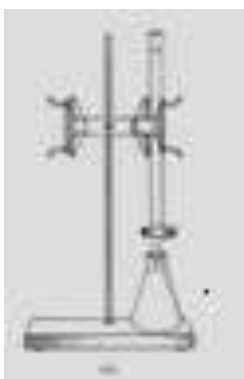
- berat botol timbang + zat = 12.3456 g

- berat botol timbang + sisa zat setelah dituang ke beaker glass = 11.6952 g -

→ **berat zat = 0.6504 g**

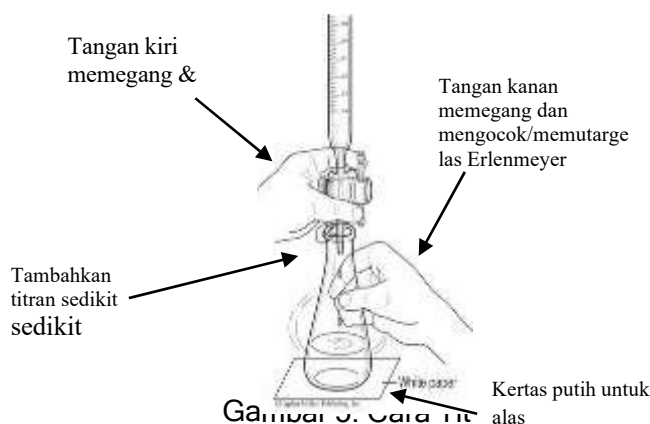
2. *Pengukuran*. Pengukuran volume larutan bisa menggunakan gelas ukur, kecuali jika dinyatakan perintah "ukur dengan seksama...", dimaksudkan bahwa pengukuran dilakukan dengan memakai pipet standar dan harus digunakan sedemikian rupa sehingga kesalahannya tidak melebihi batas yang ditetapkan. Penggunaan pipet dapat diganti dengan buret yang sesuai dan memenuhi standar. Pengukuran seksama dapat juga dinyatakan dengan menambahkan angka 0 di belakang angka koma terakhir bilangan yang bersangkutan. Misalnya dengan pernyataan pipet 10,0 ml atau ukur 10,0 ml dimaksudkan bahwa pengukuran harus dilakukan dengan seksama.

3. *Penggunaan buret*

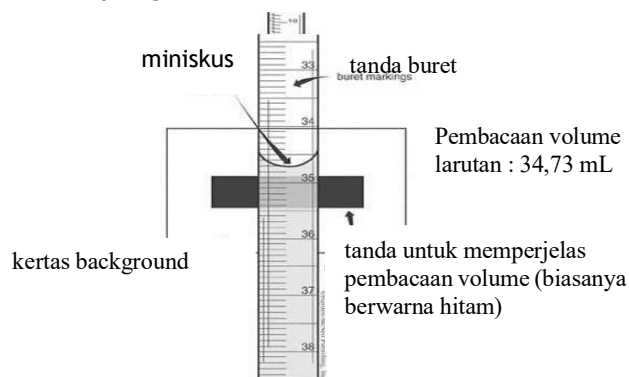


- Periksa terlebih dahulu apakah buret dalam kondisi baik (tidak pecah atau bocor), berikan sedikit saja vaselin pada kran agar pengaturan penyetoran mudah dilakukan.
- Bersihkan buret sebelum digunakan dengan air, bilaslah buret tersebut dengan sedikit zat kimia yang akan dimasukkan ke dalamnya.
- Pasang buret pada statif dan klem agar posisinya stabil seperti gambar
- Masukkan zat kimia yang akan digunakan ke dalam buret tersebut dengan menggunakan corong. Lakukan pengisian sampai seluruh bagian buret terisi (perhatikan bagian bawahnya !) dan tidak terdapat gelembung gas pada buret.

4. *Pemilihan buret.* Lakukan titrasi orientasi terlebih dahulu menggunakan buret kapasitas 50,0 ml. Untuk selanjutnya, pada titrasi replikasi pemilihan buret harus berdasarkan ketentuan: Volume terukur yang teliti adalah sebanyak 30 – 70% dari kapasitas buret. Jadi, jika dari hasil orientasi didapat volume titrasi 10,0 ml, maka titrasi selanjutnya gantilah dengan buret kapasitas 25,0 ml
5. *Cara titrasi.* Zat yang akan dititrasi disebut sebagai **titrat** (ditampung dalam erlenmeyer), sedangkan larutan yang digunakan untuk menitrasi disebut sebagai **titran** (dimasukkan ke dalam buret). Posisi tangan pada saat titrasi ditunjukkan seperti gambar dibawah.



6. *Pembacaan volume titrasi.* Mata harus sejajar miniskus, gunakan miniskus bawah untuk menentukan volume titrasi. Jangan lupa perhatikan skala buret, karena masing-masing kapasitas buret memiliki skala yang berbeda.



7. *Penetapan dalam duplo.* Lakukan penetapan paling sedikit dua kali. Jika kesesuaian hasilnya lebih dari 0,4 hasil tersebut tidak dapat dirata-rata. Jika digunakan volume larutan sampel yang sama, maka pembacaan buret tidak boleh berselisih lebih dari 0,05 ml. Jika syarat-syarat ini tidak tercapai, maka harus dilakukan titrasi ulang sampai diperoleh selisih yang tidak lebih dari 0,05 ml.
8. *Penulisan angka penting*

Angka penting adalah semua digit dalam suatu bilangan (diperoleh dari pengukuran) yang bersifat pasti plus satu yang mengandung suatu ketidakpastian (perkiraan). Penulisan

angka hasil pengukuran, pada hakekatnya berkaitan dengan ketelitian alat yang dipakai. Cara penulisan angka penting mengikuti kaidah sebagai berikut :

- a. Secara umum, penulisan hasil pengukuran hanya terdapat satu angka yang harganya tak tentu (*uncertain*), yaitu angka terakhir.  
Contoh : penulisan hasil pembacaan buret makro dengan skala terkecil 0,1 ml seharusnya ditulis dua desimal, misalnya 12,65 ml. Angka 5 merupakan angka tidak pasti karena terletak antara 12,60-12,70 ml.
- b. Banyaknya desimal hasil penjumlahan atau pengurangan sama dengan faktor yang mengandung desimal paling sedikit.
- c. Banyaknya desimal hasil perkalian atau pembagian sama dengan satu angka lebih banyak daripada yang terdapat pada faktor yang mengandung desimal paling sedikit.
- d. Penulisan hasil akhir yang memerlukan pembulatan angka desimal, maka angka desimal 5 atau lebih dibulatkan ke atas, sedangkan angka desimal < 5 dibulatkan ke bawah

## PERCOBAAN I

### SPEKTROFOTOMETRI ULTRA VIOLET

#### TUJUAN

1. Menentukan pengaruh substituent terhadap panjang gelombang serapan maksimum
2. Menentukan pengaruh pelarut terhadap panjang gelombang serapan maksimum
3. Menentukan  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  suatu senyawa
4. Menetapkan kadar campuran senyawa secara simultan.

#### CARA KERJA

1. Buatlah larutan induk asam benzoate dalam air suling dengan konsentrasi 1 mg/ml
2. Buatlah larutan induk asam salisilat dalam air suling konsentrasi 1 mg/ml
3. Pipetlah larutan nomor 2 sebanyak 1 ml dan encerkan dengan air suling sampai 5 ml. Dan buatlah spektogram dari masing-masing larutan pada  $\lambda$  200 nm sampai 320 nm. Amati, mengapa  $\lambda$  serapan maksimum berbeda? Perhatikan bahwa intensitas serapan tidak melebihi 0,8 dan tidak kurang dari 0,2 untuk analisis kuantitatif.
4. Kerjakan seperti no.3 tetapi sebelum diencerkan dengan air suling tambah dulu dengan asam HCL 1 ml 0,1 N kemudian tambah air suling ad 5 ml dan amati spektrogramnya pada  $\lambda$  200 nm dan 320 nm. Bandingkan  $\lambda$  serapan maksimumnya dengan no.3
5. Kerjakan dengan cara yang sama dengan no.3 tetapi sebelum diencerkan tambah dulu larutan NaOH 0,1 N sebanyak 1 ml dan encerkan dengan air suling sampai 5 ml. Amati spektrogramnya, pada  $\lambda$  200 sampai 320 nm. Mengapa mereka mempunyai  $\lambda$  serapan maksimum yang berbeda?
6. Hitung masing-masing senyawa berapa harga serapan  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  dengan data yang Anda dapat dari percobaan no.3 dan no.5  
Baca serapan asam benzoat pada  $\lambda$  asam salisilat dan serapan asam salisilat pada  $\lambda$  benzoate. Kemudian hitung pula serapan  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  masing-masing senyawa tersebut. Adakah kenaikan intensitas dan pergeseran  $\lambda$  serapan maksimum.
7. Campurlah 1 ml asam benzoate dan 2 ml asam salisilat dari larutan no.2 ke dalam labu takar 10 ml. Amatilah spektogram campuran tersebut pada  $\lambda$  200 nm sampai 300 nm.  
Kemudian carilah kadar masing-masing senyawa C1 untuk asam benzoate dan C2 untuk asam salisilat dengan rumus:

$$At_1 = K^{\lambda_1}_1 C_1 + K^{\lambda_2}_1 C_1$$

$$At_2 = K^{\lambda_1}_2 C_1 + K^{\lambda_2}_2 C_2$$

Keterangan:

$A_t$  : serapan total (jumlah) dapat dibaca dan dijumlahkan pada lambda pada lambda masing-masing

$K^{\lambda_1}_1$  : Harga serapan ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) asam benzoate pada lambda serapan maksimumnya.

$K^{\lambda_2}_1$  : serapan asam salisilat  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  pada serapan maksimum asam benzoate

$K^{\lambda_1}_2$  : serapan asam benzoat  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  pada serapan maksimum asam salisilat

$K^{\lambda_2}_2$  : serapan asam salisilat  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  pada serapan maksimum asam salisilat

Data yang dilaporkan adalah:

1. Spektogram masing-masing senyawa (benzoate dan salisilat)
2. Kadar dari masing senyawa setelah dicampur dan dihitung kadarnya.

## PERCOBAAN II

### SPEKTROFOTOMETRI SINAR TAMPAK

#### TUJUAN

1. Memahami tahapan analisis dengan spektrofotometri sinar tampak
2. Menetapkan kadar sampel dengan cara mereaksikan senyawa agar diperoleh senyawa berwarna
3. Menentukan kadar dengan persamaan regresi dan plot grafik

#### CARA KERJA

1. Penentuan operating time  
Pipetlah larutan asam salisilat 0,1 mg/ml sebanyak 5 ml ke dalam labu takar 10 ml dan tambahkan Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1% dalam HNO<sub>3</sub> 1% sebanyak 0,5 ml ad tanda dengan aquadest kemudian segera dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal teoritis. Atur lama pembacaan selama 15 menit.
2. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum  
Pipetlah larutan asam salisilat 0,1 mg/ml sebanyak 5 ml ke dalam labu takar 10 ml dan tambahkan Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1% dalam HNO<sub>3</sub> sebanyak 0,5 ml ad tanda dengan aquadest. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca spectra panjang gelombang pada rentang 400-800 nm
3. Pembuatan Kurva Baku  
Buatlah larutan seri kadar asam salisilat sebesar 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml dari larutan induk 0,1 mg/ml. Kemudian tambahkan Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1% dalam HNO<sub>3</sub> 1 % sebanyak 0,5 ml ad tanda dengan aquadest. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh.
4. Tentukan absorbansi larutan seri kadar dan buat persamaan kurva baku dengan syarat harga kolerasi (r) percobaan lebih besar dari table ( $\alpha=0,05$ ). Tetapkan persamaan regresinya buat table:

Contoh table data hubungan kadar dan serapan

No	Konsentrasi	Absorbansi



5. Preparasi sampel asam salisilat

Timbang seksama 10 mg sampel dan larutkan dalam 10 ml aquadest. Pipet 1 ml ke dalam labu 10 ml dan tambahkan  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$  1% dalam  $\text{HNO}_3$  1% sebanyak 0,5 ml ad tanda dengan aquadest. Penambahan air ad 10 ml dilakukan setelah larutan berwarna. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh. Lakukan replikasi minimal 3 kali dan gambarkan regresi yang diperoleh pada kertas grafik. Hitung kadar asam salisilat dalam sampel dengan persamaan regresi linier kurva baku yang diperoleh.

## PERCOBAAN III

### VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI

P-ISSN : 2303-3142 E-ISSN : 2548-8570

Vol. 6, No. 1, April 2017

#### VERIFIKASI METODE PENENTUAN ASETOSAL DALAM OBAT SAKIT KEPALA DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV

Kuntari<sup>1</sup>, T. Aprianto<sup>2</sup>, R. Hadiyati Noor<sup>3</sup>, Baruji<sup>4</sup>

DIII Analis Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia  
Yogyakarta, Indonesia

e-mail: <sup>1</sup>chemist.tari@gmail.com, 162310401@uii.ac.id

#### Abstrak

Asetosal merupakan suatu obat yang berfungsi sebagai analgesik, antipiretik dan anti-inflamasi yang sering digunakan oleh masyarakat luas. Penggunaan asetosal dalam dosis tinggi dapat menyebabkan indikasi dan efek negatif bagi tubuh sehingga pengawasan mutu yang menyangkut kandungan asetosal pada produk obat sangat penting. Metode penetapan kadar asetosal yang dikembangkan harus memenuhi parameter validitas suatu metode analisis dan terverifikasi. Metode penetapan kadar asetosal yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri UV. Metode spektrofotometri UV merupakan metode yang memiliki tingkat kesulitan yang rendah, cepat, selektif, sensitif dan murah. Berdasarkan hasil uji parameter validasi, nilai *LoD* (*Limit of Detection*), *LoQ* (*Limit of Quantification*), presisi, akurasi dan estimasi ketidakpastian pengukuran termasuk dalam kategori baik, dengan nilai secara berurutan adalah 0,9967; 0,0664 mg/L; 2,2131 mg/L, 3,7856 %; 93,88% dan  $\pm 0,3163$ g/mL.

**Kata kunci:** asetosal, spektrofotometri, UV, verifikasi

#### Abstract

Acetosal is a drug that works as an analgesic, antipyretic and anti-inflammatory that is often used by the public. The use of acetosal in high doses can cause indication and negative effects to the body so that the quality control concerning the content of acetosal on medicinal products is important. Determination methods of acetosal which developed must appropriate to the validity parameters of a analysis method and verified. Determination method of acetosal which used in this research is UV spectrophotometric method. UV-spectrophotometric method is a method that has a low level of difficulty, rapid, selective, sensitive and inexpensive. Based on the test results of the validation parameter, value of *LoD* (*Limit of Detection*), *LoQ* (*Limit of Quantification*), precision, accuracy and uncertainty estimation are included in the good category, the value is 0.9967; 0.0664 mg/L; 2.2131 mg/L, 3.7856%; 93.88% and  $\pm 0.3163$  g/mL, respectively.

**Keywords:** acetosal, spectrophotometry, UV, verification

#### PENDAHULUAN

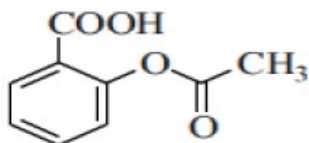
Asetosal atau asam asetil salisilat merupakan jenis obat turunan salisilat. Nama sistematis IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) asetosal

adalah asam 2-asetilbenzoat asam asetat. Struktur kimia senyawa asetosal ditunjukkan pada Gambar 1. Asetosal memiliki rumus molekul  $C_9H_8O_4$  dengan berat molekul 180,16 g/mol, kelarutan dalam air 3 mg/mL

Jurnal Sains dan Teknologi | 31

(20°C) titik leleh 135°C merupakan kristal dengan pemerian serbuk berwarna putih, tidak memiliki bau yang kuat.

Asetosal yang sering dikenal sebagai aspirin digunakan oleh masyarakat luas sebagai analgesik atau penahan rasa sakit atau nyeri minor, antipiterik (penurun demam) dan anti-inflamasi (peradangan). Penggunaan aspirin dalam dosis yang terlalu tinggi dapat menyebabkan beberapa indikasi dan dampak negatif seperti iritasi lambung, perdarahan, perforasi atau kebocoran lambung serta menghambat aktivitas trombosit. Penentuan kadar asetosal dalam sediaan obat menjadi sangat penting untuk uji kualitas produk sebelum dan selama proses produksi maupun setelah menjadi produk akhir.



Gambar 1. Struktur molekul asetosal

Pengawasan mutu yang menyangkut kandungan asetosal pada produk obat harus ditingkatkan dengan mengembangkan metode penetapan kadar yang dapat memenuhi parameter validitas suatu metode analisis. Di samping hal tersebut penting mengembangkan metode yang memiliki tingkat kesulitan yang rendah, cepat, dan membutuhkan biaya yang lebih sedikit.

Beragam metode analisis kuantitatif telah banyak dikembangkan untuk penetapan kadar asetosal dan metabolitnya dalam sediaan obat. Penentuan asetosal dalam sampel obat dengan metode spektrofotometri dan kromatografi (Bharate dan Bharate, 2012); spektrofotometri UV (Mishra dan Archana, 2006), (Gujarathi, 2010) dan (Murtaza dkk., 2011); kromatografi cair (Martos dkk., 2001); spektrofotometri (Martos dkk., 2001); kromatografi cair kinerja tinggi (Cemal dkk., 2008) dan spektrofotometri raman (Szostak & Mazurek, 2002). Metode spektrofotometri UV dinilai

sebagai metode yang memiliki tingkat kesulitan rendah, cepat, selektif, sensitif dan murah. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan verifikasi metode penentuan asetosal dalam sediaan obat, dalam hal ini obat sakit kepala dengan metode spektrofotometri UV.

Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh validitas metode analisis untuk penentuan kadar asetosal dalam obat sakit kepala secara spektrofotometri uv dengan parameter uji meliputi linearitas, presisi, akurasi, *LoD*, *LoQ* dan nilai ketidakpastian pengukuran. Hasil yang diharapkan adalah tersedianya data evaluasi kinerja metode spektrofotometri UV dalam penentuan kadar asetosal dalam obat sakit kepala, menjamin linearitas, akurasi, presisi, *LoD* dan *LoQ* dari hasil prosedur analisis dan mengurangi resiko penyimpangan.

## METODE

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik merek OHAUS, pipet volume 1 dan 10 mL; labu ukur 10, 50, 100 dan 250 mL; gelas arloji, spatula, pipet tetes, gelas beker 100 dan 250 mL, pengaduk gelas, pengaduk magnet dan spektrofotometer UV-Vis *double beam* HITACHI UH5300. Sementara bahan yang digunakan meliputi aspirin murni (99,91%), HCl pekat (37%), metanol p.a. produksi Merck, akuades dari Laboratorium Kimia Terapan, kertas whatmann 42, kertas seka dan tisu.

### Pembuatan larutan induk asetosal 100 µg/mL

Sebanyak 10 mg asetosal ditimbang dengan teliti kemudian ditambahkan larutan HCl 0,1 N : metanol (1:1) sebanyak 50 mL dalam gelas beker. Asetosal dan pelarut kemudian diaduk dengan pengaduk magnet hingga larut sempurna. Larutan yang dihasilkan setelah itu dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah HCl 0,1 N : metanol (1:1) sampai tanda batas. Larutan digojog hingga homogen, sehingga

diperoleh larutan induk asetosal dengan konsentrasi 100 mg/L.

#### **Pembuatan larutan standar asetosal**

Larutan standar asetosal dibuat dengan variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/L yaitu dengan memipet larutan induk asetosal 100 mg/L secara berurutan sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL. Masing-masing larutan induk asetosal hasil pipipetan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditera sampai tanda batas dengan menggunakan pelarut HCl 0,1 N : metanol (1:1). Bagian atas labu diseka, kemudian dilakukan penggojogan sampai homogen.

#### **Preparasi sampel**

Sejumlah 50 mg sampel obat sakit kepala dimasukkan dalam gelas beker ukuran 100 mL. Selanjutnya ditambah pelarut HCl 0,1 N : metanol (1:1) sebanyak 50 mL dan diaduk menggunakan pengaduk magnet hingga larut sempurna. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 50 mL dan ditera dengan pelarut HCl 0,1 N : metanol (1:1) sampai batas. Bagian atas labu ukur diseka, kemudian dilakukan penggojogan hingga homogen. Tahap selanjutnya adalah penyaringan dengan kertas saring whatman 42. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, ke dalam labu ukur tersebut ditambah pelarut HCl 0,1 N : metanol (1:1) sampai tanda batas. Ujung labu ukur diseka, dilanjutkan dengan penggojogan hingga homogen.

#### **Verifikasi metode analisis**

Tahap verifikasi metode meliputi penentuan panjang gelombang optimum, linearitas,  $LoD$ ,  $LoQ$ , presisi dan akurasi. Penentuan panjang gelombang optimum dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan standar dengan konsentrasi 6 mg/L pada panjang gelombang 200-400 nm dengan interval pengukuran 2 nm. Penentuan linearitas dilakukan dengan melakukan pengukuran absorbansi deret

kurva standar pada panjang gelombang optimum asetosal yang diperoleh. Kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan sumbu x adalah variasi konsentrasi larutan standar yaitu 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/L serta sumbu y adalah respon absorbansi sampel pada variasi konsentrasi. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan duplo. Penentuan presisi dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel pada panjang gelombang optimum sebanyak lima kali pengulangan. Larutan sampel yang akan diukur absorbansinya diencerkan terlebih dahulu. Faktor pengenceran sebesar lima puluh kali. Penentuan akurasi dilakukan dengan mengukur absorbansi standar asetosal 6 mg/L pada panjang gelombang optimum dengan enam kali pengulangan. Penentuan konsentrasi (x) untuk setiap pengukuran diperoleh dengan cara menghitung nilai x yang diperoleh pada persamaan regresi linear kurva standar yang diperoleh, di mana y adalah nilai absorbansi larutan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan Panjang Gelombang Optimum Asetosal**

Penentuan panjang gelombang optimum sangat berpengaruh dalam analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometer karena perubahan konsentrasi yang kecil dapat menyebabkan perubahan absorbansi yang besar. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar asetosal 6 mg/L disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2 panjang gelombang optimum asetosal sebesar 237 nm. Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil yang diperoleh (Gujarathi, 2010) yang menyatakan bahwa panjang gelombang maksimum asetosal 232,98 nm.

Selain puncak optimum untuk asetosal ternyata muncul puncak dari dianion salisilat yaitu pada panjang gelombang 304 nm. Hasil tersebut memberikan informasi bahwa terjadinya hidrolisis asetosal menjadi dianion salisilat. Hidrolisis tersebut dapat terjadi karena standar asetosal yang digunakan, mengalami hidrolisis parsial akibat kelembaban yang berlangsung selama proses penyimpanan.

## **PERCOBAAN IV**

### **PENETAPAN KADAR METODE SPEKTROFOTOMETRI**

#### **PENDAHULUAN**

Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Peralatan yang digunakan dalam spektrofotometri disebut spektrofotometer. Cahaya yang dimaksud dapat berupa cahaya visibel, UV dan inframerah, sedangkan materi dapat berupa atom dan molekul namun yang lebih berperan adalah elektron valensi. Sinar atau cahaya yang berasal dari sumber tertentu disebut juga sebagai radiasi elektromagnetik. Radiasi elektromagnetik yang dijumpai dalam kehidupan sehari-hari adalah cahaya matahari. Spektrofotometer UV-Vis (Ultra Violet-Visible) adalah salah satu instrumen yang biasa digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer umum digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa begitu banyak senyawa kimia, serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel .

Sesuai dengan namanya spektrofotometer UV-Vis merupakan gabungan antara spektrofotometer UV dan Visible. Pada spektrofotometer UV-Vis menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda yakni sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Spektrofotometer UV-Vis merupakan spektrofotometer berkas ganda sedangkan pada spektrofotometer VIS ataupun UV termasuk spektrofotometer berkas tunggal. Pada spektrofotometer berkas ganda blanko dan sampel dimasukan atau disinari secara bersamaan, sedangkan spektrofotometer berkas tunggal blanko dimasukan atau disinari secara terpisah. Kini spektrofotometer yang digunakan hanya menggunakan satu lampu sebagai sumber cahaya. Lampu yang digunakan sebagai sumber cahaya yaitu photodiode yang telah dilengkapi monokromator. Monokromator disini berfungsi untuk mengubah cahaya yang berasal dari sumber cahaya sehingga diperoleh cahaya hanya dengan satu jenis panjang gelombang.

Pengukuran menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis ini didasarkan pada hubungan antara berkas radiasi elektromagnetik yang ditransmisikan (diteruskan) atau yang diabsorpsi dengan tebalnya cuplikan dan konsentrasi dari komponen penyerap. Berdasarkan hal ini maka untuk dapat mengetahui konsentrasi sampel berdasarkan data serapan (A) sampel, perlu dibuat suatu

kurva kalibrasi yang menyatakan hubungan antara berkas radiasi yang diabsorpsi (A) dengan konsentrasi (C) dari serangkaian zat standar yang telah diketahui.

## **TUJUAN**

- Dapat mengoperasikan alat Spektrofotometer UV / VIS
- Dapat menetapkan kadar [Paracetamol] dengan metode Spektrofotometri UV / VIS

## **CARA KERJA**

### **Persiapan Larutan Standar Paracetamol**

1. Dibuat larutan standar induk paracetamol 1000 ppm
2. Dibuat deret standar 1,3,5,7 ppm dalam labu 25 mL

### **Persiapan Sampel**

1. Ditimbang 5 tablet paracetamol, dihitung berat rata-rata tablet dan gerus hingga halus.
2. Ditimbang tablet yang telah dihaluskan 300-500 mg x berat rata-rata tablet, dan larutkan dalam methanol air (3:1) dalam labu ukur 100 mL dengan bantuan ultrasonic, kemudian ditanda bataskan.
3. Dipipet 1 mL larutan sampel paracetamol diencerkan dalam labu ukur dengan methanol air (3:1)
4. Saring menggunakan kertas saring khusus

# Determination of Paracetamol and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Mixture Using HPLC and GC-MS

Tarek Belal<sup>1</sup>, Tamer Awad<sup>2</sup>, and C. Randall Clark<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Alexandria University, Alexandria 21521, Egypt and <sup>2</sup>Department of Pharmacal Sciences, Harrison School of Pharmacy, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA

## Abstract

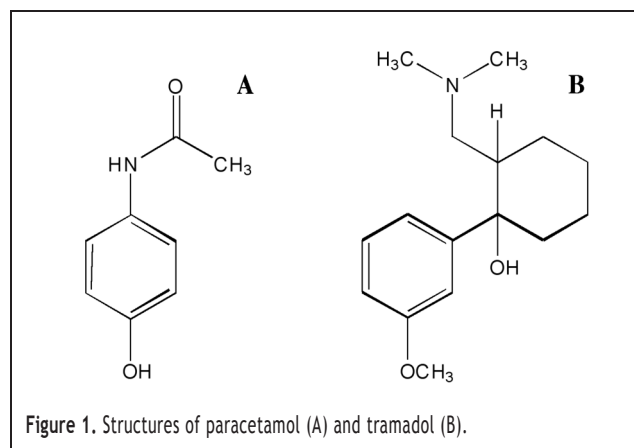
Two simple, rapid, and selective analytical procedures were developed for the simultaneous determination of paracetamol (PR) and tramadol hydrochloride (TR) in a binary mixture using high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) and gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) techniques. HPLC resolved the two compounds on a Hypurity Advance column using a mobile phase consisting of phosphate buffer pH 6.3 and acetonitrile (90:10, v/v). PR and TR were detected by their UV absorption at 220 nm. GC-MS involved separation of the two compounds using 100% dimethylpolysiloxane (Rtx-1) column with temperature programming. The EI mass spectrum of PR was characterized by  $[M]^+$  at 151 and a base peak at  $m/z$  109 while TR mass spectrum was characterized by  $[M]^+$  at 263 and a base peak at  $m/z$  58. Quantification of the analytes in both methods was based on measuring the peak areas. The reliability and analytical performance of the proposed methods including linearity, ranges, precision, accuracy, detection, and quantification limits were statistically validated. Calibration curves were linear over the range 10–400  $\mu\text{g/mL}$  for both PR and TR using the HPLC method and over the ranges of 75–500 and 25–350  $\mu\text{g/mL}$  for PR and TR, respectively, using the GC-MS method. The proposed methods were successfully applied for the determination of the two compounds in laboratory-prepared mixtures and in commercially available tablet formulation. No interference peaks were observed from common pharmaceutical adjuvants. The results compared favorably with those obtained by a derivative spectrophotometric method.

## Introduction

Paracetamol (PR) or acetaminophen, *N*-(4-hydroxyphenyl)-acetamide, is one of the most popular and widely used drugs for the treatment of pain and fever. It occupies a unique position among analgesic drugs. According to a recent update of the American College of Rheumatology (ACR) guidelines for osteoarthritis, PR remains a first-line therapy because of its cost, efficacy, and safety profiles (1). Unlike non-steroidal anti-inflammatory drugs, it is considered to have no anti-inflammatory

activity and does not produce gastrointestinal damage (1,2). Unlike opiates it is almost ineffective in intense pain and has no depressant effect on respiration (1,2). The major advantage of PR lies in its relative lack of serious side effects (1,2). Although PR has been used clinically for more than a century, its mode of action has been a mystery until recently when it was discovered that the analgesic effect of PR is due to the indirect activation on cannabinoid CB1 receptors (1,2). Tramadol hydrochloride (TR), (1*R,S*,2*R,S*)-2-[(Dimethyl-amino)methyl]-1-(3-methoxy-phenyl) cyclohexanol hydrochloride, is a centrally acting analgesic consisting of two enantiomers, both of which contribute to the analgesic activity via different mechanisms (3). (+)-Tramadol is an agonist of the  $\mu$ -opioid receptor, and it inhibits serotonin reuptake whereas (–)-tramadol inhibits norepinephrine reuptake, enhancing inhibitory effects on pain transmission in the spinal cord (3). TR is an effective and well-tolerated agent that reduces pain resulting from trauma, renal or biliary colic, and labor, and also for the management of chronic pain of malignant or nonmalignant origin, particularly neuropathic pain (3). TR appears to produce less constipation and dependence than equi-analgesic doses of strong opioids (3). The analgesic efficacy of tramadol can further be improved by combination with a non-opioid analgesic (3). Structures of PR and TR are shown in Figure 1.

The United States Pharmacopeia suggests a spectrophotometric  $A_{\text{max}}$  procedure for the analysis of PR powder and high-performance liquid chromatography (HPLC) for all its preparations (4). The British Pharmacopoeia shows various analytical procedures for the assay of PR in bulk powder and dosage



\* Author to whom correspondence should be sent: Email: clarkcr@auburn.edu.

forms including cerium sulphate titrimetry,  $A_{\max}$  spectrophotometry, and HPLC. For TR, potentiometric non-aqueous titration is applied for the assay of the bulk powder whereas HPLC is used for the capsules (5).

Several analytical procedures have been reported for the determination of the two compounds. Espinosa Bosch et al. (6) in

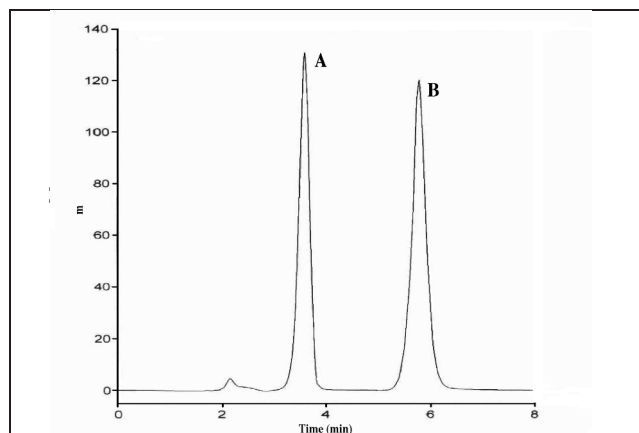


Figure 2. HPLC chromatogram of 20- $\mu$ L injection of mixture of 50  $\mu$ g/mL PR (A) and 100  $\mu$ g/mL TR (B).

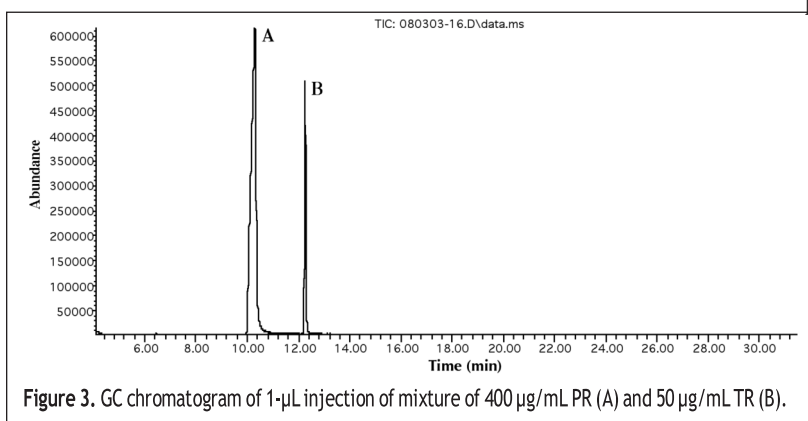


Figure 3. GC chromatogram of 1- $\mu$ L injection of mixture of 400  $\mu$ g/mL PR (A) and 50  $\mu$ g/mL TR (B).

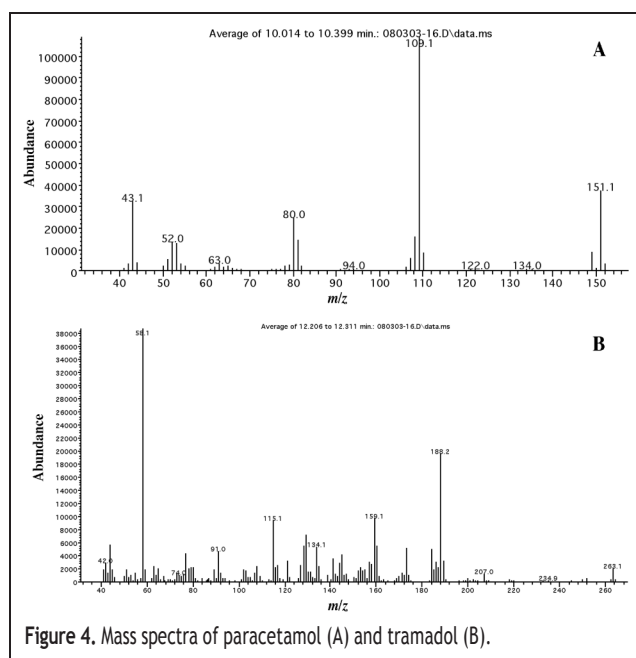


Figure 4. Mass spectra of paracetamol (A) and tramadol (B).

their review article demonstrated over 300 reports of different optical, electrochemical, and chromatographic techniques used for quantification of PR in pharmaceutical formulations and biological samples in the last four decades. TR was determined in different matrices using a variety of analytical techniques including HPLC (7,8), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) (9,10), thin layer chromatography (TLC)-densitometry (11), capillary electrophoresis (12,13), adsorptive stripping voltammetry (14), square-wave voltammetry and flow injection analysis system with amperometric detection (15), selective PVC membrane electrodes (16), spectrofluorimetry (17), and spectrophotometry (17,18).

The simultaneous determination of the two drugs has been reported in a few publications. They were estimated in human plasma samples using liquid chromatography (LC)-MS (19,20).

In tablets, they were determined using spectrophotometric (21,22) and reverse-phase HPLC methods using  $C_{18}$  columns (23-25). No attempts have yet been made to determine this drug mixture by GC. In the present work, two chromatographic procedures are proposed and validated for the simultaneous determination of PR and TR in their bulk form and in tablet form. The HPLC method involved the use of different stationary phase other than the traditional  $C_{18}$  column and a different mobile phase composition. The second method involved the application of GC-MS.

## Experimental

### Instrumentation

The HPLC system comprised of an LC-10AS Shimadzu liquid chromatograph (Kyoto, Japan) with SIL-10A auto-injector and SPD-10AV UV-visible detector. EZstart 7.4 chromatography software (Shimadzu) was used for processing of data and peaks integration. The column used was Hypurity Advance column (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm i.d., Thermo-Hypersil Keystone, Bellefonte, PA). The flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 20  $\mu$ L. The detector was set at  $\lambda = 220$  nm, and all determinations were performed at room temperature.

The GC-MS study was conducted using an Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 7890A gas chromatograph and an Agilent 7683B auto injector coupled with a 5975C VL Agilent mass selective detector. The injection volume was 1  $\mu$ L, and the mass spectral scan rate was 2.86 scans per second. The GC was operated in splitless mode with a carrier gas (helium grade 5), flow rate at 0.7 mL/min, and a column head pressure of 10 psi. The mass spectrometer was operated on the electron impact (EI) mode using an ionization voltage of 70 eV and a source temperature of 230°C. The GC injector was maintained at 250°C and the transfer line at 280°C. The temperature program used consisted of an initial temperature hold at 70°C for 1 min, ramped up to 250°C at a rate of 30°C/min followed by a hold at 250°C for 20 min. The mass spectra reported were obtained by background subtraction and are the average of at least five scans. The chromatographic separations (and collection of retention data) were carried out on



a 30 m × 0.25 mm-i.d. column coated with 0.25 μm 100% dimethyl polysiloxane (Rtx-1) purchased from Restek Corporation (Bellefonte, PA).

### Drugs and reagents

PR (minimum 99.0%) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and TR hydrochloride (≥ 99.0%, HPLC-grade) (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland) were used in the study. Tramol-Plus tablets (Zypher, Laborate Pharmaceuticals India Ltd, India, B.N. ZPTPT 702) labeled to contain 50 mg TR and 325 mg PR per tablets were purchased from a local commercial source. HPLC-grade solvents including methanol and acetonitrile (Fisher Scientific, Fair

Lawn, NJ), HPLC-grade *o*-phosphoric acid 85% (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), and high purity distilled water were used in the study.

### General procedures

#### HPLC

Phosphate buffer was prepared by mixing aqueous 0.05 M phosphoric acid solution with 0.2 M sodium hydroxide solution to reach pH 6.3. The mobile phase was prepared by mixing phosphate buffer pH 6.3 and acetonitrile in the ratio of 90:10 (v/v), then it was filtered and degassed.

PR and TR stock solutions (500 μg/mL) were prepared in methanol. The working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with the mobile phase to reach a concentration range 10–400 μg/mL for both PR and TR. Injections were made for each concentration and chromatographed under the previously described LC conditions.

#### GC-MS

PR and TR stock solutions (1000 μg/mL) were prepared in methanol. The working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with methanol to reach concentration ranges 75–500 and 25–350 μg/mL for PR and TR, respectively. Injections were made for each concentration and chromatographed under the previously described GC conditions.

The peak areas obtained from both HPLC and GC methods were plotted against the corresponding concentrations to obtain the calibration graphs.

#### Assay of tablets

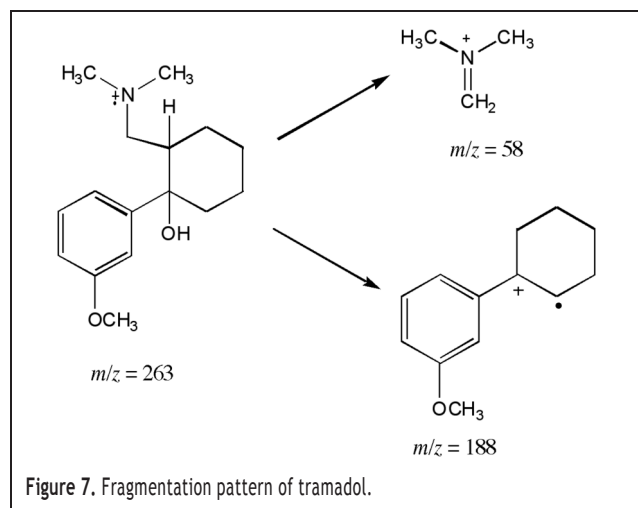
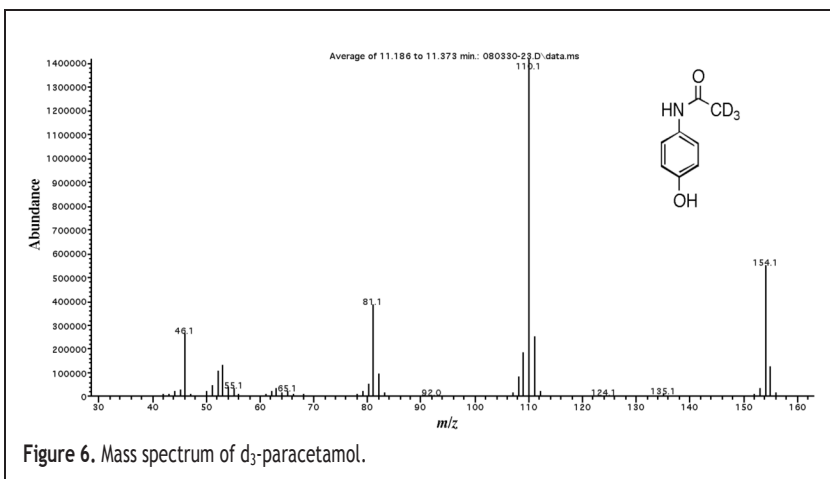
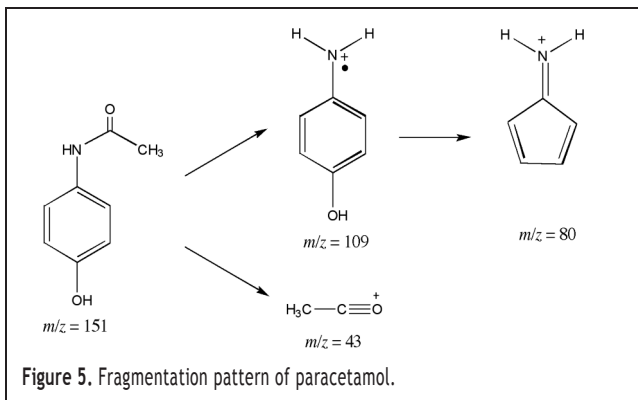
A total of 10 tablets were weighed and finely powdered. Methanol (60 mL) was added to a quantity of the powdered tablets equivalent to 260 mg PR and 40 mg TR, stirred for 10 min, then filtered into a 100-mL calibrated flask. The residue was washed with 2 × 10 mL methanol, and washings were added to the filtrate and diluted to final volume with methanol. Aliquots of the tablet solution (prepared in methanol) were diluted with either the HPLC mobile phase (for HPLC measurement) or methanol (for GC measurement) to

obtain final concentrations within the previously mentioned ranges and then treated as under the procedures for HPLC and GC-MS methods.

## Results and Discussion

### HPLC

A liquid chromatography method coupled with UV detection was developed to provide a suitable procedure for the rapid and reliable quality control analysis of PR and TR in their combined pharmaceutical preparation. Several reverse-phase stationary phases were tried including C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, and phenylhexyl columns. Although these columns gave satisfactory resolution of the two analytes, PR eluted at the void volume, regardless of the composi-



tion of the mobile phases. This can be attributed to the weak retention of the relatively polar PR on these non-polar stationary phases. The Hypurity advance column with its embedded polar character, which contains a polar amide group embedded within a C<sub>8</sub> chain, gave better retention for PR with good resolution of the two analytes. Consequently, it became the column of choice for this study.

Several mobile phases were tried using various proportions of several solvents and buffers at different pH values. The best resolution and analysis time was obtained through isocratic elution using a mobile phase consisting of 10% (by volume) acetonitrile in phosphate buffer pH 6.3 (Figure 2). Methanol produced broad asymmetric peak with TR, hence it was not used as a component of the mobile phase. Buffer pH was evaluated in the range from 2.0 to 7.0, and best resolution and peak shapes were achieved at pH ranging from 6.0 to 6.5. Lower acidic pH values led to weak resolution whereas increasing pH to more than 6.5 resulted in tailing and decrease in the sharpness of the peaks. Quantification was made with UV detection based on measuring the peak area. The UV detector was set at 220 nm, which was found to be optimum in measuring the two analytes.

The previously described chromatographic conditions showed symmetric peaks and adequate resolution ( $R_s = 4.67$ ) between PR ( $t_R = 3.65 \pm 0.026$  min) and TR ( $t_R = 5.81 \pm 0.043$  min) as shown in Figure 2. The capacity factors ( $k'$ ) were found to be equal to 0.68 and 1.70 for PR and TR, respectively, and the selectivity ( $\alpha$ ) was 2.50.

### GC-MS

The second part of this study involved the determination of PR and TR in a binary mixture using GC-MS. Previous studies have shown the GC-MS determination of PR and TR individually in different matrices (9,10,26). However, the simultaneous determination of these two analytes in pharmaceutical binary mixture using GC-MS has not been previously reported. The primary goal of this part of the study is to provide a direct, fast, and reliable method for such determinations. In this regard, some non-

polar capillary GC columns were evaluated in an effort to find the appropriate stationary phase providing the optimum separation. The 100% dimethyl polysiloxane (Rtx-1) column gave better peak shapes and resolution of the two analytes within shorter analysis time compared to other non-polar columns, such as the 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane (Rtx-5) and the 50% phenyl-50% methyl polysiloxane (Rxi-50) columns. Also, several temperature programs were evaluated, and a program showing the best resolution in a reasonable analysis time was selected. Programs with higher initial temperatures or higher ramp rates led to poor resolution whereas lower temperature ramps resulted in longer retention times and excessive peak tailing. PR eluted first ( $t_R = 10.19 \pm 0.077$  min) followed by TR ( $t_R = 12.27 \pm 0.022$  min), and the resolution ( $R_s$ ) was found to be 7.12. An example chromatogram is shown in Figure 3.

Mass spectrum of PR (Figure 4A) is characterized by a base peak at  $m/z$  109 formed by hydrogen transfer from the methyl group of the acetyl moiety to the ionized nitrogen followed by alpha cleavage. Subsequent rearrangement followed by the loss of the formaldehyde radical results in the formation of the more stable conjugated cyclopentadienylidene ammonium cation at  $m/z$  80. Ionization of the amide oxygen followed by alpha cleavage gave the CH<sub>3</sub>CO cation at  $m/z$  43. Structures of the PR fragment ions are shown in Figure 5. Further proof of the suggested pathways was possible after the preparation of d<sub>3</sub>-PR from condensation of 4-aminophenol and d<sub>6</sub>-acetic anhydride. The mass spectrum in Figure 6 shows the analogous peaks at  $m/z$  110, 81, and 46, respectively.

The mass spectrum of TR (Figure 4B) is characterized by ions at  $m/z$  58 (base peak),  $m/z$  188, and other ions of low relative abundance. Typical alpha cleavage between the tertiary amine and the cyclohexanol ring results in the imine ion at  $m/z$  58 (27). Ionization of the  $\pi$ -electron in the benzene ring followed by rearrangements by the loss of both the hydroxyl group and the tertiary amine radicals results in the formation of the methoxy phenyl cyclohexene at  $m/z$  188. Structures of the fragment ions of TR are shown in Figure 7.

**Table I. Analytical Parameters for the Determination of PR and TR Using the Proposed Chromatographic Methods**

Parameter	HPLC		GC-MS	
	PR	Tramadol	PR	Tramadol
Concentration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	10-400	10-400	75-500	25-350
Intercept (a)	$63.0 \times 10^3$	$36.5 \times 10^3$	$-17.4 \times 10^4$	$-10.9 \times 10^4$
Sa*	$98.1 \times 10^3$	$41.2 \times 10^3$	$16.6 \times 10^4$	$22.4 \times 10^4$
Slope (b)	36132	24096	25189	50843
Sb†	454	191	415	900
RSD% of the slope	1.26	0.79	1.65	1.77
Correlation coefficient (r)	0.99960	0.99984	0.99851	0.99900
F‡	6314	15845	1677	2581
Significance F	$59.8 \times 10^{-8}$	$60.0 \times 10^{-9}$	$16.4 \times 10^{-6}$	$55.9 \times 10^{-7}$
LOD§ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.64	1.36	20.00	6.00
LOQ** ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.13	4.53	66.70	20.00

\* Standard deviation of the intercept. † Standard deviation of the slope.

‡ F equals the mean of squares due to regression divided by the mean of squares about regression (due to residuals). § Limit of detection. \*\* Limit of quantification.

**Table II. Precision and Accuracy for the Determination of PR and TR Using the Proposed Chromatographic Methods**

Analyte	Nominal value ( $\mu\text{g/mL}$ )	Found $\pm$ SD* ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)†	Er(%)‡
<b>HPLC:</b>				
PR	50	$50.78 \pm 0.70$	1.38	1.56
	100	$99.62 \pm 1.12$	1.12	-0.38
	200	$201.46 \pm 1.78$	0.88	0.73
Tramadol	50	$50.05 \pm 0.60$	1.20	0.10
	100	$100.12 \pm 1.59$	1.59	0.12
	200	$199.58 \pm 2.30$	1.15	-0.21
<b>GC-MS:</b>				
PR	100	$101.25 \pm 1.54$	1.52	1.25
	200	$196.38 \pm 3.12$	1.59	-1.81
	300	$297.57 \pm 4.38$	1.47	-0.81
Tramadol	100	$99.56 \pm 1.56$	1.57	-0.44
	200	$197.02 \pm 2.58$	1.31	-1.49
	300	$294.75 \pm 4.38$	1.49	-1.75

\* Mean  $\pm$  standard deviation for five determinations.

† % Relative standard deviation. ‡ % Relative error.

## Analytical performance of the proposed methods

### Concentration ranges and calibration graphs

For both methods, the linearity of the detector response for the determination of PR and TR was evaluated by analyzing a series of different concentrations of each compound. Seven concentrations were chosen with triplicate injections for each concentration; this approach provided information on the variation in peak areas between samples of the same concentration. The linear regression equations were generated by least squares treatment of the calibration data. Table I presents the performance data and statistical parameters for the proposed methods including linear regression equations, concentration ranges, correlation coefficients, standard deviations of the intercept ( $S_a$ ), and the slope ( $S_b$ ). The analysis of variance (ANOVA) test for the regression lines reveals that for equal degrees of freedom, an increase in the variance ratio (F-values) means an increase in the mean of squares due to regression and decrease in the mean of squares due to residuals. The greater the mean of squares due to regression, the steeper the regression line. The smaller the mean of squares due to residuals, the less the scatter of experimental points around the regression line. Consequently, regression lines with high F values (low significance F) are much better than those with lower ones. Good regression lines show high values for both ( $r$ ) and ( $F$ ) statistical parameters (28).

### Detection and quantification limits

According to the U.S. Pharmacopeia recommendations (4), limit of detection is defined as the concentration that has a signal-to-noise ratio of 3:1 whereas for limit of quantification the ratio considered is 10:1. These values were calculated and presented in Table I.

### Precision and accuracy

The precision and accuracy for each method were examined at three concentration levels for the analyte by five replicate determinations for each concentration. The percentage relative standard deviation (RSD %) and the percentage relative error ( $E_r$  %) did not exceed 2%, proving the high repeatability and accuracy of the developed methods (Table II).

### Selectivity

The selectivity of the proposed methods was tested by preparing different mixtures of PR and TR within the concentration ranges mentioned in Table I. These mixtures were of different ratios both above and below the normal ratio expected in the tablets. The laboratory-prepared mixtures were analyzed according to the previously mentioned HPLC and GC procedures. The recovery values, RSD %, and  $E_r$  % shown in Tables III and IV were satisfactory, thus validating the selectivity, precision, and accuracy of the developed methods.

**Table III. Determination of PR and TR Laboratory-made Mixtures Using the Proposed HPLC Method**

Nominal value ( $\mu\text{g/mL}$ )		Found $\pm$ SD* ( $\mu\text{g/mL}$ )		RSD(%) <sup>†</sup>		Er(%) <sup>‡</sup>	
PR	TR	PR	TR	PR	TR	PR	TR
200	20	197.52 $\pm$ 1.98	20.55 $\pm$ 0.23	1.00	1.12	-1.24	2.75
200	25	198.40 $\pm$ 2.46	24.73 $\pm$ 0.27	1.24	1.09	-0.80	-1.08
200	40	198.54 $\pm$ 2.00	40.88 $\pm$ 0.55	1.01	1.35	-0.73	2.20
150	50	151.79 $\pm$ 1.91	49.81 $\pm$ 0.51	1.26	1.02	1.19	-0.38
100	50	98.42 $\pm$ 1.17	50.16 $\pm$ 0.74	1.19	1.48	-1.58	0.32
100	100	100.59 $\pm$ 1.55	101.29 $\pm$ 0.92	1.54	0.91	0.59	1.29
50	100	48.94 $\pm$ 0.50	100.98 $\pm$ 1.22	1.02	1.21	-2.12	0.98
50	150	48.33 $\pm$ 0.60	152.24 $\pm$ 1.44	1.24	0.95	-3.34	1.49

\* Mean  $\pm$  SD for 5 determinations.    <sup>†</sup> % Relative standard deviation.    <sup>‡</sup> % Relative error.

**Table IV. Determination of PR and TR Laboratory-made Mixtures Using the Proposed GC-MS Method**

Nominal value ( $\mu\text{g/mL}$ )		Found $\pm$ SD* ( $\mu\text{g/mL}$ )		RSD(%) <sup>†</sup>		Er(%) <sup>‡</sup>	
PR	TR	PR	TR	PR	TR	PR	TR
400	40	391.32 $\pm$ 3.52	40.61 $\pm$ 0.76	0.90	1.87	-2.17	1.53
400	50	403.04 $\pm$ 4.60	51.08 $\pm$ 1.09	1.14	2.13	0.76	2.16
250	50	255.10 $\pm$ 3.18	50.18 $\pm$ 0.90	1.25	1.79	2.04	0.36
300	100	292.41 $\pm$ 2.91	101.66 $\pm$ 0.97	1.00	0.95	-2.53	1.66
200	100	196.12 $\pm$ 3.12	97.89 $\pm$ 1.12	1.59	1.14	-1.94	-2.11
200	200	199.04 $\pm$ 3.54	201.06 $\pm$ 3.28	1.78	1.63	-0.48	0.53
100	200	102.00 $\pm$ 1.87	195.60 $\pm$ 1.94	1.83	0.99	2.00	-2.20
100	300	101.12 $\pm$ 1.68	304.65 $\pm$ 3.90	1.66	1.28	1.12	1.55

\* Mean  $\pm$  SD for 5 determinations.    <sup>†</sup> % Relative standard deviation.    <sup>‡</sup> % Relative error.

### Robustness

Robustness was examined by evaluating the influence of small variations in different experimental conditions such as working wavelength ( $\pm$  2 nm), mobile phase pH ( $\pm$  0.2 pH units), and organic strength ( $\pm$  5%) for the HPLC method and temperature program ramp ( $\pm$  2°C) for the GC-MS method. These variations did not have significant effect on the measured responses or the chromatographic resolution.

### Stability

The stability of the PR and TR methanolic working solutions (for GC) was tested, and they were found to be stable for at least four days at room temperature. Also, the stability of the working solutions in the mobile phase (for HPLC) was verified, and no chromatographic changes were observed within 24 h at room temperature.

### Analysis of pharmaceutical preparation

The developed chromatographic methods were applied for the assay of the two drugs in their combined pharmaceutical formulation (Tramol-Plus tablets). Table V shows the results obtained for the proposed methods as well as the reference derivative spectrophotometric method (21). The assay results showed good precision and accuracy as indicated from % recovery, SD, and RSD (%) values. No interfering peaks were observed in the HPLC or GC chromatograms of the tablets. Results obtained by the developed methods were statistically compared with those of the previously

**Table V. Application of the Proposed Chromatographic Methods in the Analysis of PR and TR Commercial Tablets**

PR	HPLC	GC-MS	Reference method	
% Recovery $\pm$ SD*	96.27 $\pm$ 1.02	96.59 $\pm$ 1.21	95.15 $\pm$ 1.17	
RSD(%)	1.06	1.25	1.23	
ANOVA				
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean of Squares	F†
Between Groups	5.682	2	2.841	2.198
Within Groups	15.510	12	1.293	
Total Variation	21.193	14		
TR	HPLC	GC-MS	Reference method	
% Recovery $\pm$ SD*	95.73 $\pm$ 0.95	95.37 $\pm$ 1.09	94.84 $\pm$ 1.01	
RSD(%)	0.99	1.14	1.07	
ANOVA				
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean of Squares	F†
Between Groups	1.998	2	0.999	0.965
Within Groups	12.428	12	1.036	
Total	14.427	14		

\* Mean  $\pm$  standard deviation for five determinations.

† The theoretical value for F equals 3.885 at P = 0.05.

published derivative spectrophotometric method using single factor analysis of variance (ANOVA) test (29), which is considered a useful statistical tool for comparison of recovery data obtained from more than two methods. The calculated F-values did not exceed the critical value for either of the two drugs, indicating no significant differences between the proposed methods together with the reference method.

## Conclusion

In this study, two simple, rapid, and selective chromatographic procedures were established for the simultaneous determination of PR and TR in laboratory-prepared mixtures as well as in commercially available tablets. The HPLC method made the use of an embedded amide reverse  $C_{18}$  stationary-phase with a low organic modifier content (10% acetonitrile) mobile phase. Additionally, the liquid chromatographic method reported here showed wider linearity ranges and better sensitivity compared to the previously published HPLC methods. The GC-MS method is direct, requiring minimal sample preparation and made use of the total ion current detection. Both methods need no derivatization or pretreatment of the target compounds. The described validated chromatographic methods offer selectivity advantage over the spectrophotometric-based non-separation methods. Finally, the proposed methods were found accurate and precise, thus making them convenient for quality control purposes.

## References

- B. Hinz and K. Brune. Antipyretic Analgesics: Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Selective COX-2 Inhibitors, Paracetamol and Pyrazolinones. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 177(Analgesia): 65-93 (2006).
- A. Bertolini, A. Ferrari, A. Ottani, S. Guerzoni, R. Tacchi, and S. Leone. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Reviews* 12(3-4): 250-275 (2006).
- S. Grond and A. Sablotzki. Clinical Pharmacology of Tramadol. *Clin.*

*Pharmacokinet.* 43(13): 879-923 (2004).

- The United States Pharmacopeia 30th edition, The National Formulary, 25th edition "The Official Compendia of Standards", United States Pharmacopeial Convention, Inc., Asian Edition, Washington, D.C. (2007).
- The British Pharmacopoeia, Volumes II and III, Her Majesty's Stationery Office, London, UK (2007).
- M. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, and C. Bosch Ojeda. Determination of paracetamol: Historical evolution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42: 291-321 (2006).
- W.F. Kartinasari, T. Palupi, and G. Indrayanto. HPLC determination and validation of tramadol hydrochloride in capsules. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27(4): 737-744 (2004).
- M.R. Rouini, Y.H. Ardakani, F. Soltani, H.Y. Aboul-Enein, and A. Foroumadi. Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous determination of tramadol, and its two main metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* 830(2): 207-211 (2006).
- K.A. Hadidi, J.K. Almasad, T. Al-Nsour, and S. Abu-Ragheib. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS. *Forensic Sci. Int.* 135: 129-136 (2003).
- Y.F. Sha, S. Shen, and G.L. Duan. Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 143-147 (2005).
- J. Krzek and M. Starek. Quality assessment for tramadol in pharmaceutical preparations with thin layer chromatography and densitometry. *Biomed. Chromatogr.* 18(8): 589-599 (2004).
- U.B. Soetebeer, M.O. Schierenberg, H. Schulz, G. Gruenefeld, P. Andresen, and G. Blaschke. Assay of tramadol in urine by capillary electrophoresis using laser-induced native fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 745(2): 271-278 (2000).
- J.G. Li and H.X. Ju. Simultaneous determination of ethamsylate, tramadol and lidocaine in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Electrophoresis* 27(17): 3467-3474 (2006).
- P. Norouzi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, and A.S.E. Meibodi. Application of Adsorptive Stripping Voltammetry for the Nano-Level Detection of Tramadol in Biological Fluids and Tablets Using Fast Fourier Transform Continuous Cyclic Voltammetry at an Au Microelectrode in a Flowing System. *Anal. Lett.* 40(11): 2252-2270 (2007).
- E.M.P.J. Garrido, J.M.P.J. Garrido, F. Borges, and C. Delerue-Matos. Development of electrochemical methods for determination of tramadol-analytical application to pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32(4-5): 975-981 (2003).
- H. Hopkala, G. Misztal, and A. Wiczorek. Tramadol selective PVC membrane electrodes and their analytical application. *Die Pharmazie* 53(12): 869-871 (1998).
- H.E. Abdellatef, M.M. El-Henawee, H.M. El-Sayed, and M.M. Ayad. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for analysis of tramadol, acebutolol and dothiepin in pharmaceutical preparations. *Spectrochim. Acta A* 65(5): 1087-1092 (2006).
- H.E. Abdellatef. Kinetic spectrophotometric determination of tramadol hydrochloride in pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29(5): 835-842 (2002).
- T. Zhu, L. Ding, X. Guo, L. Yang, and A. Wen. Simultaneous Determination of Tramadol and Acetaminophen in Human Plasma by LC-ESI-MS. *Chromatographia* 66: 171-178 (2007).
- Z. Tan, D. Ouyang, G. Zhou, L. Wang, Z. Li, D. Wang, G. Chen, S. Huang, Y. Liu, D. Hu, and H. Zhou. Determination of tramadol and paracetamol in human plasma by liquid chromatography ion trap mass spectrum. *Yaowu Fenxi Zazhi* 25(7): 795-798 (2005).
- K.K. Srinivasan, J. Alex, A.A. Shirwaikar, S. Jacob, M.R. Sunil Kumar, and S.L. Prabu. Simultaneous derivative spectrophotometric estimation of aceclofenac and tramadol with paracetamol in combination solid dosage forms. *Indian J. Pharm. Sci.* 69(4): 540-545 (2007).
- Y. Li, X. Wan, G. Wang, and J. Cui. Simultaneous determination of tramadol hydrochloride and paracetamol in their compound sustained release tablets by principal component regression spectrophotometry. *Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China)* 41(20): 1594-1595 (2006).
- X. Liu, J. Shi, Y. Liu, and Z. He. Simultaneous determination of contents of tramadol hydrochloride and paracetamol in their compound tablets by HPLC. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* 21(2): 111-113 (2004).
- L. Hong and J. Li. Determination of compound tramadol hydrochloride tablets and its related substances by HPLC. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 36(5): 293-295 (2005).
- D. Peng, K. Huang, Y. Liu, and M. Li. Simultaneous determination of two constituents in compound tramadol tablets by HPLC. *Zhongguo Xinyao Zazhi* 15(2): 120-122 (2006).
- D.J. Speed, S.J. Dickson, E.R. Cairns, and N.D. Kim. Analysis of paracetamol using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 25(3): 198-202 (2001).
- F.W. McLafferty, and F. Turecek. Interpretation of Mass Spectra, Fourth edition University Science Books, Sausalito, CA, (1993).
- P. Armitage, and G. Berry. *Statistical Methods in Medical Research*, Third Edition, Blackwell, Oxford, pp. 283-285 (1994).
- J.N. Miller, and J.C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Fourth Edition, p. 57-64, 77, 78 (2000).

Manuscript received May 1, 2008;

Revision received June 24, 2008.

## PERCOBAAN V

### KROMATOGRAFI KERTAS

#### PENDAHULUAN

**Kromatografi kertas** merupakan metode analitik yang digunakan untuk memisahkan bahan kimia berwarna, terutama pigmen. Ini juga dapat digunakan untuk memisahkan warna primer atau sekunder dalam tinta. Metode ini telah banyak digantikan dengan kromatografi lapisan tipis, tetapi masih tetap merupakan alat pembelajaran yang baik.

**Kromatografi kertas dua arah**, atau dikenal juga sebagai kromatografi dua dimensi, melibatkan penggunaan dua pelarut dan memutar posisi  $90^\circ$  pada saat penggantian pelarut. Metode ini berguna untuk pemisahan campuran senyawa yang kompleks dengan kepolaran yang hampir mirip. Contohnya adalah pemisahan asam amino. Jika menggunakan kertas saring, harus kertas saring dengan mutu terbaik. Fasa gerak adalah larutan pengembang yang dapat bergerak naik pada fasa diam sambil membawa sampel bersamanya.

#### Nilai $R_f$

Faktor retensi ( $R_f$ ) didefinisikan sebagai perbandingan jarak tempuh zat terhadap jarak tempuh pelarut. Nilai  $R_f$  biasanya dinyatakan dalam desimal, dengan dua angka di belakang koma. Jika nilai  $R_f$  suatu larutan adalah nol, solut tetap berada pada fasa diam dan oleh karenanya tidak bergerak. Jika nilai  $R_f = 1$  artinya solut tidak mempunyai afinitas terhadap fasa diam dan bergerak sesuai dengan gerakan pelarut hingga garis depan. Untuk menghitung nilai  $R_f$ , ukur jarak tempuh zat dibagi dengan jarak tempuh pelarut (seperti telah disebutkan sebelumnya). Sebagai contoh, jika zat bergerak sejauh 9,9 cm dan garis depan pelarut bergerak sejauh 12,7 cm, maka nilai faktor retensinya adalah  $9,9/12,7 = 0,779$  atau 0,78. Nilai  $R_f$  bergantung pada temperatur dan pelarut yang digunakan dalam percobaan, oleh karena itu, beberapa pelarut menghasilkan beberapa nilai  $R_f$  untuk campuran senyawa yang sama.

## Pigmen dan polaritas

Kromatografi kertas adalah salah satu metode identifikasi dan pengujian kemurnian suatu senyawa. Kromatografi kertas adalah teknik yang berguna karena relatif cepat dan hanya memerlukan sedikit bahan uji. Pemisahan dalam kromatografi kertas melibatkan prinsip yang sama seperti kromatografi lapisan tipis, mengingat ini adalah salah satu jenis kromatografi lapisan tipis. Dalam kromatografi kertas, bahan uji terdistribusi antara fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam biasanya adalah selebar kertas saring bermutu tinggi. Fasa gerak adalah larutan pengembang yang merambat naik pada fasa gerak, membawa sampel bersamanya. Komponen sampel akan terpisah bergantung pada kekuatan adsorbsinya pada fasa diam versus kelarutannya pada fasa gerak.

Ketika sampel bahan kimia berwarna ditotolkan pada kertas saring, pemisahan warna-warna dari sampel akan terjadi ketika ujung kertas dicelupkan ke dalam pelarut. Pelarut berdifusi menaiki kertas, melarutkan berbagai molekul dalam sampel sesuai polaritas molekul solut dan pelarut. Jika sampel mengandung lebih dari satu warna, artinya terdapat lebih dari satu macam molekul di dalamnya. Oleh karena perbedaan struktur kimia untuk masing-masing molekul, probabilitas perbedaan polaritas sekecil apapun pasti ada, yang akhirnya berujung pada perbedaan kelarutannya dalam pelarut. Ketidaksamaan kelarutan dalam pelarut dan afinitas adsorpsi pada fasa diam akan menghasilkan perbedaan letak noda masing-masing warna. Semakin tinggi kelarutan molekulnya, semakin jauh migrasinya pada kertas. Jika suatu bahan kimia bersifat sangat non-polar, ia tidak akan larut dalam pelarut yang sangat polar. Begitu pula sebaliknya untuk bahan kimia yang sangat polar dalam pelarut yang sangat non-polar.

Hal yang sangat penting untuk dicatat adalah ketika menggunakan air (suatu bahan yang sangat polar) sebagai pelarut, warna yang lebih polar akan berada pada posisi yang lebih tinggi pada kertas.

### ***Jenis-jenis kromatografi kertas***

- 1. Kromatografi kertas menurun**-Pada jenis ini, pengembangan kromatogram adalah menurun dengan membiarkan pelarut bergerak turun mengalir kertas.
- 2. Kromatografi kertas menanjak**-Di sini, pelarut bergerak mendaki kertas kromatografi. Baik kromatografi kertas menurun maupun menanjak digunakan untuk pemisahan bahan kimia organik dan anorganik.

**3. Kromatografi kertas naik-turun**-Merupakan gabungan kedua teknik di atas. Bagian atas kromatografi menanjak dapat dilipat pada sebuah rol di bagian atas bejana, dan aliran eluen akan menurun setelah melewati lipatan.

**4. Kromatografi kertas radial**-Disebut juga sebagai kromatografi sirkuler. Di sini, digunakan kertas saring berbentuk lingkaran, dan sampel ditotolkan di pusat kertas. Setelah noda mengering, kertas saring diletakkan horisontal di atas cawan petri yang berisi pelarut, sehingga sumbu kertas tercelup ke dalam pelarut. Pelarut mengalir naik melalui sumbu dan komponen terpisah dalam bentuk zona-zona melingkar.

**5. Kromatografi kertas dua dimensi**-Dalam teknik ini, digunakan kertas berbentuk bujur sangkar. Sampel ditotolkan di salah satu sudut dan dikembangkan dengan sudut yang tepat sesuai arah aliran yang diinginkan.

## **TUJUAN PERCOBAAN**

Untuk memperkenalkan mahasiswa agar mengetahui dasar pemisahan zat warna atau indikator yang warnanya berbeda, dengan kelarutan yang berbeda. Perbedaan kelarutan akan memperbesar daya pisahnya.

## **CARA KERJA**

1. Jenuhkan chamber dengan eluen

Fase gerak yang digunakan campuran isopropanol 30% dan air 70% buat sebanyak 150 ml dan tambah 0,1 ml NaOH 0,1 N

2. Buat potongan kertas dengan ukuran 10 x 20 cm (kertas whatman)

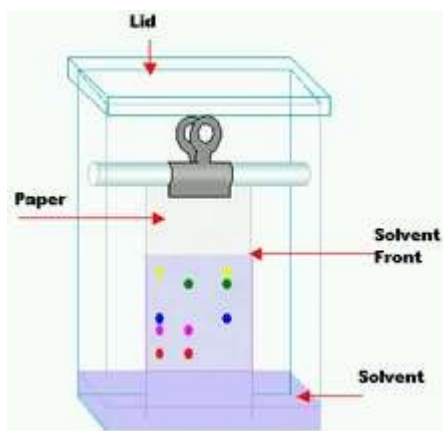
3. Beri garis melintang dengan pensil satu cm di atas ujung kertas yang digunakan tempat penotolan

4. Buat campuran indikator metil merah, metil kuning, dan biru metil masing-masing 1 ml, dimasukkan labu takar encerkan dengan etanol 96% ad 5 ml

5. Encerkan larutan indikator masing-masing seperti di atas, dalam labu takar 5 ml dan dengan etanol 96% sampai tanda

6. Encerkan larutan indikator masing-masing larutan no.3 dan 4 sebanyak 1 mikroliter pada potongan kertas saring

7. Keringkan di udara terbuka, kemudian lipat 1 cm kertas saring diujung lain cepit dengan klip atau jepitan kertas
8. Masukkan kertas saring sampai ujungnya terkena dasar chamber dan elusi 15 cm. Bila selesai keringkan larutan elusi dan ukur panjang migrasi masing sampel dan hitung Rf
9. Hitung daya pisah masing-masing sampel. Alternatif percobaan dapat digunakan campuran butanol air atau etanol air.





## **PERCOBAAN VI**

### **KROMATOGRAFI KOLOM**

#### **PENDAHULUAN**

**Kromatografi kolom** adalah metode yang digunakan untuk memurnikan bahan kimia tunggal dari campurannya. Metode ini sering digunakan untuk aplikasi preparasi pada skala mikrogram hingga kilogram. Keuntungan utama kromatografi kolom adalah biaya yang rendah dan kemudahan membuang fasa diam yang telah digunakan. Kemudahan pembuangan fasa diam ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi fasa diam akibat pemakaian ulang atau daur ulang.

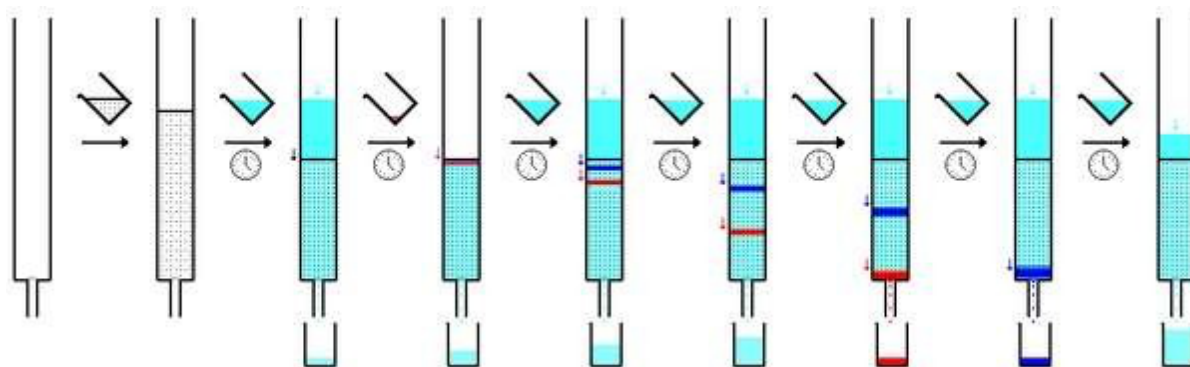
Kromatografi kolom preparatif klasik berupa tabung kaca dengan diameter antara 5 mm hingga 50 mm dengan panjang 5 cm hingga 1 m dengan keran dan pengisi (dengan sumbat kaca atau serat kaca – untuk mencegah hilangnya fasa diam) pada bagian bawah. Dua metode yang umum digunakan untuk preparasi kolom adalah: metode kering dan metode basah.

- a. Pada metode kering, kolom pertama kali diisi dengan serbuk kering fasa diam, kemudian kolom dialiri fasa gerak hingga seluruh kolom terbasahi. Mulai titik ini, fasa diam tidak diperkenankan mengering.
- b. Pada metode basah, fasa diam dibasahi dengan fasa gerak hingga menjadi bubur di luar kolom, dan kemudian dituangkan perlahan-lahan ke dalam kolom. Pencampuran dan penuangan harus ekstra hati-hati untuk mencegah munculnya gelembung udara. Larutan bahan organik diletakkan di bagian atas fasa diam menggunakan pipet. Lapisan ini biasanya ditutup dengan lapisan kecil pasir atau katun atau wol kaca untuk melindungi bentuk lapisan organik dari tuangan eluen. Eluen kemudian dialirkan perlahan melalui kolom sambil membawa sampel bahan organik. Sering kali, wadah eluen sferis atau corong pisah bersumbat yang sudah diisi eluen diletakkan di bagian atas kolom.

Komponen-komponen tunggal tertahan oleh fasa diam secara berbeda satu sama lain pada saat mereka bergerak bersama eluen dengan laju yang berbeda melalui kolom. Di akhir kolom, mereka terelusi satu per satu. Selama keseluruhan proses kromatografi, eluen dikumpulkan sesuai fraksi-fraksinya. Fraksi-fraksi dapat dikumpulkan secara otomatis oleh pengumpul fraksi. Produktivitas kromatografi dapat ditingkatkan dengan menjalankan beberapa kolom sekaligus.

Di sini, diperlukan pengumpul multi aliran. Komposisi aliran eluen dapat dimonitor dan masing-masing fraksi dianalisa senyawa terlarutnya, misalnya dengan kromatografi, absorpsi sinar UV atau fluoresensi. Senyawa berwarna (atau senyawa berfluoresensi di bawah lampu UV) dapat terlihat di dalam kolom sebagai pita-pita bergerak.

### **Fasa diam**



Tahapan pengerjaan kromatografi kolom

*Fasa diam* atau *adsorben* (penjerap) dalam kromatografi kolom adalah zat padat. Fasa diam yang paling umum untuk kromatografi kolom adalah silika gel, diikuti dengan alumina. Serbuk selulosa pernah banyak digunakan. Kromatografi kolom memungkinkan melakukan teknik kromatografi pertukaran ion, kromatografi fasa terbalik, kromatografi afinitas, atau penjerapan bed ekspansi (bahasa Inggris: *expanded bed adsorption, EBA*). Fasa diam biasanya serbuk halus atau gel dan/atau mikropori untuk peningkatan permukaan, meskipun dalam EBA digunakan bed berfulida. Ada rasio penting antara berat fasa diam dan berat kering campuran analit yang dapat diaplikasikan ke dalam kolom. Untuk kolom silika, rasio berada antara 20:1 hingga 100:1, bergantung pada kedekatan jarak elusi antar komponen analit.

### **Fasa gerak (eluen)**

*Fasa gerak* atau *eluen* dapat berupa pelarut murni atau campuran pelarut. Pemilihan dilakukan sedemikian rupa sehingga nilai faktor retensi senyawa yang diinginkan berada pada kisaran 0,2 - 0,3 untuk meminimalkan waktu dan jumlah eluen yang diperlukan selama kromatografi. Eluen dapat pula dipilih berdasarkan daya pisahnya sehingga senyawa yang berbeda dapat dipisahkan secara efektif. Optimasi eluen dilakukan melalui uji pendahuluan berskala kecil, biasanya menggunakan kromatografi lapisan tipis (KLT) dengan fasa gerak yang sama.

Ada laju aliran optimum untuk masing-masing pemisahan. Semakin cepat laju aliran eluen akan meminimalkan waktu yang dibutuhkan untuk melalui kolom sehingga meminimalkan difusi, menghasilkan pemisahan yang lebih baik. Namun, laju aliran maksimum perlu dibatasi karena analit memerlukan waktu tertentu untuk berada pada kesetimbangan antara fasa diam-fasa gerak, lihat persamaan Van Deemter. Kolom laboratorium sederhana bekerja dengan prinsip aliran gravitasi. Laju aliran kolom semacam ini dapat dinaikkan dengan menambah eluen baru di bagian atas fasa diam, atau diturunkan dengan mengatur keran di bagian bawah. Laju aliran yang lebih cepat dapat diperoleh dengan menggunakan pompa atau gas bertekanan (misalnya: udara, nitrogen, atau argon) untuk menekan pelarut melalui kolom (kromatografi kolom kilat).

Ukuran partikel fasa diam pada kromatografi kolom kilat biasanya lebih halus daripada kromatografi kolom gravitasi. Misalnya, silika gel untuk kromatografi kilat berukuran antara 230 - 400 mesh (40 - 63  $\mu\text{m}$ ), sementara untuk kromatografi gravitasi antara 70 - 230 mesh (63 - 200  $\mu\text{m}$ ).

Telah dikembangkan lembar lajur (*spreadsheet*) yang mendukung suksesnya pengembangan kolom kilat. Lembar lajur memperkirakan volume retensi dan pita volume analit, jumlah fraksi yang diperkirakan untuk masing-masing kandungan analit, dan resolusi antara dua puncak yang berdekatan. Informasi ini memungkinkan pengguna memilih parameter optimal untuk pemisahan berskala preparatif sebelum dicobakan pada kolom kilat

## CARA KERJA

### Membuat Larutan Sampel

1. Buat larutan sampel metil merah dan rodamin 5% masing-masing dalam etanol sebanyak 10 ml (wadah berbeda)
2. Ambil masing-masing 2 ml, masukkan dalam labu takar 5 ml, kemudian encerkan air suling sampai tepat 5 ml
3. Buat larutan yang sama dari metilen biru dan biru bromtimol dengan cara yang sama dengan butir a dan b. Ambil masing-masing sampel 0,5 ml encerkan ad 10 ml, kemudian cari lambda serapan maksimumnya
4. Buat campuran eluen (fase gerak) propanol 30% dalam air suling sebanyak 150 ml tambahkan 5 ml HCL 0,1 N

Cara Merakit dan Menggunakan:

1. Masukkan kolom bagian atas ke kolom bagian bawah, dan kolom atas diberi kertas saring yang diameternya tepat sebesar diameter kolom bagian dalam sampai sekat porus jangan ada yang melipat
2. Slang karet dihubungkan ke pompa dan kran 2 ditutup sedang kran 1 dibuka.
3. Tuangkan fase diam alumina atau silikagel (for colomn chromatography) dengan ukuran 80-120 mesh yang telah dikeringakan dioven 120C selama 30-60 menit dan dinginkan
4. Bila perlu dengan bantuan corong, pompa dihidupkan agar fase diam menjadi lebih rapat terhisap di bawah
5. Fase diam yang digunakan lebih kurang 20 gram, penghisapan dilanjutkan selama 10 menit lagi baru bagian atas fase diam ditutup dengan kertas saring dengan diameter yang sama
6. Eluen dituang lewat dinding kolom sambil dihampakan agar turun dengan cepat. Bila tinggi fase gerak(eluen) sudah sama tingginya dengan fase diam penghampaan dihentikan, dankran kran 1 ditutup, kran 2 dibuka pelan, agar permukaan fase gerak turun 0,5 cm di bawah kertas saring bagian atas
7. Kran 2 ditutup dan campuran sampel yang dipisahkan sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam kolom dengan pipet volume sampai tepat menyinggug kertas saring, biarkan sebentar agar cairan sampel habis dari pipet.
8. Turunkan permukaan sampel sampai 0,5 cm di bawah kertas saring dengan membuka kran 2 pelan-pelan
9. Kran 2 ditutup, kran 1 dibuka, ditambah eluen 25 sampai 50 ml kemudian pompa dihidupkan, cairan fase diam akan menetes di bagian kolom bawah secara bertahap, bila telah mencapai lebih kurang 5 ml, pompa dihentikan dan cairan dikeluarkan ditampung dengan flakon
10. Pekerjaan dilanjutkan sampai semua sampel turun secara total, dan tertampung dalam flakon.