

Pemanfaatan deret homolog alkilbenzena untuk penentuan nilai indeks retensi kovats dalam RP-HPLC sistem pelarut metanol/air

Utilizing of alkybenzene homologous series on the determination of kovats retention index in the RP-HPLC using methanol/water solvent system

Rinaldi Idroes

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Syiah Kuala
Banda Aceh, Indonesia

Abstrak

Parameter waktu retensi dalam HPLC sangat sensitif terhadap perubahan fasa diam, suhu, nilai pH, komposisi fasa gerak dan laju alir. Indeks Retensi merupakan salah satu parameter yang dimanfaatkan untuk meminimalkan sensitifitas tersebut. Pada HPLC terjadi mekanisme interaksi antara zat terlarut dengan fasa gerak, dimana interaksi sedemikian tidak terjadi pada GC, sehingga data retensi pada HPLC akan sangat tergantung dengan fasa gerak. Penggunaan n-alkana sebagai standar pada HPLC relatif sukar. Hal ini disebabkan sifat n-alkana yang sangat non polar, sehingga penggunaan pada kromatografi sistem fasa terbalik menyebabkan waktu retensi yang lama. Dibandingkan dengan n-alkana, deret homolog Alkilbenzena yang stabil dan mudah diperoleh secara komersial, dapat dideteksi dengan detektor Ultra violet (UV) sehingga memudahkan analisa rutin. Indeks Retensi Kovats, yang lazim digunakan pada GC didefinisikan sebagai bilangan karbon dari n-alkana yang dikalikan seratus. Pada penelitian ini ditemukan penentuan indeks retensi Kovats dalam HPLC yang dilakukan dengan menggunakan deret homolog Alkilbenzena yang dihubungkan dengan n-alkana sebagai standar. Sebagai zat terlarut digunakan steroid dengan sistem pelarut metanol/air.

Kata kunci: RP-HPLC, Indeks Retensi Kovats, n-Alkana, Alkilbenzena

Abstract

Retention times in high performance liquid chromatography are very susceptible to small changes of the stationary phase, temperature, pH-value, mobile-phase composition and flow rate. One of the methods to minimize these effects is by utilizing a retention index system. In contrast to GC, the retention Index determination method in HPLC is still widely discussed, because of difficulty utilizing n-alkane as standard. In addition, the solutes in HPLC interact with the mobile-phase, thus the retention data also depend on the mobile-phase. It is not easy to use n-alkane in HPLC as standards because of considerable problems. Due to their very non polar properties, hence in most reversed phase systems, they show large retention times. Therefore, using n-alkane in routine analysis could be inconvenient. In comparison with n-alkane, the alkylbenzene homologous series are stable compound and commercially available. They have a high UV absorbance at the wavelength of 254 nm, and thus are easily detected by a UV detector. This paper will introduce Kovats Retention Index Determination in the HPLC by using alkylbenzene homologous series and then is to be connected with n-alkane as a frame of reference. Steroids were used as test substance for determining Kovats retention index values in methanol/ water system.

Key words: RP-HPLC, Kovats Retention Index, n-Alkane, Alkyl Benzene.

Pendahuluan

Ungkapan HPLC pertama kali digunakan secara populer awal tahun 70-an, terutama untuk membedakan antara kromatografi cair berbasis kolom modern (metode kinerja tinggi) dengan kolom klasik. Simposium internasional pertama tentang HPLC dilakukan bulan Mei 1973 di Interlaken (Swiss) menampilkan hasil yang spektakuler dan antusias (Ettre, 2001). Saat ini lebih dari 80 % teknik HPLC yang digunakan adalah RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*). Paling tidak sebelum tahun 2000 HPLC menjadi bisnis yang mendunia dengan omzet lebih dari \$ 3 Milyar (Horvath, 1996).

Pemanfaatan indeks retensi pertama kali diperkenalkan oleh E. Kovats (Kovats, 1958) pada sistem GC, sedangkan dalam sistem HPLC indeks retensi Kovats belum dapat diaplikasikan, ini disebabkan tingginya sensitifitas dari parameter waktu retensi (t_R) terhadap perubahan fasa diam, suhu, pH, komposisi fasa gerak dan laju alir (Waetzig, 1989). Indeks retensi suatu senyawa dihitung relatif terhadap dua senyawa standar sehingga pengaruh instrumen dapat diabaikan dan presisi dapat ditingkatkan. Waktu mati (t_0) juga merupakan komponen penting dalam penentuan indeks retensi (Didaoui, 1996). Penentuan waktu mati tergantung pada sistem kromatografi itu sendiri, artinya belum ada suatu kesepakatan antar peneliti dalam mendefinisikan makna hakiki waktu mati. Penentuannya selalu tergantung pada metode yang digunakan (Waetzig, 1989).

Dalam rangka mengembangkan suatu besaran yang mempunyai keberulangan tinggi, maka sejak tahun 1979 telah dimulai penelitian indeks retensi pada HPLC sesuai prinsip yang telah dilakukan pada GC yang dipopulerkan oleh Kovats (Ettre, 2003; Harangi, 2003). Beberapa deret homolog yang telah diteliti antara lain PAH (Popl, *et al.*, 1974), Alkilarilketon (Kikta, 1977), 2-Alkanone (Baker, 1979), Alkilbenzen (Morishita, *et al.*, 1984), 1-Nitroalkan (Bogusz, 1988), Paraban (Yamauchi, 1993) dan 1-(*p*-(2,3-dihidroksipropoksi)fenil)-1-alkanon (Kuronen, 1991). Hingga kini belum ditemukan suatu sistem standar yang cocok baik untuk GC maupun untuk HPLC, yang memungkinkan hasil yang diperoleh dari

berbagai laboratorium dapat saling dibandingkan.

Tujuan dari penelitian ini adalah penentuan indeks retensi Kovats dalam HPLC dengan menggunakan deret homolog Alkilbenzen yang dihubungkan dengan n-Alkan sebagai standar. Zat terlarut yang digunakan adalah steroid pada sistem pelarut metanol/air (MeOH/H₂O).

Metodologi

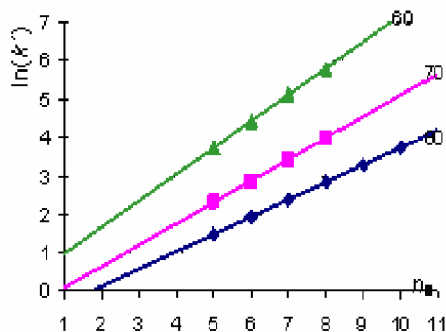
Senyawa deret homolog Alkilbenzena yang digunakan adalah Toluena hingga Oktilbenzena dimana sejumlah 1 mL Alkilbenzena diencerkan dengan Tetrahidrofur (THF) hingga 10 mL. Selanjutnya diencerkan dengan perbandingan 1:100 dengan metanol/air. Gas pada pelarut dihilangkan dengan menggunakan Helium (He) selama 10 menit. Supaya tercapai kondisi kesetimbangan pada sistem, maka peralatan HPLC dan detektor indeks bias dibiarkan hidup beberapa lama, baru dilakukan penyuntikan. Kondisi eksperimen sebagai berikut. Kolom: Lichrospher 100 RP-18 (Merck), diameter 5 μ m, 125 x 4 mm, diselubungi dengan mantel air pada 30° C. Sistem pelarut metanol/air (V/V), botol pelarut diletakkan dalam bak-air pada suhu konstan 30° C. Laju alir: 1,0 mL/menit. Termostat: Haake D8 (Fison), Karlsruhe, Jerman, dengan ketelitian $\pm 0,02^\circ$ C. Katup: Rheodyne 7010 dengan loop 20 μ L, Cotati, California. Pompa Bischoff model 2200 (seri 903), Leonberg, Jerman. Detektor Refractive Index (Indeks Bias) model ERC-7510, Erma Optical Works Ltd. Japan, suhu diatur pada 30° C. Range $\frac{1}{4}$, Polaritas (-), Rekorder HP-3394 Hewlett-Packard, Waldbronn, Jerman, Volume mati (V_0) 20 μ L. Waktu mati dihitung dengan menggunakan metode Guardino (Guardino, *et al.*, 1976).

Hasil dan Pembahasan

Sistem indeks retensi didasarkan pada persamaan (1), dimana untuk deret homolog n-alkana terdapat hubungan linier antara $\ln(k')$ dan bilangan karbon (n_c), seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 1.

Tabel I menunjukkan a_0 , a_1 dan r^2 , yang diperoleh berdasarkan Gambar 1. Hasilnya bahwa nilai r^2 hampir bernilai 1, dimana semakin mendekati 1 maka nilainya mendekati ideal. Terlihat bahwa slope dan intersep naik dengan kenaikan komposisi air. Hubungan ini adalah suatu fungsi linier. N-alkana dengan bilangan karbon rendah seperti n_3 atau n_4 (Propana atau Butana), berada dalam fase gas,

$$\ln(k') = a_1 n_c + a_0 \quad (1)$$



Gambar 1: Hubungan linier antara bilangan karbon n-alkana (n_c) dan $\ln(k')$ pada sistem pelarut MeOH/H₂O.

Tabel I: Nilai koefisien regresi dari Gambar 1

	$a_0 \pm s_{dv}$ (a_0)	$a_1 \pm s_{dv}$ (a_1)	r^2
80/20	-0.7799 ± 0.0080	0.4519 ± 0.0010	0.999997
70/30	-0.4839 ± 0.1607	0.5578 ± 0.0244	0.999800
60/40	0.2916 ± 0.0689	0.6901 ± 0.0104	0.999980

sehingga nilai indeks retensi dibawah 300 hingga 400 dalam prakteknya sangat jarang digunakan.

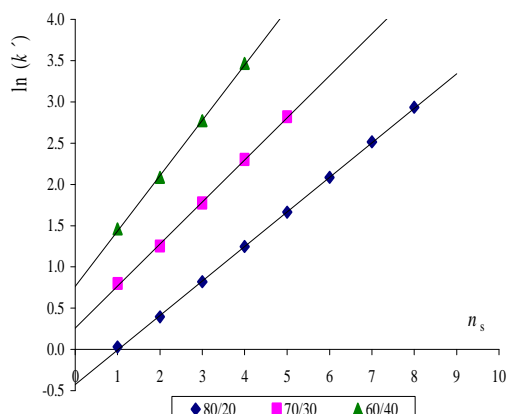
Hubungan $\ln(k')$ dengan bilangan karbon tersubstitusi pada deret homolog Alkil benzena (n_s)

Gambar 2 menunjukkan hubungan linier antara $\ln(k')$ dan bilangan atom karbon yang tersubstitusi pada deret homolog Alkilbenzena (n_s).

Rumusan untuk menjelaskan hubungan linier dari Gambar 2 dapat diturunkan dari persamaan (1) sehingga diperoleh persamaan berikut:

$$\ln(k') = a_1 n_s + a_0 \quad (2)$$

Semua nilai r^2 yang diperoleh lebih besar dari 0,9992. Nilai standar deviasi untuk slope (a_1) dan intersep (a_0) dari garis lurus dihitung berdasarkan metode yang direkomendasi oleh



Gambar 2: Hubungan linier antara bilangan atom karbon yang tersubstitusi pada deret homolog Alkilbenzena (n_s) dan $\ln(k')$ pada sistem pelarut MeOH/H₂O.

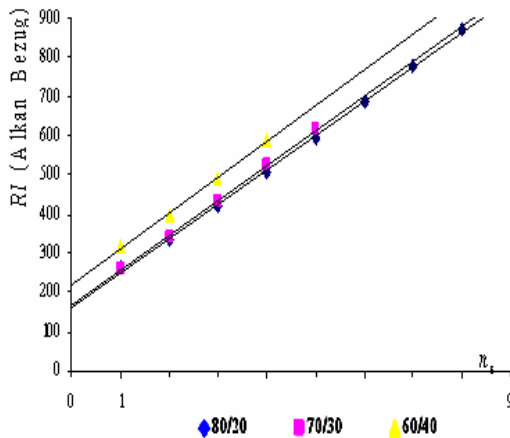
Tabel II : Nilai koefisien regresi (a_1 dan a_0) dari Gambar 2

MeOH/H ₂ O	$a_0 \pm s_{dv}$ (a_0)	$a_1 \pm s_{dv}$ (a_1)	r^2
80/20	$-0,4218 \pm 0,0333$	$0,4184 \pm 0,0066$	0,9998
70/30	$0,2602 \pm 0,0819$	$0,596 \pm 0,0247$	0,9993
60/40	$0,769 \pm 0,1420$	$0,6711 \pm 0,0518$	0,9994

Sachs (Sachs, 1999). Nilai koefisien regresi a_1 , a_0 dan r^2 , dari Gambar 2 ditunjukkan oleh Tabel II berikut.

Hubungan antara Indeks Retensi (RI) dengan n_s

Gambar 3 menunjukkan suatu hubungan linier antara indeks retensi Kovats (RI) dari Alkilbenzena dan bilangan karbon yang tersubstitusi pada deret homolog itu sendiri (n_s) pada sistem pelarut MeOH/H₂O. Tabel III menampilkan perhitungan nilai-nilai yang diperoleh dari b_1 , b_0 , $\mathcal{E}(b_1)$ dan r^2 dari garis-garis lurus (Gambar 3).



Gambar 3: Hubungan linier antara bilangan karbon yang tersubstitusi pada deret homolog alkilbenzena (n_s) dan nilai indeks retensi Kovats (RI) dari alkilbenzena pada sistem pelarut MeOH/H₂O

Dari Gambar 3 diperoleh hubungan linier antara Indeks Retensi (RI) dengan bilangan karbon tersubstitusi pada deret homolog (n_s) sebagai berikut :

$$RI = b_1 n_s + b_0 \quad (3)$$

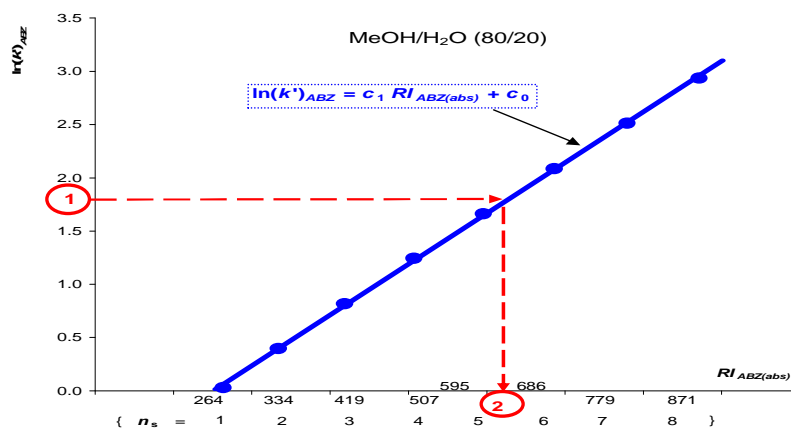
Dimana RI adalah indeks retensi Kovats, n_s adalah bilangan karbon yang tersubstitusi pada

deret homolog alkilbenzena, b_1 dan b_0 adalah koefisien regressi.

Tabel III : Nilai koefisien regressi (b_1 dan b_0), Bias (\mathcal{E}) dari nilai b_1 dan nilai r^2 dari garis lurus seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.

	b_1	$\mathcal{E}(b_1)$	b_0	r^2
80/20	87,740	12,260	162,13	0,9988
70/30	89,345	10,655	166,88	0,9990
60/40	92,008	7,992	218,56	0,9984

Nilai $\mathcal{E}(b_1)$ adalah besaran bias dari nilai keakuratan (Kromidas, 1999) dari slope b_1 , sebagai nilai referensi disini adalah sesuai konsep Kovats yaitu 100. Nilai indeks retensi Kovats dari deret homolog Alkilbenzena pada sistem pelarut MeOH/H₂O terjadi bias dari nilai keakuratan (kesalahan sistematis) sebesar kira-kira 10 poin, artinya slope (b_1) dari hubungan linier pada komposisi pelarut yang berbeda (Tabel III) terletak pada nilai rata-rata 90. Perhitungan waktu mati (t_0) untuk Tabel III dihitung berdasarkan metode Iterasi dengan memanfaatkan data retensi deret homolog itu sendiri (Idroes, 2002). Nilai r^2 pada komposisi pelarut yang berbeda menunjukkan nilai korelasi yang sangat baik antara 0,9984 hingga 0,9990.



Gambar 4: Metode perhitungan nilai indeks retensi Kovats (indeks retensi absolut) dari senyawa steroid dengan Alkilbenzena sebagai standar.

Perhitungan nilai indeks retensi Kovats (nilai indeks retensi absolut) terhadap senyawa steroid dengan memanfaatkan deret homolog alkilbenzena sebagai standar

Nilai indeks retensi Kovats, selanjutnya dapat juga disebut sebagai indeks retensi absolut, dari steroid dapat ditentukan dengan memanfaatkan alkilbenzena sebagai standar.

n_s (Gambar 3) bersifat linier, sehingga otomatis hubungan antara $\ln(k')$ terhadap nilai indeks retensi absolut ($RI_{ABZ(abs)}$) juga bersifat linier.

Sehingga nilai indeks retensi dari steroid dapat dihitung berdasarkan indeks retensi absolut (indeks Kovats) karena melibatkan deret homolog n-alkana sebagai standar primer

Tabel IV. Nilai indeks retensi absolut dari steroid pada sistem pelarut metanol/air

No	Senyawa	80/20	70/30	60/40
1	Amcinonid	393	423	512
2	Betamethason-17-valerat	366	415	513
3	Clobetasol-17-propionat	339	-	464
4	Clobetasol-17-butytrat	391	378	520
5	Clocortolon-21-hexanoat	551	634	732
6	Clocortolon-21-pivalat	481	540	655
7	Cortisonacetat	185	182	276
8	Desonid	233	225	301
9	Desoximetason	225	222	321
10	Dexamethason	175	168	266
11	Diflorasondiacetat	252	279	394
12	Flumetason	378	426	547
13	Fluocortolon	225	227	320
14	Flupredniden-21-acetat	146	137	238
15	Halcinonid	367	376	465
16	Halometason	179	185	290
17	Hydrocortison	204	194	283
18	Hydrocortison-17-butytrat	403	441	533
19	Prednicarbat	353	362	483
20	Prednisolon	150	127	209
21	Prednisolonacetat	195	194	283
22	Prednison	111	78	166
23	Prednyliden	131	106	189
24	Triamcinolonacetat	193	187	274
25	Triamcinolondiacetat	119	108	211
26	Triamcinolonhexacetat	551	606	710

Dari persamaan 2 dan persamaan 3 diperoleh persamaan 4, yang dapat diilustrasikan sesuai dengan Gambar 4.

$$\ln(k')_{ABZ} = C_1 RI_{ABZ(abs)} + C_0 \quad (4)$$

Dimana $\ln(k')_{ABZ}$ adalah faktor retensi dari deret homolog alkilbenzena, $RI_{ABZ(abs)}$ adalah indeks retensi absolut dari regresi linier.

Akibat hubungan $\ln(k')$ terhadap n_s (Gambar 2) dan begitu juga dengan RI terhadap

dan alkilbenzena sebagai standar sekundernya, sesuai persamaan (5) berikut:

$$RI - Steroid_{(ABZ)} = \frac{\ln(k')_{Steroid} - C_0}{C_1} \quad (5)$$

Dimana $RI - Steroid_{(ABZ)}$ adalah nilai indeks retensi steroid, $\ln(k')_{Steroid}$ adalah nilai faktor retensi dari steroid, sedangkan C_0 dan C_1 adalah koefisien regresi garis lurus dari persamaan (4). Hasil perhitungan nilai indeks retensi Kovats

berdasarkan metode yang ditunjukkan sesuai persamaan 5 (Gambar 4) pada sistem pelarut MeOH/H₂O dengan komposisi berbeda diperoleh dan ditabulasi seperti pada Tabel IV.

Kesimpulan

Deret homolog Alkilbenzen dapat digunakan untuk penentuan indeks retensi Kovats (indeks retensi absolut) dalam RP-HPLC dengan memanfaatkan n-Alkan sebagai standar primer. Interaksi zat terlarut dengan fasa gerak pada HPLC berpengaruh sangat dominan terhadap nilai indeks retensi, dalam hal ini nilai indeks retensi yang diperoleh masih

tergantungan dengan komposisi pelarut. Selanjutnya dapat dilakukan uji coba terhadap deret homolog lainnya sebagai standar sekunder selain alkilbenzena. Dan disarankan juga dapat dilakukan penelitian lanjutan yang dapat membandingkan nilai indeks retensi Kovats pada HPLC dan GC.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada DAAD (Badan Pertukaran Akademisi Jerman) atas sponsornya dan Prof. Dr. S. Ebel atas supervisi penelitian yang dilakukan penulis.

Daftar Pustaka

- Baker, J.K. and Ma, C.Y. 1979. Retention Index Scale for Liquid-liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 169:107.
- Bogusz, M. and Aderjan, R.J. 1988. Improved Standardization in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Using 1-Nitroalkanes as a Retention Index Scale, *Journal of Chromatography*, 435:43.
- Didaoui, L., Touabet, A., Meklati, B.Y., Lewin-Kretzschmar, U., and Engewald, W. 1996. Comparison of retention indices of some explosives and related compounds calculated by different mathematical methods in reversed-phase liquid chromatography, *HRC-Journal of High Resolution Chromatography*, 22:613 – 618.
- Ettre, L.S. and Meyer, V.R. 2001. 1973 When HPLC was Young, *LC-GC Europe*, June.
- Ettre, L.S., 2003, Retention Index Expressions, *Chromatographia* 58, October (No. 7/8).
- Guardino, X., Albaiges, J., Firpo, G., Rodrigues-Vinals, R., and Gassiot, M. 1976. Accuracy in the Determination of Kovats Retention Index, *Journal of Chromatography*, 118:13
- Harangi, J., 2003, Retention Index Calculation without n-Alkanes – the Virtual Carbon Number, *Journal of Chromatography A*, 993: 187 – 195.
- Horvath, C. 1996. Citius Altius Fortius, *LC-GC International*, October.
- Idroes, R. 2002. Verhalten der Retentionsdaten homologer Reihen als Bezugssystem und zur Vorhersage von Retentionsdaten in der RP-HPLC, Tenea Verlag, Berlin
- Kikta, E.J. and Stange, A.E. 1977. Phenones: A Family of Compounds Broadly Applicable to Use as Internal Standards in HPLC. Application to the Analysis of Carbofuran, *Journal of Chromatography*, 138:41.
- Kovats, E., 1958, Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen, Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helvetica Chimica Acta*, Vol XLI, No. 206 (1058) 1915-1932
- Kromidas, S. 1999. Validierung in der Analytik, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Kuronen, K.R. 1991. Use of 1-(p-(2,3-dihydroxypropoxy)Phenyl)-1-alkanones as Retention Index Standards in the Identification of Trichothecenes by Liquid Chromatography-Thermospray and Dynamic Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography*, 543:39.
- Morishita, F., Kakihana, H., and Kojima, T. 1984. Measurement of Retention Indexes on n-Alkane Scale in Reversed-Phase Liquid Chromatography and their Prediction from Molecular Structures, *Analytical Letters*, 17 (A20):2385-2398.
- Popl, M., Dolansky, V., and Mostecky, J. 1974. Influence of the Molecular Structure of Aromatic Hydrocarbons on their Adsorptivity on Alumina, *Journal of Chromatography*, 91: 649.

- Sachs, L. 1999. *Angewandte Statistik*, 9. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Waetzig, H. 1989. *Reproduzierbarkeit und Vorhersage von Retentionsdaten in der HPLC*, Unpublished Ph.D Thesis, Julius Maximillian Universitaet Würzburg, Germany.
- Yamauchi, S.J. 1993. Retention Indices of Phenols for Internal Standards in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Application to Retention Prediction and Selectivities of Mobile Phases and Packing Materials, *Journal of Chromatography*, 635:61

* Korespondensi : Dr. Rinaldi Idroes
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Syiah Kuala Banda Aceh
E-mail : rinaldi.idroes@gmx.de