

Pemisahan Delapan Vitamin Larut Air secara Kromatografi Pasangan Ion

NOVI YANTIH*

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
Jln. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640.

Diterima, 24 Juni 2009, Disetujui 21 Juli 2009

Abstract: Ion-pair chromatography is applicable for separating mixtures of acids and bases, either in ionic or nonionic form, such as mixture of ascorbic acid, thiamine hydrochloride, riboflavin, nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, folic acid, and cyanocobalamin, and menadion sodium bisulphite. Separation using ion-pair chromatography is highly influenced by the type and concentration of the counter ion and the selected pH of mobile phase. Eight water soluble vitamins were separated in a single analysis with total analysis time never exceeded 12 minutes by using a reversed-phase column (C_8) with a mixture of methanol and solution of 5 mM sodium hexanesulphonate at pH 3.50 (49:151) as mobile phase, at a flow rate of 1 ml per minute, and ultraviolet detector at 275 nm. Satisfactory separation was shown by the resolution values of more than 1.5, which were between 3.8–10.6.

Keywords: water soluble vitamins, ion-pair chromatography, resolution.

PENDAHULUAN

KROMATOGRAFI pasangan ion (KPI) saat ini merupakan metode alternatif untuk memisahkan campuran senyawa polar yang bersifat asam ataupun basa, yang ionik maupun yang tidak meng-ion. Penelitian ini mengkaji penggunaan KPI untuk pemisahan delapan komponen vitamin larut air, yaitu asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit.

Vitamin larut air memiliki karakteristik beragam, yaitu ada yang bersifat asam, basa, dan netral, sehingga dalam larutan akan terdapat dalam bentuk molekul yang netral atau ionik. Asam askorbat bersifat asam dan dalam larutan basa akan terionisasi, sementara itu tiamin hidroklorida, nikotinamida, sianokobalamin, dan piridoksin hidroklorida terionisasi dalam asam dengan karakteristik yang berbeda. Pada sistem KPI, senyawa ionik akan membentuk pasangan ion dengan pereaksi pasangan ion dan akan terpartisi di antara fase gerak dan fase diam sebagai spesi netral. Bila tidak ada pereaksi pasangan ion, senyawa ionik tidak diretensi oleh kolom fase balik dan akan ter-elusi secara spontan atau kromatogramnya akan membentuk ekor^(1,2).

Pemisahan dalam KPI sangat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi pereaksi pasangan ion yang digunakan. Pasangan ion golongan asam alkilsulfonat ($-\text{SO}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$) dengan n antara 4–7 dapat membentuk pasangan ion dengan basa kuat dan lemah⁽³⁾. Larutan natrium heksansulfonat dipilih sebagai pereaksi pasangan ion karena selain dapat membentuk pasangan ion dengan kation kuarterner tiamin, nikotinamida, dan piridoksin dalam larutan asam juga diharapkan memberikan waktu retensi yang tidak terlalu besar^(4,5). Tujuh vitamin larut air (asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, dan menadion natrium bisulfit) telah berhasil dipisahkan menggunakan kolom fase balik C_8 dengan fase gerak metanol-air (24,5:75,5)⁽⁴⁾.

Dalam sistem KPI, selain jenis dan konsentrasi pereaksi pasangan ion, pH fase gerak juga sangat menentukan hasil pemisahan. Keasaman (pH) fase gerak sebaiknya dipilih yang dapat menghasilkan ionisasi analit dalam sampel secara maksimum. Pada sistem kromatografi fase balik, perlu diperhatikan bahwa pH yang dapat digunakan untuk penggunaan kolom dengan silika gel sebagai pengikat fase diam adalah antara 2 sampai 7,4⁽³⁾. Dengan demikian, untuk memisahkan campuran yang bersifat asam dan basa, baik yang mengion maupun yang tidak mengion, secara KPI perlu optimasi pH fase gerak dan konsentrasi pasangan ion.

* Penulis korespondensi, Hp. 08129624502
e-mail: novi_yantih@yahoo.com

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum metode KPI guna pemisahan asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit dalam campuran secara simultan. Dalam optimasi metode KPI ini diteliti penggunaan larutan natrium heksansulfonat dalam dua konsentrasi berbeda, yaitu 5 dan 10 mM dengan variasi pH 2,80; 3,00; dan 3,50. Untuk memperoleh resolusi optimum seluruh komponen juga dicoba laju alir fase gerak pada kecepatan 1,0 dan 1,5 ml per menit. Sistem KPI optimum adalah yang dapat menghasilkan puncak setiap komponennya secara *base to base* dalam waktu relatif singkat.

Penelitian diharapkan dapat menghasilkan sistem KPI optimum untuk memisahkan delapan komponen vitamin dan tahapan analisis yang diperoleh selanjutnya dapat diaplikasikan untuk penentuan secara simultan asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit dalam produk multivitamin.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Asam askorbat (DSM, Singapura), tiamin hidroklorida (BPFI), riboflavin (Roche Diagnostics GmbH), nikotinamida (Western Drugs Pvt. Ltd.), piridoksin hidroklorida (DSM, Singapura), asam folat (DSM, Singapura), sianokobalamin (DSM, Singapura), menadion natrium bisulfit (DSM, Singapura), natrium heksansulfonat (J.T. Baker), trietilamin (Merck), metanol (HPLC grade, J.T. Baker), asam asetat (Merck), dan air suling ganda (Brataco). Peralatan yang digunakan adalah kromatografi cair (HP 1100 QuatPump), kolom kromatografi C8 (LichroCARTR 250-4, LiChrospherR 100 Rp 8 (5 μ m), L 64044616, No. 516970), spektrofotometer ultraviolet (Beckman Du 650i), pH-meter (Beckman), dan alat-alat yang biasa digunakan di laboratorium kimia analisis.

METODE. **Pembuatan larutan baku induk.** Larutan baku induk tiamin hidroklorida, piridoksin hidroklorida, nikotinamida, dan menadion natrium bisulfit masing-masing dibuat dengan konsentrasi 5,0; 1,0; 2,5; dan 2,0 mg/ml dalam asam asetat 1,0%. Larutan baku induk sianokobalamin disiapkan pada konsentrasi 5 μ g/ml dalam asam asetat 1,0%. Larutan baku induk riboflavin dan asam folat dibuat dengan konsentrasi 1,0 dan 0,25 mg/ml dalam larutan natrium hidroksida 0,01 N. Asam askorbat langsung dilarutkan pada saat pembuatan larutan baku campuran vitamin.

Pembuatan larutan baku campuran. Larutan baku campuran vitamin dibuat dengan mencampur 1,0 ml larutan baku yang mengandung tiamin hidroklorida 5,0 mg/ml, piridoksin hidroklorida 1,0 mg/ml, dan menadion natrium bisulfit 2,0 mg/ml, ditambah 1,0 ml sianokobalamin 5 μ g/ml, serta 4,0 ml nikotinamida 2,5 mg/ml. Sebanyak 20,0 mg asam askorbat dilarutkan ke dalam campuran larutan tersebut dan ditambah larutan natrium asetat 2,5 M hingga pH 4–5. Selanjutnya ke dalam larutan dimasukkan 2,0 ml larutan baku induk riboflavin 1,0 mg/ml dan 1,0 ml asam folat 0,25 mg/ml, kemudian ditambah larutan natrium hidroksida 0,01 N hingga volume 10,0 ml. Larutan baku campuran vitamin dicampur homogen dan disaring dengan penyaring berpori 0,45 μ m.

Pembuatan larutan baku kerja. Sebanyak 200 μ l larutan baku campuran dipipet dan diencerkan dengan fase gerak yang tidak mengandung natrium heksansulfonat 5 mM hingga 1,0 ml.

Pemilihan panjang gelombang deteksi pada daerah ultraviolet. Kondisi percobaan yang dioptimasi meliputi pemilihan panjang gelombang deteksi dan penentuan kondisi sistem KPI. Sejumlah tertentu larutan baku induk masing-masing vitamin diencerkan dengan fase gerak tanpa larutan natrium heksansulfonat, kemudian spektrum absorpsi masing-masing senyawa dibuat pada rentang panjang gelombang 200–400 nm. Seluruh spektrum absorpsi vitamin ditampilkan secara tumpang tindih (*overlay*) sehingga dapat ditentukan panjang gelombang yang dapat digunakan untuk mendeteksi semua vitamin yang diuji.

Penentuan kondisi sistem KPI. Kolom oktasilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm dikondisikan dengan fase gerak pada laju alir 1 ml per menit, kemudian larutan baku kerja disuntikkan ke dalam gerbang suntik kromatograf. Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1,0% yang telah diatur keasamaannya hingga pH 2,80; 3,00; dan 3,50 dengan penambahan trietilamin. Larutan natrium heksansulfonat disaring dengan penyaring berpori 0,45 μ m sebelum dimasukkan ke dalam wadah fase gerak. Perbandingan campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat yang digunakan dicampur secara otomatis di dalam kromatograf dengan sistem isokratik. Fase gerak pH 3,50 telah menunjukkan hasil pemisahan yang baik sehingga dibuat juga fase gerak campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat 10 mM dalam larutan asam asetat 1,0% (pH 3,50) untuk melihat pengaruh konsentrasi larutan natrium heksansulfonat terhadap waktu retensi masing-masing vitamin, yaitu

dengan membandingkan waktu retensi vitamin pada konsentrasi larutan natrium heksansulfonat 5 dan 10 mM. Pemisahan delapan vitamin pada laju alir fase gerak 1,5 ml per menit juga diamati.

Pembuatan kurva baku. Serbuk simulasi multivitamin dibuat dengan mencampur berturut-turut 300,0 mg asam askorbat; 60,0 mg tiamin hidroklorida; 24,0 mg riboflavin; 12,0 mg piridoksin hidroklorida; 120,0 mg nikotinamida; 70,0 µg sianokobalamin; 24,0 mg menadion natrium bisulfit dan bahan pengisi hingga bobot 5 g. Sebanyak kurang-lebih 1 g serbuk simulasi tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian didispersikan dalam 4 ml asam asetat 1,0%, dicampur homogen dan disentrifugasi 30 putaran secara manual. Supernatan didekantasi ke dalam labu takar 25 ml. Prosedur tersebut diulang sebanyak tiga kali dan supernatan yang diperoleh ditambah 0,5 ml larutan natrium asetat 2,5 M hingga pH 4-5 (larutan X). Selanjutnya residu dienap-tuang dengan tiga kali 4 ml larutan natrium hidroksida 0,01 N, dicampur homogen dan disentrifugasi 30 putaran secara manual. Supernatan dipindahkan ke dalam labu takar yang mengandung larutan X. Ke dalam larutan X ditambahkan larutan natrium hidroksida 0,01 N hingga 25 ml (pH 5). Larutan disaring dengan penyaring membran berpori 0,45 µm. Filtrat dipipet 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; dan 6,0 ml, kemudian masing-masing diencerkan hingga 10,0 ml dengan fase gerak tanpa larutan natrium heksansulfonat sehingga diperoleh 6 konsentrasi yang berbeda untuk masing-masing vitamin. Masing-masing larutan tersebut

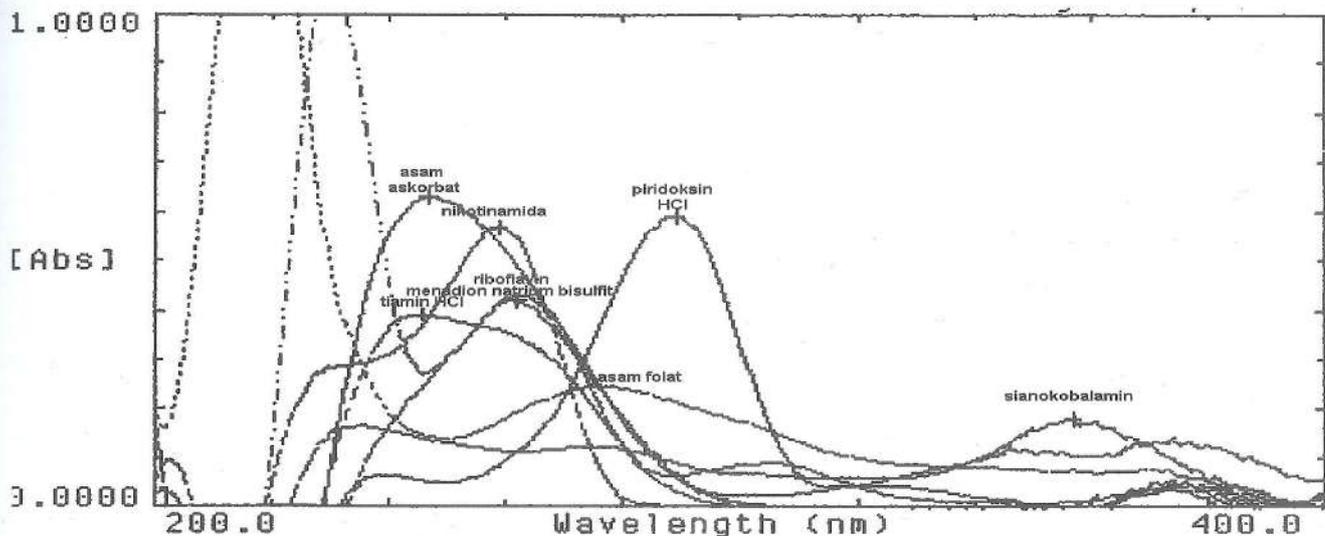
disuntikkan sebanyak 20 µl ke dalam gerbang suntik kromatograf.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Larutan analit dari campuran vitamin disiapkan secara enap-tuang menggunakan asam asetat 1,0% dan dilanjutkan dengan larutan natrium hidroksida 0,01 N. Asam asetat digunakan untuk melarutkan asam askorbat, tiamin hidroklorida, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit. Untuk melarutkan riboflavin dan asam folat digunakan larutan natrium hidroksida 0,01 N.

Larutan natrium asetat 2,5 M yang ditambahkan pada fase asam asetat 1,0% dimaksudkan untuk meningkatkan pH asam asetat dari 2,5 menjadi 5, sekaligus membentuk dapar sehingga dapat menahan perubahan pH ketika ditambahkan larutan natrium hidroksida 0,01 N. Perbandingan jumlah asam dan basa yang optimum untuk melarutkan seluruh vitamin adalah 1:1⁽⁹⁾. Pengenceran larutan sampel sebelum diinjeksi pada sistem kromatografi dilakukan menggunakan fase gerak tanpa natrium heksansulfonat agar waktu retensi tidak bergeser menjadi lebih besar.

Spektrum absorpsi masing-masing vitamin dibuat pada rentang panjang gelombang 200–400 nm untuk memilih panjang gelombang yang dapat mendeteksi semua komponen vitamin yang diuji (Gambar 1). Pada panjang gelombang 275 nm, semua vitamin yang diuji memberikan serapan



Gambar 1. Spektrum gabungan (*overlay*) delapan vitamin larut air pada rentang panjang gelombang 200–400 nm.

Tabel 1. Serapan vitamin larut air pada panjang gelombang 270, 275, dan 280 nm.

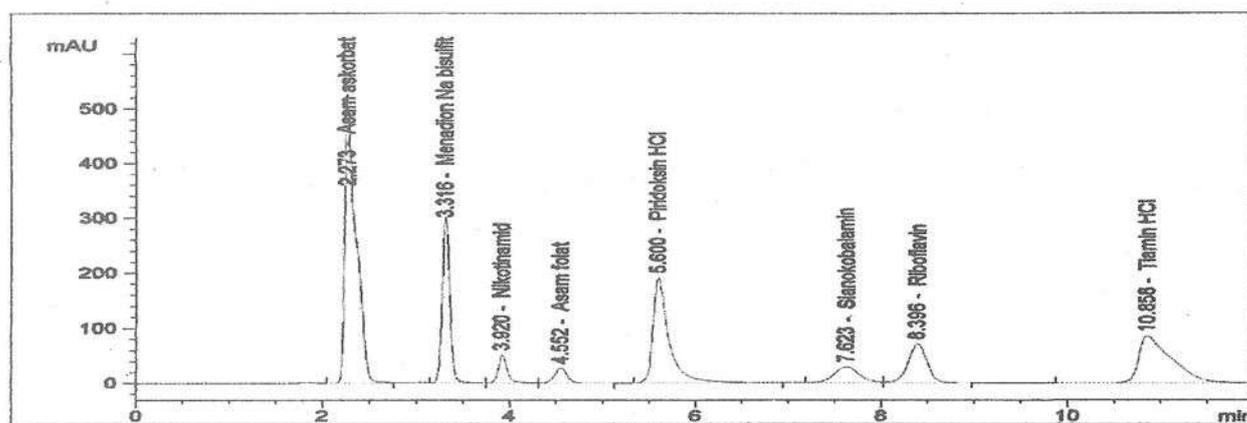
No.	Vitamin	Serapan pada panjang gelombang		
		270 nm	275 nm	280 nm
1.	Asam askorbat	0,3542	0,2624	0,1755
2.	Menadion natrium bisulfit	0,3540	0,2335	0,1245
3.	Nikotinamida	0,2863	0,1097	0,0207
4.	Asam folat	0,2346	0,2466	0,2437
5.	Piridoksin hidroklorida	0,2272	0,3413	0,4666
6.	Sianokobalamin	0,1191	0,1231	0,1180
7.	Riboflavin	0,3376	0,2562	0,1839
8.	Tiamin hidroklorida	0,2751	0,2009	0,1253

dengan absorpsivitas cukup kuat, terutama asam folat dan sianokobalamin yang konsentrasinya paling kecil di antara komponen vitamin larut air lainnya (Tabel 1).

Pereaksi pasangan ion dipilih golongan sulfonat karena dapat membentuk pasangan ion dengan kation tiamin, piridoksin, sianokobalamin, dan nikotinamida. Asam heksansulfonat digunakan untuk memperpendek waktu analisis, karena semakin panjang rantai karbon sifatnya akan makin lipofil dan kian lama ditahan oleh kolom, sementara penggunaan bentuk garamnya dimaksudkan agar mudah terlarut dalam asam asetat.

Waktu pemisahan delapan komponen vitamin yang efisien terjadi pada pH 3,50 dengan konsentrasi pereaksi pasangan ion 5 mM. Pada pH 3,50, puncak tiamin hidroklorida muncul di sekitar menit kesebelas, jauh lebih singkat dibanding waktu retensi tiamin pada pH 2,80 dan 3,00 yang sekitar 50 dan 30

menit. Tiamin hidroklorida akan terionisasi dalam asam, sehingga jika pH semakin asam waktu retensi tiamin akan makin besar karena bentuk pasangan ion tiamin lebih nonpolar dengan semakin banyaknya jumlah natrium heksansulfonat yang dibutuhkan. Konsentrasi pereaksi pasangan ion 5 mM pada pH 3,50 menghasilkan waktu analisis yang relatif singkat (sekitar 12 menit) bila dibandingkan dengan hasil analisis dengan konsentrasi pasangan ion yang lebih besar (10 mM) pada pH yang sama waktu analisisnya lebih dari 20 menit. Hal ini karena puncak tiamin hidroklorida sebagai komponen vitamin yang paling ionik baru muncul di menit ke-22 pada penggunaan konsentrasi pereaksi pasangan ion 10 mM, sementara pada konsentrasi 5 mM puncaknya muncul sekitar akhir menit ke-10 (Gambar 2). Dengan demikian peningkatan konsentrasi pereaksi pasangan ion menyebabkan afinitas analit terhadap kolom menjadi lebih kuat.



Gambar 2. Profil kromatogram delapan vitamin larut air pada sistem kromatografi fase balik pasangan ion dengan fase gerak pada laju alir 1 ml/menit (metanol-larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1% pH 3,50 (49:151) dan menggunakan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 275 nm.

Tabel 2. Waktu retensi vitamin larut air.

No.	Vitamin	Waktu retensi (menit)	
		Hasil percobaan	Sumber: Yantih 2007
1.	Asam askorbat	2,273	2,268
2.	Menadion natrium bisulfit	3,316	3,376
3.	Nikotinamida	3,920	3,834
4.	Asam folat	4,552	4,492
5.	Piridoksin hidroklorida	5,600	5,568
6.	Sianokobalamin	7,623	-
7.	Riboflavin	8,396	8,325
8.	Tiamin hidroklorida	10,858	11,062

Laju alir fase gerak 1,0 ml/menit menunjukkan kualitas pemisahan yang baik untuk seluruh komponen. Pada peningkatan laju alir menjadi 1,5 ml/menit, puncak sianokobalamin dan riboflavin tidak terpisah *base to base*, sehingga laju alir optimum yang dipilih adalah 1,0 ml/menit.

Sistem KPI fase balik untuk pemisahan serbuk campuran asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit yang optimum diperoleh pada penggunaan kolom oktasilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm, fase gerak pada laju alir 1 ml per menit terdiri dari campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1% yang telah diatur keasamannya hingga pH 3,50 dengan penambahan trietilamin (49:151), volume injeksi 20 μ l, dan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 275 nm.

Metode KPI pada kondisi tersebut mampu menentukan masing-masing komponen vitamin dalam campuran secara selektif. Pada kondisi tersebut, seluruh analit yang diuji dapat terpisah dengan baik dengan faktor resolusi lebih besar 1,5, yaitu antara 3,8–10,6 dalam waktu sekitar 12 menit (Gambar 2) dengan waktu retensi masing-masing vitamin yang tidak berbeda antara bentuk tunggal dan dalam bentuk campuran.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa waktu retensi asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, dan menadion natrium bisulfit tidak berbeda jauh dengan hasil yang diperoleh pada pemisahan tujuh vitamin larut air⁽⁴⁾, dan puncak sianokobalamin muncul diantara puncak piridoksin hidroklorida dan riboflavin dengan waktu retensi sekitar 7,6 menit. Dengan demikian, sistem kromatografi yang lebih sederhana pada penelitian ini dapat

menghasilkan kualitas pemisahan yang lebih efisien bila dibandingkan dengan pemisahan sembilan vitamin larut air oleh Olivier Heudi yang membutuhkan waktu 17 menit menggunakan fase gerak campuran asetonitril dan asam trifluoro asetat 0,025% pH 2,6 dengan sistem elusi gradien yang dideteksi pada dua panjang gelombang (210 dan 275 nm)⁽⁶⁾.

Penggunaan pereaksi pasangan ion heksansulfonat pada penelitian ini memberikan hasil yang juga lebih efisien daripada oktansulfonat. Penggunaan oktansulfonat sebagai pereaksi pasangan ion telah dilakukan oleh Albala-Hurtado (1997) untuk memisahkan nikotinamid, tiamin, riboflavin, piridoksin, piridoksal, piridoksamin, sianokobalamin, dan asam folat dalam waktu 55 menit dengan menggunakan kolom fase balik (C_{18}) dan fase gerak metanol-air (15:85) yang mengandung 5 mM asam oktansulfonat dan 0,5% trietilamin pada pH 3,6 dengan laju alir 1,0 ml/menit⁽⁷⁾.

Persamaan kurva baku delapan vitamin dalam serbuk simulasi multivitamin disajikan pada Tabel 3 dengan koefisien korelasi (r) masing-masing vitamin menunjukkan nilai mendekati 1. Nilai r yang diperoleh tersebut tidak terlalu berbeda dengan hasil yang telah dilakukan oleh Olivier Heudi (r lebih besar dari 0,995). Dengan metode yang digunakan, konsentrasi sianokobalamin lebih kecil dari 111,3 ng/ml) tidak terdeteksi, sehingga dihasilkan nilai koefisien korelasi yang lebih kecil dari 0,999. Hal ini menunjukkan, metode yang dikembangkan kurang sensitif untuk mendeteksi sianokobalamin karena panjang gelombang serapan maksimumnya ($\lambda_{maks} = 360$ nm) jauh dari 275 nm.

Pada penelitian selanjutnya perlu dikembangkan penggunaan detektor *photo diode array* untuk meningkatkan sensitivitas metode. Untuk vitamin lainnya, limit deteksi dan kuantitasnya cukup baik

Tabel 3. Persamaan kurva baku dan koefisien korelasi analit.

Analit	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	$Y = bx + a$	R	Limit	
				Deteksi ($\mu\text{g/ml}$)	Kuantitasi ($\mu\text{g/ml}$)
Asam askorbat	244,4 – 1466,7	$Y = 11,08x + 241,7$	0,9996	32,96	99,87
Tiamin hidroklorida	48,3 – 290,1	$Y = 14,72x - 18,78$	0,9999	3,06	9,28
Riboflavin	20,4 – 122,3	$Y = 31,82x - 24,47$	0,9999	1,28	3,87
Nikotinamida	97,4 – 584,4	$Y = 5,60x + 58,33$	0,9996	13,36	40,50
Piridoksin hidroklorida	9,4 – 56,2	$Y = 12,06x - 3,46$	0,9997	1,04	3,15
Asam folat	2,6 – 15,7	$Y = 13,77x - 7,12$	0,9998	0,27	0,82
Sianokobalamin	0,0556 – 0,3339	$Y = 83,79x + 4,90$	0,8900	0,1346	0,4079
Menadion natrium bisulfit	19,9 – 119,4	$Y = 13,08x + 3,72$	0,9999	1,014	3,07

sehingga metode ini dapat dikembangkan untuk penetapan secara simultan asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, dan menadion natrium bisulfit dalam campuran multivitamin.

SIMPULAN

Campuran vitamin asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit dapat dipisahkan secara selektif pada sistem KPI fase balik dengan kolom oktilsilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm, fase gerak pada laju alir 1,0 ml per menit yang terdiri dari campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1% dan telah diatur keasamannya hingga pH 3,50 dengan penambahan trietilamin (49:151), volume injeksi 20 μl , dan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 275 nm. Pada kondisi tersebut seluruh analit yang diuji dapat terpisah dengan baik dengan nilai resolusi lebih besar dari 1,5, yaitu antara 3,8–10,6 dalam waktu sekitar 12 menit. Sensitivitas metode yang dikembangkan cukup baik untuk seluruh komponen vitamin yang diuji, kecuali sianokobalamin yang memerlukan pengembangan metode baru atau penggunaan detektor yang lebih peka.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada PT Artois Pharmaceutical Tbk atas bantuan bahan baku dan pereaksi kimia, serta untuk Nurhayati di Laboratorium Analisis Fisiko Kimia Sekolah Farmasi ITB, Bandung, atas dukungan moril dan bantuannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ibrahim S. Pengembangan metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Seminar on HPLC Application for Analysis of Drugs, Food, and Environment. Bandung: Penerbit ITB; 1998. hal. 2-8.
2. Willard H, Merritt HLL Jr, Dean JA, and Settle FA Jr. Instrumental methods of analysis. 7th ed. Belmont: Wadsworth Publ. Co.; 1988. p. 580-8, 615-33.
3. Meyer RV. Practical high performance liquid chromatography. Guildford: John Wiley & Sons Ltd.; 1978. p. 1, 15-41, 169-174.
4. Yantih N, Amir MM, Slamet I, Rahmana E. Determination of seven water soluble vitamins in tablet simultaneously by reversed-phase high performance liquid chromatography. International Seminar on Pharmaceutics: up date on pharmaceutical innovation and new drug delivery systems, School of Pharmacy ITB, Bandung 31 Oktober – 1 November 2007.
5. Amidzic R, Brboric J, Cudina O, and Vladimirov S. RP-HPLC Determination of vitamin B1, B3, B6, folic acid, and B12 in multivitamin tablets. J. Serb. Chem. Soc. 2005.70(10):1229-135.
6. Heudi O, Tamara K, and Patric F. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. J. Chrom. 2005. 1070(1-2):49-56.
7. Albala HS, Veciana NMT, Izquierdo PM, Marine FA. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry No. 25, Barcelona. 778(1-2): 247-53.