

**PENENTUAN SEBATIAN SACCHARIN DALAM BEBERAPA SAMPEL
MINUMAN RINGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CECAIR
BERPRESTASI TINGGI (HPLC)**

ROHAIZAH ERNNIESHAH BT SABTURANI

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN**

**UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI
IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM KIMIA INDUSTRI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

NOVEMBER 2007



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PENENTUAN SEBATIAN SACCHARIN DALAM BEBERAPA SAMPEL MINUMAN RINGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CECAIR BERPRESTASI TINGGI (HPLC)

IJAZAH: SARJANA MUDA SAINS (CEPUJIAN)

SAYAR ROHAIZAH ERN NIESHAH SABTURAHMI SESI PENGAJIAN: 2004-2007
(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan Oleh

Nurul Huda
(TANDATANGAN PENULIS)

Surugau
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 03-01-20,
TAMAN SRI MEBA II,
KEPAYANG RIDGE,
1C-1C -

DR. NOUMIE SURUGAU
Nama Penyelia

Tarikh: 12-12-07

Tarikh: _____

CATATAN:- *Potong yang tidak berkenaan.

**Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa /organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

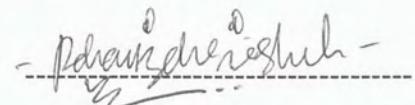
@Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

23 November 2007



ROHAIZAH ERNNIESHAH BT SABTURANI

HS 2004- 3883



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

DIPERAKUKAN OLEH**TANDATANGAN****1. PENYELIA**

(Dr. Noumie Surugau)

**2. PEMERIKSA 1**

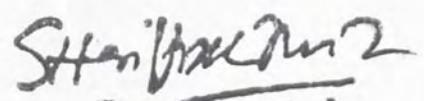
(Prof. Madya Dr. Marcus Jopony)

**3. PEMERIKSA 2**

(Dr. How Siew Eng)

**4. DEKAN**

(Supt/Ks Assoc. Prof. Madya Dr. Shariff A. K. Omang)



PENGHARGAAN

Alhamdulillah dengan berkat Limpah dan Kurnia dari Nya, saya telah berjaya menyiapkan disertasi ini. Terlebih dahulu, jutaan terima kasih saya kalungkan kepada penyelia saya iaitu Dr. Noumie Surugau kerana telah banyak membantu dan memberi tunjuk ajar kepada saya, di sepanjang proses penyiapan disertasi ini.

Teristimewa buat kedua Ibu Bapa saya yang telah banyak memberi sokongan dan bantuan dari segi kewangan di samping sentiasa memberi dorongan dan semangat kepada saya untuk terus berusaha bersungguh-sungguh dalam menyudahkan tugas ini.

Tidak dilupakan buat pembantu-pembantu makmal serta rakan-rakan seperjuangan yang banyak membantu samaada secara langsung ataupun secara tidak langsung. Sekali lagi, jutaan terima kasih saya ucapkan. Tanpa kalian, belum tentu tugas ini dapat disempurnakan dengan mudah.

Jasa kalian akan sentiasa saya kenang selagi hayat dikandung badan.

Sekian, Terima Kasih.

ROHAIZAH ERNNIESHAH BT SABTURANI



ABSTRAK

Analisis sebatian saccharin dalam larutan piawai dengan kepekatan 5 µg/ml hingga 100 µg/ml dan dua belas sampel minuman ringan telah dilakukan menggunakan Kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). Analisis menggunakan HPLC dilakukan dengan menggunakan larutan fasa bergerak yang terdiri daripada air:asetonitril (87:13), dimana masing-masing mengandungi 0.04 % trifluoro asetik asid (TFA). Berdasarkan kepada kromatogram larutan piawai saccharin bagi enam jenis kepekatan yang berbeza, satu graf kalibrasi yang linear ($R^2 = 1$) telah diperoleh untuk julat kepekatan larutan piawai yang dipilih. Perbandingan kromatogram larutan piawai dengan kromatogram sampel menunjukkan ketidakhadiran saccharin dalam semua sampel minuman ringan yang telah digunakan dalam analisis.



ABSTRACT***Determination of saccharin in selected soft drinks using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

The analysis of saccharin compound in standard solutions with concentrations 5 µg/ml to 100 µg/ml and in twelve soft drinks samples were carried out by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The mobile phase used in this analysis was water:acetonitrile (87:13). Both solutions containing 0.04 % trifluoro acetic acid (TFA). For the standard solutions a linear relationship (R^2) was obtained between saccharin concentration and peak height. Comparation of standard solutions chromatogram with samples chromatogram showed the absent of saccharin in all the soft drink samples analyzed.

SENARAI KANDUNGAN

PERKARA	HALAMAN
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.1.1 Saccharin	1
1.1.2 Minuman ringan	1
1.2 Objektif kajian	2
1.3 Skop kajian	2
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	
2.1 Pendahuluan	3
2.2 Saccharin	4
2.2.1 Ciri-ciri saccharin	4
2.2.2 Sejarah penemuan saccharin	5
2.2.3 Saccharin dan sifat kemanisannya	5
2.2.4 Saccharin dan kesihatan	7



PERKARA	HALAMAN
2.3 Kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)	8
2.3.1 Pengenalan dan sejarah HPLC	8
2.3.2 Teori operasi dalam HPLC	10
a. Fasa bergerak	10
b. Fasa pegun	12
c. Penyuntik HPLC	13
d. Pengesan HPLC	13
e. Pam HPLC	14
2.4 Kajian terdahulu	15
 BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	
3.1 Bahan kimia dan alat radas	18
3.2 Penyediaan alat radas	19
3.3 Penyediaan larutan	20
3.3.1 Sampel minuman	20
3.3.2 Larutan piawai saccharin	21
3.3.3 Larutan fasa bergerak	21
3.4 Analisis HPLC	22
3.5 Perolehan data	22
 BAB 4 HASIL DAN PERBINCANGAN	
4.1 Larutan piawai saccharin	23
4.1.1 Kelinearan graf kalibrasi larutan piawai	
Saccharin	26
4.1.2 Analisis kualiti kromatografik sebatian saccharin	29
a. Bentuk puncak sebatian saccharin	29
b. Keboleh-ulangan masa penahanan	30
c. Keboleh-ulangan ketinggian puncak	31



PERKARA	HALAMAN
4.2 Analisis sampel minuman	33
4.2.1 Perbandingan kromatogram antara sampel dan larutan piaawai saccharin	33
4.2.2 Perbandingan kromatogram antara sampel a. Sampel coca-cola, vanilla coke dan diet coke b. Sampel pepsi, pepsi light dan pepsi max	39
4.2.3 Bentuk puncak kromatogram sampel analisis	42
4.2.4 Andaian tentang ketidakhadiran sebatian saccharin dalam kesemua sampel analisis	43
4.3 Peranan larutan fasa bergerak pilihan	44
 BAB 5 KESIMPULAN	 47
 RUJUKAN	 49
 LAMPIRAN	
A. PENGIRAAN PENYEDIAAN LARUTAN PIAWAI SACCHARIN (5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 100 ppm).	
B. NILAI BACAAN MASA PENAHANAN SERTA NILAI PERATUS SISIHAN PIAWAI RELATIF BAGI 3 REPLIKAT LARUTAN PIAWAI SACCHARIN.	
C. NILAI BACAAN KETINGGIAN PUNCAK SERTA NILAI PERATUS SISIHAN PIAWAI RELATIF BAGI 3 REPLIKAT LARUTAN PIAWAI SACCHARIN.	
D. SISIHAN PIAWAI RELATIF	



SENARAI JADUAL

NO. JADUAL	HALAMAN
2.4 Jenis-jenis fasa bergerak	11
2.5 Jenis-jenis fasa pegun	12
2.6 Jenis-jenis pam HPLC	14
3.1 Senarai bahan kimia yang digunakan	18
3.2 Senarai alat radas yang digunakan	19
4.7 Keputusan analisis HPLC larutan piawai saccharin	26
4.11 Nilai % sisihan piawai relatif bagi masa penahanan sebatian saccharin	31
4.12 Nilai % sisihan piawai relatif bagi ketinggian puncak sebatian saccharin	32
4.25 Puncak-puncak sampel analisis yang hadir pada masa penahanan di antara sekitar 4.0 hingga 5.0 minit pertama analisis	38



SENARAI RAJAH

NO.RAJAH	HALAMAN
2.1 Struktur molekul saccharin	4
2.2 Struktur molekul saccharin dan terbitannya	6
4.1 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 5 ppm	23
4.2 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 10 ppm	24
4.3 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 20 ppm	24
4.4 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 30 ppm	24
4.5 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 60 ppm	25
4.6 Graf kromatogram larutan piawai saccharin 100 ppm	25
4.8 Graf kalibrasi ketinggian puncak melawan kepekatan larutan piawai saccharin	27
kepekatan larutan piawai saccharin.	28
4.10 Graf kalibrasi luas kawasan puncak dibetulkan melawan kepekatan larutan piawai saccharin	29
4.13 Graf kromatogram sampel coca-cola	33
4.14 Graf kromatogram sampel vanilla coke	34
4.15 Graf kromatogram sampel diet coke	34
4.16 Graf kromatogram sampel pepsi	34
4.17 Graf kromatogram sampel pepsi light	35
4.18 Graf kromatogram sampel pepsi max	35



NO. RAJAH	HALAMAN
4.19 Graf kromatogram sampel aiskrim soda	35
4.20 Graf kromatogram sampel 7 up	36
4.21 Graf kromatogram sampel sirap ros	36
4.22 Graf kromatogram sampel 100 plus	36
4.23 Graf kromatogram sampel sprite	37
4.24 Graf kromatogram sampel f&n stawberi	37



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

1.1.1 Saccharin

Saccharin merupakan sejenis gula tiruan yang digunakan sebagai pengganti gula atau sukrosa dalam banyak produk makanan dan minuman. Saccharin telah ditemui pada Tahun 1879 dan menjadi keluaran komersial pada tahun 1900 (Wikipedia, 1997). Gula tiruan ini telah dibuktikan adalah 300-450 kali lebih manis daripada gula sebenar (Grenby, 1989).

Saccharin telah menjadi gula alternatif bagi pesakit-pesakit diabetis dalam makanan dan minuman mereka. Ini kerana sifat saccharin yang rendah kalori dapat membantu mengurangkan kandungan kalori dan karbohidrat dalam tubuh pesakit.

1.1.2 Minuman Ringan

Perkataan ‘minuman ringan’ digunakan untuk membezakan minuman tanpa alkohol daripada minuman jenis arak atau minuman keras (Murano, 2003). Minuman



ringan yang banyak didapati di pasaran pada masa kini kebiasaannya mengandungi agen pemanis, asid yang boleh dimakan serta perasa asli atau tiruan. Tujuan penggunaan bahan-bahan ini adalah sebagai salah satu cara untuk menambahkan keenakan dan meningkatkan mutu sesuatu produk minuman tersebut. Namun penggunaan bahan awet, perasa dan pemanis tiruan yang berlebihan dalam minuman akan memberi kesan terhadap kesihatan. Melalui penilaian dan kajian yang dilakukan ini, diharap masyarakat akan menjadi lebih prihatin dan berfikiran terbuka serta dapat membuat penilaian sendiri mengenai pengambilan minuman dan makanan yang selamat untuk kesihatan diri.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif kajian ini adalah untuk menentukan kandungan saccharin iaitu sejenis gula tiruan dalam dua belas jenis minuman ringan menggunakan alat Kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC).

1.3 SKOP KAJIAN

Kajian ini ditumpukan kepada dua belas jenis minuman ringan berkarbonat kegemaran ramai yang banyak terdapat di pasaran. Ujian dijalankan pada semua sampel untuk mengenalpasti kehadiran sebatian saccharin yang terkandung dalam setiap sampel untuk mengenalpasti kehadiran sebatian saccharin yang terkandung dalam setiap sampel tersebut. Kaedah ini merangkumi penyediaan larutan piawai saccharin, pengendalian instrumen HPLC, pemplotan graf larutan piawai saccharin serta perbandingan data kromatogram sampel analisis dengan graf kalibrasi larutan piawai saccharin.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 PENDAHULUAN

Pemanis alternatif sering dikaitkan dengan pesakit-pesakit diabetis, individu yang menjaga berat badan dan bentuk tubuh serta mereka yang mengambil berat tentang kesihatan gigi bagi mengelakkan pereputan pada gigi. Lumrah sebagai manusia biasa, kita lebih menggemari makanan atau minuman yang mempunyai rasa manis. Namun, bagi golongan-golongan yang disebut tadi, pengambilan sukrosa atau gula yang tinggi dalam tabiat pemakanan seharian akan meningkatkan tahap kalori dalam tubuh dan secara tidak langsung akan memudaratkan kesihatan.

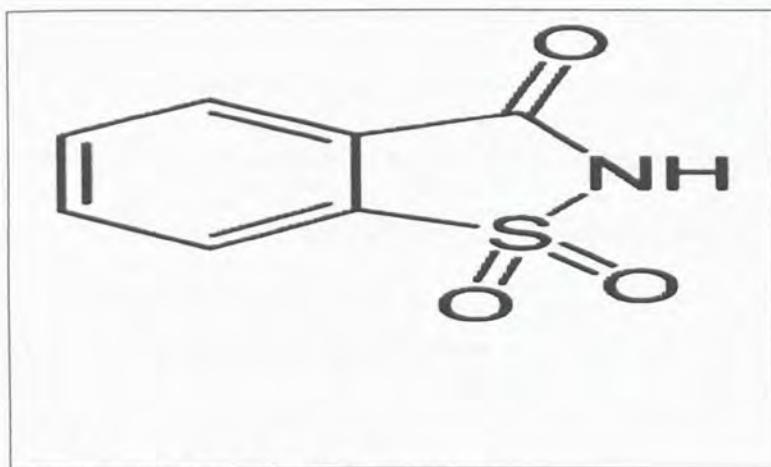
Bahan atau agen pemanis boleh dikategorikan kepada dua iaitu bernutrisi yang mana ianya mengandungi kalori, dan tidak bernutrisi iaitu tidak mengandungi kalori (Nabors, 2002). Gula tiruan merupakan pemanis yang tidak bernutrisi yang mempunyai rasa manis seperti sukrosa tetapi berbeza cara metabolismnya serta menyumbang sedikit dan hampir tiada kalori pada makanan atau minuman (Murano, 2003). Aspartame, acesulfame-K, sucralose dan saccharin merupakan contoh-contoh bagi pemanis tiruan yang sering digunakan pada masa kini.



2.2 SACCHARIN

2.2.1 Ciri-Ciri Saccharin

Rajah 2.1 di bawah merupakan struktur molekul bagi saccharin.



Rajah 2.1 : Struktur Molekul Saccharin

Sumber: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Saccharin-2D-skeletal.png>

Saccharin merupakan salah satu penemuan terpenting dan sangat berguna terutamanya pada masyarakat yang mempunyai masalah kesihatan yang berkaitan dengan kandungan gula atau kalori dalam tubuh. Seperti yang telah dinyatakan sebelum ini, saccharin merupakan sejenis gula tiruan rendah kalori yang mempunyai rasa manis 300-450 kali lebih daripada sukrosa. Sifat ini merupakan salah satu sebab mengapa saccharin dipilih menjadi gula tiruan pertama yang dikeluarkan secara komersial bersama cyclamate (Nabors,2002).

Jika dibandingkan dengan gula tiruan yang baru ditemui seperti aspartame, saccharin adalah lebih stabil apabila dipanaskan dan mahupun dalam kehadiran asid, saccharin tidak akan bertindak balas secara kimia terhadap bahan-bahan lain dalam makanan dan ianya akan tersimpan dengan baik (Murano, 2003).

Saccharin dikatakan sebagai gula tiruan yang rendah kalori kerana saccharin tidak di metabolismakan di dalam tubuh untuk tenaga. Sacharin akan terus ke sistem penghadaman manusia tanpa dihadam terlebih dahulu, disamping ianya tidak mempengaruhi level insulin dalam darah (Wikipedia, 2007).

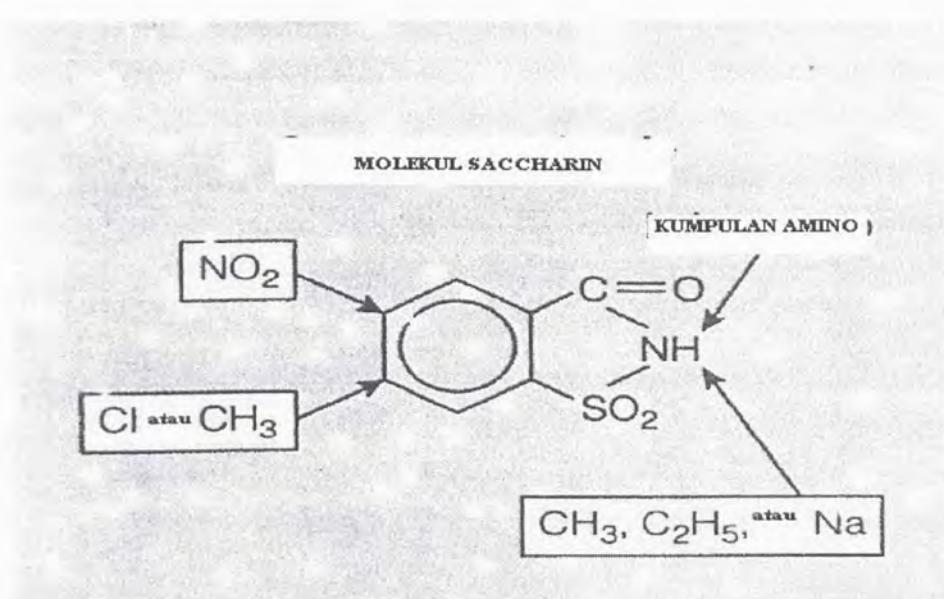
2.2.2 Sejarah Penemuan Saccharin

Sifat unik saccharin ini ditemui pada Tahun 1879 oleh seorang professor di John Hopkins University iaitu Ira Remsen dan rakanya Constantin Fahlberg (Remsen & Fehlberg, 1879). Seperti yang diceritakan dalam laporan penemuan mereka, Remsen yang tidak membasuh tangan dengan sebaiknya setelah dengan tidak sengaja menumpahkan bahan kimia ke atas tangannya, mendapati makanan makan malam yang dinikmatinya pada hari tersebut, adalah lebih manis daripada biasa. Perkara ini terlebih dahulu berlaku pada Fahlberg sewaktu menikmati makanan tengaharnya pada hari yang sama.

2.2.3 Saccharin dan Sifat Kemanisannya

Jawapan bagi persoalan bagaimana saccharin boleh mempunyai rasa yang sangat manis, masih belum dapat dijelaskan secara terperinci. Namun, yang pastinya bentuk atau kedudukan kumpulan berfungsi pada saccharin perlu berada pada kedudukan yang betul

dan sesuai pada kawasan reseptornya (Murano, 2003). Rajah 2.2 menunjukkan struktur molekul saccharin dan terbitannya.



Rajah 2.2: Struktur Molekul Saccharin dan Terbitannya.

Sumber: Murano, 2003

Berpandukan pada Rajah 2.2, dengan meletakkan metil atau kumpulan klorida pada kedudukan para, ini akan mengurangkan rasa manis saccharin. Manakala dengan meletakkan kumpulan nitro pada kedudukan meta, ini akan menyebabkan saccharin menjadi lebih pahit. Penggantian metil (CH_3) dan etil (C_2H_5) pada kumpulan amino (NH), membuatkan molekul ini tidak mempunyai rasa. Namun, dengan menambahkan kumpulan sodium pada amino tersebut, akan menjadikan saccharin mempunyai rasa yang sangat manis (Murano, 2003).

2.2.4 Saccharin dan Kesihatan

Dalam keghairahan masyarakat dengan keistimewaan saccharin ini, timbul beberapa persoalan dan kontroversi tentang keselamatan pengambilannya dalam makanan dan minuman berikutan pernyataan yang menyatakan saccharin mampu menyebabkan kanser (Weihrauch & Diehl, 2004).

Weihrauch & Diehl (2004), menambah pada tahun 1960-an pelbagai kajian telah dijalankan ke atas saccharin untuk membuktikan perkaitannya dengan kanser terutamanya kanser pundi kencing. Andaian ini berlaku berikutan dengan beberapa ekor tikus kajian yang menghidapi kanser pundi kencing apabila diberikan saccharin pada dos yang tinggi dalam makanan mereka.

Disebabkan andaian tersebut juga, Jabatan Makanan dan Dadah Amerika Syarikat (FDA) telah mengharamkan penggunaan saccharin di Amerika Syarikat pada tahun itu (Weihrauch & Diehl, 2004). Pada waktu itu, saccharin merupakan satu-satunya gula tiruan yang ada dan digunakan oleh masyarakat mereka. Namun pengharaman ini, mendapat tentangan hebat daripada masyarakat tersebut terutamanya daripada pesakit-pesakit diabetis dan ini menyebabkan Kongress Amerika Syarikat mengeluarkan arahan untuk meletakkan label amaran keselamatan tentang penggunaan saccharin, pada setiap bungkusan produk yang mengandungi saccharin.

Namun dalam kajian lanjutan yang dilakukan, tidak ada bukti yang dapat mengesahkan bahawa pengambilan saccharin dalam dos yang tinggi dapat menyebabkan

kanser seperti yang didakwa sebelumnya (Weihrauch & Diehl, 2004). Pernyataan ini turut disokong dari aspek biologi iaitu perbezaan dalam sistem urin manusia dan tikus. Tempoh penyimpanan urin dalam pundi kencing pada tikus adalah lebih lama berbanding manusia dan ini menyebabkan bahan buangan termasuk kumuhan saccharin berada di dalamnya dalam jangka masa yang panjang.

Beberapa ujian dan kajian usulan yang dilakukan seterusnya turut memberikan hasil yang sama dimana tidak terdapat perkaitan antara saccharin dan sel kanser *carcinogen* seperti yang didakwa (Weihrauch & Diehl, 2004). Ini membuatkan saccharin terus digunakan dan menjadi asas pada semua jenis gula tiruan yang rendah kalori dan gula bagi kebanyakan produk di seluruh dunia.

2.3 KROMATOGRAFI CECAIR BERPRESTASI TINGGI (HPLC)

2.3.1 Pengenalan dan Sejarah HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merupakan sebuah alat yang terdiri daripada turus kromatografi yang kerap digunakan dalam bidang biokimia dan kimia analisis. HPLC juga kadang-kala dikenali sebagai *High Pressure Liquid Chromatography* (Bidlingmeyer & Warren, 1984). HPLC berfungsi untuk memisahkan komponen-komponen yang terkandung dalam sesuatu campuran dengan menggunakan pelbagai interaksi kimia di antara analit dan turus kromatografinya.

Pada awal tahun 1970-an, beberapa kaedah kromatografi yang diyakini telah digunakan secara komersial oleh saintis di dalam makmal. Pada waktu tersebut, kebanyakan pemisahan secara kimia dilakukan menggunakan pelbagai teknik termasuklah turus terbuka kromatografi, kertas kromatografi dan juga lapisan nipis kromatografi. Namun teknik-teknik tersebut masih tidak memadai untuk pemisahan secara kuantitatif bagi sebatian yang hampir sama sifatnya (Williams *et al.*, 1998).

Pada waktu tersebut HPLC digunakan dan terus berkembang serta mengalami peningkatan dari segi teknologinya selari dengan perkembangan penemuan material bagi turus serta alat pengesan HPLC. Pada akhir 1970-an, kaedah-kaedah baru termasuklah kromatografi cecair fasa berbalik digunakan dalam mengatasi kelemahan HPLC sebelumnya untuk pemisahan di antara sebatian-sebatian yang hampir sama sifatnya (Williams *et al.*, 1998).

Pada tahun 1980-an kemudiannya HPLC terus digunakan sebagai kaedah pilihan dalam pemisahan-pemisahan sebatian kimia. Teknik-teknik baru telah mempertingkatkan lagi HPLC dari segi pemisahan, pengenalpastian, pembersihan serta pengkuantitian dari masa ke semasa (Williams *et al.*, 1998). Perisian komputer serta automasi di tambah pada HPLC selaras dengan penemuan jenis-jenis turus alternatif seperti turus mikro dan turus affiniti, dan semua faktor ini telah menyumbang pada kewujudan alat HPLC yang moden, cepat, mudah dan effisien yang ada pada masa kini.

2.3.2 Teori Operasi HPLC

Prinsip asas operasi HPLC adalah ‘memaksa’ analit melalui di sepanjang turus iaitu fasa pegun dengan mengepam cecair iaitu fasa bergerak pada tekanan tinggi di sepanjang turus HPLC. Sampel analisis di ambil dalam kuantiti kecil kemudian diletakkan pada aliran fasa bergerak dan seterusnya dibantutkan oleh bahan kimia tertentu ataupun berlaku interaksi fizikal dengan fasa pegun sewaktu analit mengalir di sepanjang turus (Xiang *et al.*, 2006).

Xiang *et al.* (2006), menambah jumlah pembantutan yang akan berlaku bergantung kepada sifat semulajadi analit, fasa pegun serta komposisi fasa bergerak. Masa dimana analit tertentu ‘keluar’ pada hujung turus diambil kira sebagai pengenalpastian ciri unik yang munasabah bagi sampel yang di analisis. Penggunaan tekanan tinggi pada HPLC bertujuan untuk menambahkan kelinearan bagi kelajuan sampel seterusnya mengurangkan masa penyebaran komponen-komponen analit sepanjang turus di samping memberikan kromatogram yang jelas.

a. Fasa bergerak

Fasa bergerak dalam HPLC merujuk kepada pelarut yang digunakan secara berterusan pada turus atau fasa pegun. Fasa bergerak bertindak sebagai ‘pembawa’ kepada larutan sampel. Apabila larutan sampel mengalir melalui turus bersama dengan fasa bergerak, semua komponen di dalam larutan akan mengalami migrasi berpandukan kepada interaksi bukan kovalen pada sebatian dengan turus (Snyder *et al.*, 1983).

Snyder *et al.* (1983), turut menyatakan bahawa interaksi kimia yang berlaku di antara fasa bergerak dengan sampel dan juga turus, dapat mengesan darjah migrasi dan pemisahan sebatian yang terkandung di dalam sampel. Sebagai contoh, sampel yang mempunyai interaksi yang kuat bersama fasa bergerak berbanding fasa pegun akan keluar dari turus lebih cepat dan mempunyai masa penahanan yang lebih pendek. Walaubagaimanapun, fasa bergerak boleh diubah-ubah dalam tujuan memanipulasi interaksi pada sampel dan fasa pegun. Terdapat beberapa jenis fasa bergerak yang terdapat pada HPLC (Jadual 2.4).

Jadual 2.4: Jenis-jenis fasa bergerak

Elusi isokratik	Sebatian akan keluar menggunakan pemalar dalam komposisi fasa bergerak. Semua sebatian akan mula bermigrasi melalui turus dalam setnya. Namun setiap migrasi berada pada kadar berbeza. Kaedah ini adalah ringkas dan murah, namun hasil output bagi beberapa sebatian agak kurang jelas dan masa penahanan yang diperoleh kadang kala tidak memuaskan.
Elusi gradien	Sebatian yang berbeza akan terasing dengan kenaikan ‘kekuatan’ dalam pelarut organik. Sampel disuntik ketika fasa bergerak yang ‘lemah’ digunakan pada sistem. Kekuatan fasa bergerak kemudiannya ditambahkan dengan menambahkan kepekatan pelarut organik.
Fasa bergerak politiptik	Kaedah ini kadang-kala dirujuk sebagai mod campuran kromatografi. Kaedah ini versatil di mana beberapa jenis teknik kromatografi atau mod boleh digunakan dalam turus yang sama. Turus ini dilengkapi resin hidrofobik liang makro terlakur secara kovalen pada lapisan organik hidrofiliknya.

Sumber : Snyder *et al.*, 1983.

RUJUKAN

Armenta, s., Garrigues, S., Guardia, M.D.L., 2004. Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis. *Analytica Chimica Acta* vol **521**, 149-155.

Bidlingmeyer, B.A., Warren, F.V.Jr., 1984. *Analytical chemistry*. Vol 56. 4th Ed. Kluwer Academic-Plenum-Human science, New York, 1583-96.

Delaney, M.F., Gsell, D.S., Korologos, P.C., Mauro, D.M and Pasko, K.M., 1985. Determination of Aspartame, caffeine, saccharin and benzoic acid in beverages by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chemical Education* **62**, 618-620.

Eggers, S.C., Acree, T.E., Shallberger, R.S., 2000. Sweetnes chemoreception theory and sweetness transduction. *Food Chemistry* **68**, 45-49.

Felinger, A., Guiochon, G., 2001. Validation of a chromatography data analysis software. *Journal of Chromatography A* vol **913** (1-2): 221-231.

Grenby, T.H., 1989. *Progress in sweetners*. 2nd Edition. Elsevier Applied Science, London.

Kamelesen, L., 2007. *Determination of caffeine content in selected soft drinks*. Disertasi Sarjana Muda Sains, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu (Tidak diterbitkan).

March, J., *Advanced organic chemistry: Reactions, mechanism, and structure*. 6th Ed. Wiley Pub., New York.

Murano, P.S., 2003. *Understanding food science & technology*. Thomson Learning, USA, 175-176.

Nabors, L.O.B., 2002. Sweet choices: Sugar replacement for foods and beverages. *Food Technology* **56**, 28-34.

Remsen, I., Fahlberg, C., 1879. "Uber die oxidation des orthotoluolsulfamids". *Chemische Berichte* **12**, 469-473.

Saccharin-Wikipedia, the free encyclopedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharin>.

Snyder, L.R., Stadalius, M.A., Quarry, M.A., 1983. Mobile_Phase. *Analytical Chemistry* **Vol 55**, 1412-30.

Soga, T., Serwe, M., 2000. Determination of carbohydrates in food sample by Capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry* **69**, 339-344.

Sombrab, L.L., Maria R.G., Roberto, O., Luis, D.M., and Maria, F.S., 2005. Comparative study between Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography in ‘guarana’ based phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36**, 989-994.

Wasik, A., Mc Court, J., Buchgraber, M., 2007. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in food stuffs by High Performance Liquid Chromatography and evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD)-Development and single-laboratory validation. *Journal of chromatography A* **1157**, 187-196.

Weihrauch, M.R., Diehl, V., 2004. Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology* **15**(10): 1460-1465.

Willard, H., Merrit, L., Dean, J.A., Settle Jr., 1988. *Instrumental Methods of Analysis*, 7th Ed. Wadsworth Publishing Co, London.

Williams, K.R., Mcdevitt, V.L., and Rodriguez, A., 1998. Analysis of soft drinks: UV Spectrophotometry, Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Journal of Chemical Education* **75**, 625-629.

Xiang, Y., Liu, Y., Lee, M.L., 2006. High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1104** (1-2): 198-202.