

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR VITAMIN C EKSTRAK DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum* L.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Evi Kurniawati^{1*}, Tri Puji Lestari²

Fakultas Farmasi Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri

¹Email*: evi.kurniawati@iik.ac.id

²Email: tri.lestari@iik.ac.id

ABSTRAK

Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) termasuk jenis tumbuhan liar yang mudah ditemukan. Kemangi diketahui bersifat analgetik, antihiperlipid dan memiliki sifat antioksidan. Selain itu kemangi juga dikenal dapat mengobati penyakit lambung dan hati. Komponen yang diketahui terdapat pada tanaman kemangi diantaranya adalah flavonoid, alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid, tanin dan fenol serta vitamin C, yaitu vitamin yang dibutuhkan oleh seseorang agar mampu menjalankan metabolisme dengan baik dan perkembangan yang normal. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk menguji validasi metode penetapan kadar vitamin C yang diperoleh dari ekstrak daun kemangi. Filtrat daun kemangi dilakukan identifikasi vitamin C dengan reaksi warna dan kemudian ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri Uv-Vis yang sebelumnya divalidasi dengan parameter akurasi, presisi, linearitas dan selektivitas. Sesuai hasil penelitian diketahui bahwa uji akurasi memenuhi rentang persen perolehan kembali pada kisaran 98-102%, uji presisi menghasilkan RSD kurang dari 2%, uji linearitas menghasilkan nilai korelasi (r) = 0.9986 dan uji selektivitas baik. Metode penetapan kadar vitamin C secara spektrofotometri Uv-Vis tervalidasi pada parameter yang memenuhi persyaratan sebesar 0,0128% b/b.

Kata kunci: Daun Kemangi, Vitamin C, Spektrofotometri Uv-Vis, Validasi metode

ABSTRACT

*Basil leaves (*Ocimum sanctum* L.) are a type of wild plant that easy to find. Basil is known to be analgesic, antihyperlipid and has antioxidant properties. Besides, basil is also known to treat stomach and liver diseases. Components known to be found in basil plants include flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenoids, steroids, tannins, phenols and vitamin C, that is needed by a person to be able to carry out metabolism properly and develop normally. The aim of the research to validate the determination of vitamin C levels from basil leaf extract. The basil leaf filtrate was identified for vitamin C by a color reaction and then the levels were determined by UV-Vis spectrophotometry which was previously validated with the parameters of accuracy, precision, linearity and selectivity. According to the research results, it is known that the accuracy test meets the percent recovery range in the range of 98-102%, the precision test produces an RSD of less than 2%, the linearity test produces a correlation value (r) = 0.9986 and the selectivity test is*

good. The method for determining vitamin C levels by Uv-Vis spectrophotometry was validated on parameters that met the requirements of 0.0128% w/w.

Keywords: *Basil Leaves, Vitamin C, Spectrophotometry Uv-Vis, Method validation*

PENDAHULUAN

Daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) adalah tanaman aromatik yang banyak ditemui di daerah tropis termasuk Indonesia (1). Penggunaan daun kemangi yang paling populer adalah sebagai penambah cita rasa makanan, dan banyak digunakan sebagai sayur atau lalap (2). Padahal sebenarnya daun kemangi telah lama diketahui memiliki manfaat dalam pengobatan tradisional, seperti pereda sakit kepala, antimalaria dan antikejang (3). Berdasarkan data yang telah diperoleh sebelumnya, daun kemangi diketahui mengandung sejumlah besar senyawa biologis dengan sifat penyembuhan yang kuat. Kemangi mengandung minyak atsiri dengan komposisi kimia yang bervariasi, klorofil, vitamin C, karotenoid dan berbagai senyawa fenol dengan aktivitas antioksidan yang bervariasi, tergantung pada spesies dan varietasnya (4), (5). Kemangi banyak digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai tonik pencernaan dan untuk menyembuhkan

penyakit seperti radang, pilek dan sakit kepala (6). Ekstrak kemangi diketahui memiliki sifat sedatif dan antikonvulsan (7), aktivitas anti mikroba dan antijamur(8), serta bersifat sebagai antioksidan (9).

Asam askorbat atau Vitamin C merupakan vitamin yang berfungsi memelihara sistem imun untuk mencegah berbagai penyakit. Selain itu vitamin C juga berperan dalam pembentukan kolagen dan hormon, serta berkontribusi dalam penyerapan zat besi (10). Vitamin C juga terlibat pada banyak proses metabolisme dalam tubuh. Diantaranya sintesis kolagen, karnitin, noradrenalin, dan serotonin. Selain itu, membantu absorpsi dan metabolisme zat besi serta kalsium, mencegah infeksi, membantu pencegahan penyakit kanker, dan kardiovaskuler. Peran vitamin C dalam tubuh berkaitan dengan kemampuannya dalam berperan sebagai antioksidan (11).

Secara umum metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi vitamin C dapat dilakukan

dengan berbagai metode analisis seperti volumetri, kolorimetri, spektrofotometri, kromatografi, dan spektrofotometri (12). Spektrofotometri merupakan metode yang cukup mudah diterapkan dalam menentukan kadar analit dalam konsentrasi yang rendah, selain itu metode ini juga dapat dilakukan secara cepat dengan akurasi yang cukup baik (13). Vitamin C dapat diuji dengan metode spektrofotometri Uv-Vis karena strukturnya memiliki gugus fungsional yang pada panjang gelombang UV dan visibel ketika berikatan dengan gugus auksokrom akan mampu mengabsorpsi radiasi elektromagnetik (14). Berdasarkan uraian tersebut, diperlukan studi tentang validasi penetapan kadar vitamin C dengan parameter akurasi, presisi, linearitas dan selektivitas. Metode spektrofotometri Uv-Vis yang divalidasi kemudian diaplikasikan untuk menentukan konsentrasi vitamin C pada filtrat daun kemangi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang dibutuhkan meliputi spektrofotometri UV-Vis

(Shimadzu UV-1780), timbangan analitik (Mettler Toledo), labu ukur, kertas saring, beaker glass, pipet volume, pipet ukur, push ball, pengaduk kaca, corong kaca.

Bahan yang dibutuhkan yaitu daun kemangi yang diperoleh di daerah Nganjuk, Jawa Timur. Akuades sebagai blanko, larutan standar asam askorbat, dan besi (III) klorida.

Prosedur Kerja

Determinasi

Tanaman daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) dideterminasi di Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri.

Preparasi Sampel

Sampel daun kemangi dicuci bersih dengan air mengalir kemudian ditiriskan, dihaluskan, ditimbang sebanyak 100 gram, diperas dengan kain flanel dan difiltrasi dengan kertas saring sehingga diperoleh sampel (15).

Uji Kualitatif

Sebanyak 5 mL larutan sampel ditambahkan dengan besi (III) klorida dalam tabung reaksi terbentuk warna ungu yang menandakan adanya kandungan vitamin C (16).

Uji Kuantitatif

Pembuatan Larutan Induk

25 mg asam askorbat ditimbang, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam labu ukur dan dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades (17).

Pembuatan Larutan Baku Seri

Dibuat deret larutan baku seri dengan kadar 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm yang diencerkan dari larutan baku induk 100 ppm. Larutan baku dipipet 1; 1,5; 2; 2,5 dan 3 mL, dan dilarutkan dalam 25 mL akuades dalam labu ukur.

Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum Larutan Vitamin C

Larutan baku induk 100 ppm dipipet 1 mL, dilarutkan dan dicukupkan dengan akuades sampai volume 25 mL dalam labu ukur. Serapan maksimum diukur pada rentang λ 200-400 nm dengan blanko akuades (18).

Pembuatan Kurva Baku

Deret larutan baku seri dengan kadar 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm ditentukan absorbansinya pada λ maksimum yang telah diperoleh (18).

Validasi Metode Analisis

Akurasi

Parameter akurasi diukur dengan menggunakan metode adisi

dengan penambahan baku pada konsentrasi 80, 100, dan 120%.

Dihitung terlebih dahulu konsentrasi sampel 100% dengan menggunakan satu konsentrasi larutan baku sesuai dengan rumus berikut:

$$C_{\text{sampel}} = \frac{\text{Abs. sampel}}{\text{Abs. baku}} \times C_{\text{baku}}$$

Berdasarkan hasil perhitungan diketahui bahwa konsentrasi sampel adalah 2,98 ppm, sehingga konsentrasi 80 dan 120% dapat dihitung dari konsentrasi 100% tersebut. Selanjutnya absorbansi diukur dengan λ maksimum, dan dihitung persen perolehan kembali.

Presisi

Larutan baku seri dengan konsentrasi 6 ppm ditentukan absorbansinya pada λ maksimum. Pengujian dilakukan dengan enam kali pengulangan dan dianalisis pada waktu yang bersamaan untuk mendapatkan keterulangan. Kemudian ditentukan RSD nya.

Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan bersamaan dengan pembuatan kurva baku pada deret larutan baku seri yang sama, yaitu pada kadar 4, 6, 8, 10 dan

12 ppm. Absorbansi ditentukan dengan menggunakan λ maksimum dan kemudian ditentukan nilai r .

Selektivitas

Disiapkan dengan melarutkan masing-masing 1 gram vitamin C dan asam sitrat dengan 100 mL akuades dalam labu sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm. Kemudian disiapkan larutan yang terdiri dari campuran vitamin C dan asam sitrat. Absorbansi larutan campuran diukur ulang dengan spektrofotometer UV-Vis.

Pengukuran Kadar Vitamin C

Filtrat daun kemangi diukur 1 mL, dicampurkan dengan akuades dalam labu ukur hingga mencapai 100 mL. Absorbansi diukur pada λ maksimum dengan akuades sebagai larutan blanko dan asam askorbat sebagai larutan baku. Data yang didapatkan dimasukkan dalam persamaan regresi yang telah didapatkan sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi

Tanaman daun kemangi yang diujikan di Laboratorium Biologi Farmasi Institut Ilmu Kesehatan

Bhakti Wiyata Kediri, membuktikan bahwa tanaman yang diuji ini adalah benar tanaman kemangi (*Ocimum sanctum* L.). Determinasi memiliki tujuan untuk menjamin kebenaran bahwa tanaman yang akan digunakan sebagai sampel adalah sesuai dan akurat (19).

Uji Kualitatif

Berdasarkan analisis uji kualitatif vitamin C dari sampel filtrat daun kemangi dapat diketahui bahwa daun kemangi terdapat kandungan vitamin C sesuai dengan yang ditampilkan pada Tabel I berikut ini.

Tabel I. Hasil uji kualitatif Vitamin C

Pengujian	Hasil (+) Literatur	Hasil Pengujian	Ket
Filtrat +FeCl ₃	Warna ungu	Warna ungu	(+)

Keterangan:

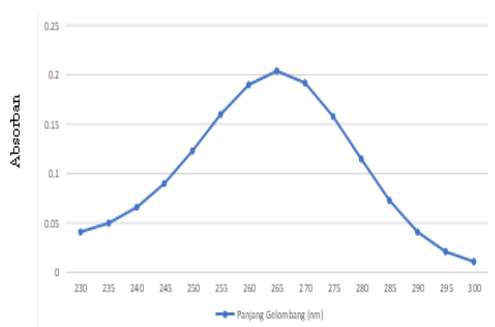
(+): Positif mengandung vitamin C

Timbulnya warna ungu pada sampel disebabkan karena terjadinya reduksi ion besi (III) dari FeCl₃ menjadi besi (II) karena keberadaan asam askorbat yang memiliki sifat reduktor kuat. Ketika suasana basa, proses ini menyebabkan terbentuknya asam dehidroaskorbat.

Uji Kuantitatif

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Berdasarkan Gambar I dapat diketahui bahwa larutan baku seri 4 ppm memiliki absorbansi tertinggi yaitu 0,204 pada panjang gelombang (λ) 265 nm. Sehingga untuk pengukuran selanjutnya digunakan panjang gelombang 265 nm. Vitamin C dalam strukturnya terdapat gugus kromofor, sehingga sesuai dengan prinsip pengujian spektrofotometer Uv-Vis maka vitamin C akan dapat langsung diukur pada λ maksimum 265 nm (20). Penentuan λ maksimum vitamin C harus ditetapkan karena λ suatu molekul atau senyawa bisa berubah jika dianalisis dengan menggunakan instrumen dan kondisi yang berbeda.



Gambar I. Penentuan λ maksimum
 Pada λ maksimum akan diperoleh sensitivitas analisis yang maksimum serta pada pengulangan pengukuran akan terjadi kesalahan terkecil sehingga pada Panjang gelombang ini dapat dipergunakan untuk mengukur

sampel dengan kadar yang rendah (21). Panjang gelombang 265 nm identik dengan panjang gelombang yang dihasilkan peneliti terdahulu oleh Damayanti (14) dan Dewi (22) menyebutkan bahwa panjang gelombang yang dihasilkan adalah 265 nm.

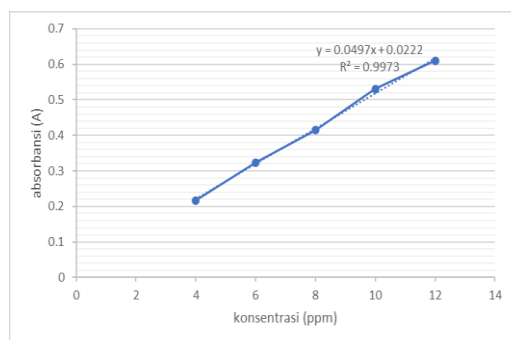
Pembuatan Kurva Baku dan Linearitas

Deret larutan baku seri vitamin C pada kadar 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm diukur serapannya pada λ 265 nm menghasilkan data seperti tercantum pada tabel berikut.

Tabel II. Absorbansi larutan baku seri vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
4	0,217
6	0,324
8	0,415
10	0,531
12	0,610

Berdasarkan Tabel II kemudian dibuat grafik keterkaitan antara absorbansi dan konsentrasi seperti ditampilkan pada gambar.



Gambar II. Grafik hubungan antara Absorbansi (A) dan konsentrasi (ppm)

Persamaan regresi yang didapatkan yaitu $y = 0,0497x + 0,0222$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9973, sudah memenuhi persyaratan, standar koefisien korelasi $\geq 0,99$ (12). Nilai koefisien korelasi mendekati satu membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linear. Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan vitamin C dalam konsentrasi absorbansi berkorelasi positif dan kurva standar yang didapat memiliki keakuratan dalam menentukan konsentrasi.

Validasi Metode Analisis

Akurasi

Parameter akurasi, yang dinyatakan sebagai %recovery diuji dengan metode adisi standar pada kadar 80, 100 dan 120%. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel III.

Tabel III. Hasil pengujian akurasi

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Hasil Terukur	% recovery	Syarat
2,38 (80%)	1	2,35	98,73%	98-102%
	2	2,37	99,57%	
	3	2,43	101,26%	
2,98 (100%)	1	2,96	99,32%	98-102%
	2	2,98	100,00%	
	3	2,99	100,33%	
3,58 (120%)	1	3,52	98,32%	98-102%
	2	3,56	99,44%	
	3	3,60	100,55%	

Pada hasil uji akurasi diketahui bahwa pada masing-masing konsentrasi memenuhi syarat %recovery yakni pada rentang 98%-102% (23).

Presisi

Presisi menunjukkan keterdekatan hasil uji pada serangkaian pengukuran suatu sampel. Pada penelitian ini penentuan presisi dilakukan dengan 6 kali pengukuran, seperti ditunjukkan pada Tabel IV.

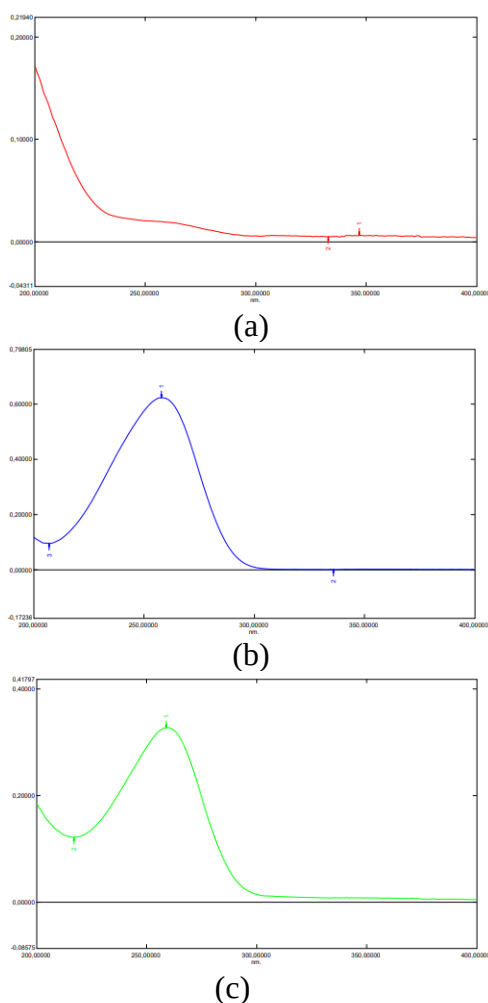
Tabel IV. Hasil pengujian presisi

Kadar (µg/mL)	Replikasi	Absorbansi
6	1	0,311
	2	0,310
	3	0,310
	4	0,309
	5	0,309
	6	0,308
Rerata		0,3095
SD		0,001049
%RSD		0,336%
Syarat		<2%

Dari konsentrasi 6 ppm yang diukur dengan 6x pengulangan didapatkan nilai RSD sebesar 0,336% yang memenuhi persyaratan uji parameter presisi, yaitu tidak lebih dari 2% (24). Nilai RSD yang memenuhi persyaratan membuktikan bahwa pada pengukuran yang dilakukan secara berulang terhadap sampel yang homogen, metode yang digunakan mampu menunjukkan derajat kesesuaian yang baik.

Selektivitas

Uji selektivitas bertujuan memastikan kemampuan suatu metode dalam mengukur suatu analitis secara akurat tanpa terpengaruh adanya komponen lain dalam sampel. Pada penelitian ini selektivitas diukur dengan membandingkan absorbansi vitamin C dan absorbansi vitamin C yang telah ditambahkan asam sitrat. Hasil pengujian ditampilkan pada Gambar III.



Gambar III. Absorbansi (a) asam

sitrat (b) vitamin C dan (c) campuran asam sitrat dan vitamin C

Berdasarkan hasil uji, diketahui bahwa penambahan asam sitrat dalam vitamin C tidak menyebabkan perubahan apapun pada kurva atau λ dari vitamin C. Ini menunjukkan bahwa penambahan senyawa lain (asam sitrat) tidak mempengaruhi kemampuan metode dalam mengidentifikasi vitamin C, sehingga uji selektivitas ini memenuhi persyaratan validasi.

Penetapan Kadar Vitamin C

Metode spektrofotometri Uv-Vis yang telah tervalidasi kemudian digunakan untuk melakukan pengukuran kadar vitamin C pada filtrat daun kemangi. Pengukuran dilakukan dengan tiga kali replikasi seperti ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel VI. Kadar Vitamin C pada filtrat daun kemangi

Replikasi	Absorbansi (A)	Konsentrasi (ppm)	Kadar (%b/b)	Rerata (b/b)
1	0,157	2,71	0,0141	0,0128
2	0,138	2,33	0,0121	
3	0,139	2,35	0,0122	

Berdasarkan penelitian pada filtrat daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) yang dilakukan secara spektrofotometri Uv-Vis yang sebelumnya telah divalidasi pada

parameter akurasi, presisi, linearitas dan selektivitas diperoleh kadar vitamin C pada daun kemangi sebesar 0,0128% b/b.

KESIMPULAN

Berdasarkan uraian hasil dan pembahasan, disimpulkan bahwa metode spektrofotometri Uv-Vis yang diaplikasikan untuk penetapan kadar vitamin C pada ekstrak daun kemangi tervalidasi pada parameter akurasi, presisi, linearitas dan selektivitas. Kadar vitamin C pada ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) sebesar 0,0128% b/b.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ditujukan kepada Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri atas dukungan pendanaan dan fasilitas penelitian, dan kepada Wahyu Widya Ningrum (Mahasiswa Program Studi S1 Farmasi IIK Bhakta) atas kontribusinya dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fardhani IM, Graciella C. Potensi Aktivitas Antidiabetes Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum*): Literature Review. J Kesehat Masy [Internet]. 2023;7(1):564–
2. Barus L, Sutopo A. Pemanfaatan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai Repelan Lalat Rumah (*Musca domestica*). J Kesehat. 2019;10(3):329.
3. Ch M, Naz S, Sharif A, Akram M, Saeed M. Biological and Pharmacological Properties of the Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). Br J Pharm Res. 2015;7(5):330–9.
4. Politeo O, Jukic M, Milos S. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. Food Chem [Internet]. 2007;101(1):379–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606001051>
5. Nurzynska-Wierdak R, Rozek E, Borowski B. Yield and chemical composition of basil herb depending on cultivar and foliar feeding with nitrogen. Acta Sci Pol Hortorum Cultus. 2015;10(4):217–32.
6. Chanwitheesuak A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chem [Internet]. 2005;92(3):491–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604006260>
7. Freire CM., Marques MO., Costa M. Effects of seasonal variation on the central nervous system

- activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. J Ethnopharmacol. 2005;105(1):161–6.
8. Hiltunen R, Holm Y. No Title Basil: The Genus *Ocimum*. 199AD.
 9. Sharma R, Kumar BSV. Isolation characterization and antioxidant potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae). Indian J Appl Res. 2011;3(7):5–10.
 10. Asmal A, Nurvianthi RY, Jehaman T. Analisis Kandungan Vitamin C dalam Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Secara Iodimetri. J Kesehat Luwu Raya. 2023;9(2):44–50.
 11. Kurniawati E, Fitria F, Saputra CAP. Pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan kentos kelapa (*Cocos nucifera* L) dengan metode DPPH. J Dunia Farm. 2023;7(3):173–84.
 12. Gandjar IG, Rohman A. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2014.
 13. Iman A Al, Auli WN. Validasi dan pengembangan metode analisis spektrofotometer UV-Vis pada alfa tokoferol asetat. 2023;19(1):87–96.
 14. Damayanti ET, Kurniawati P. Perbandingan Metode Penentuan Vitamin C pada Minuman Kemasan Menggunakan Metode Spektrofotometer UV-Vis dan Iodimetri. Univ Islam Indones J. 2017;4(2):258–66.
 15. Listiana L, Wahlanto P, Ramadhani SS, Ismail R. Penetapan Kadar Tanin Dalam Daun Mangkokan (*Nothopanax scutellarium* Merr) Perasan Dan Rebusan Dengan Spektrofotometer UV-Vis. Pharm Genius. 2022;1(1):62–73.
 16. Mulyani E. Perbandingan Hasil Penetapan Kadar Vitamin C pada Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*) dengan Menggunakan Metode Iodimetri dan Spektrofotometri UV-Vis. J Farm. 2018;3(2):14–7.
 17. Wardani LA. Validasi Metode Analisis dan Penentuan Kadar Vitamin C Pada Minuman Buah Kemasan Dengan Spektrofotometri Uv-Visible. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Kimia Universitas Indonesia. 2012.
 18. Karinda M, Fatimawati, Citraningtyas G. Perbandingan Hasil Penetapan Kadar Vitamin C Mangga Dodol Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan Iodometri. Pharmacon J Ilm Farm. 2013;2(01):3–6.
 19. Kurniawati E, Lestari TP, Widyaningrum EA. Validasi Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Media Farm. 2024;20(1):54–63.
 20. Rantung O, Korua AI, Datau H. Perbandingan Ekstraksi Vitamin C dari 10 Jenis Buah-Buahan Menggunakan Sonikasi dan Homogenisasi. Indones J Lab. 2021;4(3):124–33.
 21. Handayani T, Destiarti L, Idawati N. Perbandingan Pengompleks Kalium Tiosianat Dan 1,10 Fenantrolin Pada Penentuan Kadar Besi Dengan Spektrofotometer Uv-Vis. J Kim Khatulistiwa [Internet].

- 2018;7(2):47–53. Available from:
<https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmpa/article/download/25168/75676576390>
22. Dewi AP. Penetapan kadar vitamin C dengan metode spektrofotometri Uv-Vis pada berbagai variasi buah tomat. JOPS (Journal Pharm Sci. 2019;2(1):9–13.
23. (AOAC) A of OAC. Official Methods of Analysis of. Vol., Analytical Chemistry. 2016.
24. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan J. Introduction to modern liquid chromatography. Vol. 3. 2010.