

WSTĘP DO CHROMATOGRAFII JONOWEJ

Dr inż. Dariusz Pogocki

*Institut Chemii i Techniki Jądrowej,
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa*

Opiniodawca: Dr Rajmund Michalski.

Institut Podstaw Inżynierii Środowska Polskiej Akademii Nauk.

ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze

WARSZAWA 1998

1. WPROWADZENIE	5
------------------------	----------

2. METODY ROZDZIAŁU W CHROMATOGRAFII JONOWEJ	6
2.1 WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA JONOWA (HPIC). PROCES WYMIANY JONOWEJ.	6
2.2 WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA JONOWYKLUCZAJĄCA (HPICE)	9
2.3 CHROMATOGRAFIA PAR JONOWYCH (CHROMATOGRAFIA JONOWA Z FAZĄ RUCHOMĄ, MPIC).	10

3. METODY DETEKCJI W CHROMATOGRAFII JONOWEJ	10
3.1 DETEKCJA KONDUKTOMETRYCZNA	11
3.1.1 SUPRESJA - TLUMIENIE PRZEWODNOŚCI ELUENTU	15
3.2 DETEKCJA ELEKTROCHEMICZNA	16
3.3 DETEKCJA ABSORPCYJNA	21
3.4 DETEKCJA FLUORESCENCYJNA	22
3.5 INNE METODY DETEKCJI	23

4. KOLUMNY SEPARACYJNE I ELUENTY	23
4.1 HPIC	24
4.1.1 KOLUMNY	24
4.1.2 ELUENTY	28
4.2 HPICE	32
4.2.1 KOLUMNY	32
4.2.2 ELUENTY	32
4.3 MPIC	32

5. SUPRESORY	34
---------------------	-----------

6. ZASTOSOWANIA	36
------------------------	-----------

UZUPEŁNIENIA	43
A. ELEMENTY TEORII CHROMATOGRAFII	43
A.I. PODSTAWOWE WIELKOŚCI	43
A.II. PARAMETRY JAKOŚCI ROZDZIAŁU CHROMATOGRAFICZNEGO	44
B. ANALIZA JAKOŚCIOWA	46
C. ANALIZA ILOŚCIOWA	46
LITERATURA	48

1. WPROWADZENIE

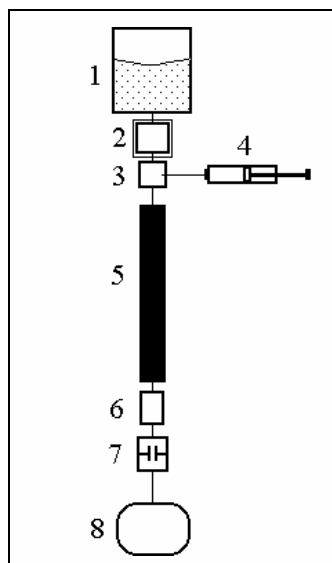
Termin „**chromatografia**” obejmuje wiele technik fizykochemicznych ogólnie zdefiniowanych jako - fizyczna metoda rozdzielania, w której składniki rozdzielane ulegają podziałowi między dwie fazy: jedna z nich jest nieruchoma (**faza stacjonarna**), a druga (**faza ruchoma**) porusza się w określonym kierunku.

Chromatografia jako metoda analityczna została odkryta w 1903 roku przez rosyjskiego botanika M. S. Cwieta, pracującego wówczas w Politechnice Warszawskiej. Chromatografia, początkowo niedoceniana, przeżywa obecnie burzliwy rozwój. Znanych jest wiele różnorodnych wariantów chromatografii umożliwiających rozdział mieszanin cieczy i gazów metodami sorpcyjnymi w warunkach dynamicznych. Co bardzo istotne, jako jedne z niewielu, metody chromatograficzne umożliwiają uzyskanie wyników jakościowych i ilościowych dla kilku oznaczonych substancji w jednym cyklu pomiarowym.

Chromatografię można podzielić względu na kształtu złoża na **kolumnową** i **planarną**. Pod względem warunków prowadzenia rozdziału na **gazową** i **cieczową** a także pod względem mechanizmu rozdzielania na **absorpcyjną**, **jonowymienną**, **podziałową**, **wykluczania** oraz **powinowactwa**. Istotne znaczenie ma także sposób prowadzenia procesu rozdzielania oraz sposób przemieszczania mieszaniny wzdłuż kolumny wypełnionej fazą stacjonarną. Najbardziej rozpowszechnione są metody, w których przemieszczenie mieszaniny następuje na drodze elucji, tj. gdy faza ruchoma przemieszcza się ciągle przez złożo chromatograficzne lub wzdłuż niego a próbka jest wprowadzana do układu w postaci określonej porcji. W **chromatografii elucyjnej** do określenia fazy ruchomej używa się terminu **eluent**.

W technice elucyjnej eluent płynie nieprzerwanie przez aparaturę (rysunek 1). Próbka badanej mieszaniny wprowadzana jest do układu przez dozownik (zwykle jest to układ z pętlą dozowniczą o pojemności od kilku do kilkuset μl , do którego wprowadza się próbkę strzykawką) a następnie przenoszona przez eluent do kolumny i tam rozdzielana na składniki. Podczas analizy temperatura kolumny i prędkość przepływu eluentu mogą być stałe (**elucja izokratyczna**) lub zmieniać się w czasie (**elucja gradientowa**). Pojawienie się poszczególnych składników w detektorze wytwarza sygnały elektryczne rejestrowane przez komputer sterujący pracą chromatografu.

Rys. 1. Schemat ideowy chromatografu jonowego (cieczowego); 1- rezerwuar eluentu, 2 - pompa, 3 - dozownik, 4 - strzykawka, 5 - kolumna separacyjna, 6 - układ tłumienia prądu wynikającego z przewodnictwa eluentu tzw. supresor (stosowany w przypadku IC z detekcją konduktometryczną), 7 - detektor, 8 - rejestrator, integrator lub komputer.



Przedmiot tego opracowania - współczesna chromatografia jonowymienna na małych cząsteczkach w wysokosprawnych kolumnach z użyciem detektorów konduktometrycznych, amperometrycznych lub spektro-

fotometrycznych jest nazywana **chromatografią jonową** (Ion Chromatography, IC). Jest to technika, w której rozdzielanie jest głównie wynikiem różnej zdolności składników próbki do ulegania wymianie jonowej.

Do podstawowych zalet chromatografii jonowej należą: (i) możliwość jednoczesnego oznaczania kilku jonów w próbce, (ii) krótki czas analizy (od kilku do kilkunastu minut), (iii) niskie progi wykrywalności (1 ng/ml), które mogą być dodatkowo obniżone o 2-3 rzędy przez zastosowanie kolumny zagęszczającej, (iv) szeroki zakres oznaczanych substancji, (v) możliwość stosowania różnych detektorów, (vi) niewielka ilość próbki potrzebna do analizy (0,1-1 ml), (vii) łatwość przygotowania próbki do analizy, (viii) wysoka selektywność oznaczanych jonów w próbkach o złożonej matrycy.

Obecnie w krajach wysokorozwiniętych większość rutynowych analiz jonów nieorganicznych i organicznych wykonuje się tą techniką. Północnoamerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) już od końca lat siedemdziesiątych zaleca stosowanie chromatografii jonowej do badania stanu środowiska.

Technika chromatografii jonowej nieustannie się rozwija i stale podąża za rozwojem, stanowiących jej bazę, dziedzin takich jak: szeroko pojęta fizykochemia, mechanika precyzyjna, inżynieria materiałowa, elektronika i informatyka. Z drugiej strony IC wychodzi na przeciw stale rosnącym wymaganiom stawianym metodom analitycznym przez dziedziny takie jak np. biotechnologia czy technologia materiałów półprzewodnikowych.

2. METODY ROZDZIAŁU W CHROMATOGRAFII JONOWEJ

Chromatografia Jonowa jest techniką analityczną wykorzystującą wiele rodzajów separacji oraz detekcji w celu uzyskania rutynowych oznaczeń indywidualów jonowych w zakresie od $\mu\text{g/l}$ (sub ppb) do mg/l (ppm). Wielość dostępnych metod pozwala na prawidłowe wybranie sposobów rozdziału i detekcji a w rezultacie optymalne rozwiązanie szczegółowych problemów analitycznych.

We wszystkich przypadkach, rozdział w chromatografii jonowej odbywa się z wykorzystaniem różnic w położeniu równowagi podziału składników próbki pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną. Skład i budowa fazy stacjonarnej są kluczowe dla procesu rozdziału chromatografii jonowej.

Obecnie w chromatografii jonowej stosuje się trzy główne sposoby rozdziału, różniące się rodzajem materiału wypełnienia kolumny, jego zdolnością wymienną, a przede wszystkim mechanizmem wymiany.

Są to:

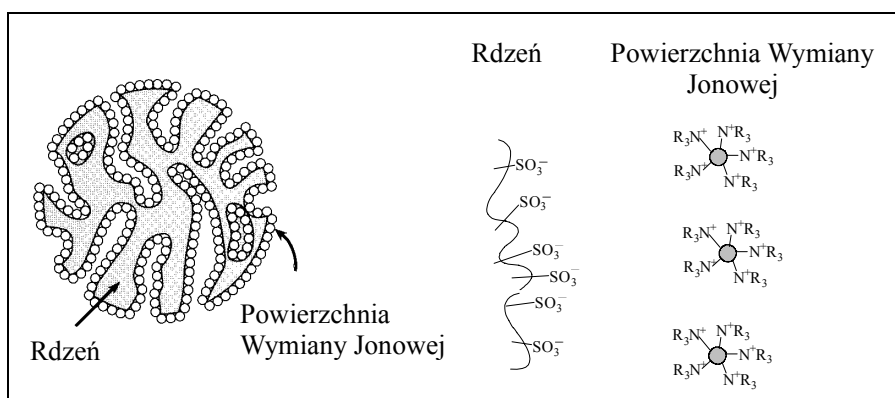
- **Wysokosprawna Chromatografia Jonowa** (High Performance Ion Chromatography, **HPIC**)
- **Wysokosprawna Chromatografia Jonowykluczająca** (High Performance Ion Chromatography Exclusion, **HPICE**)
- **Chromatografia Par Jonowych** (inaczej **Chromatografia Jonowa z Fazą Ruchomą**) (Ion Pair Chromatography, Mobile Phase Ion Chromatography, **MPIC**)

2.1 Wysokosprawna Chromatografia Jonowa (HPIC). Proces wymiany jonowej.

Wymiana jonowa jest jednym z najstarszych procesów rozdzielania opisywanych w literaturze (Biblia Tysiąclecia 2. Wj. 15, 23-25).

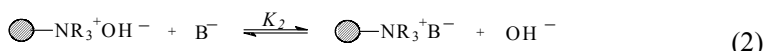
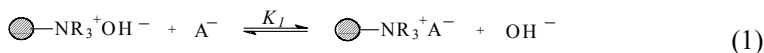
We współczesnej chromatografii jonowymiennej (High Performance Ion Chromatography, HPIC) wypełnienia kolumn stanowią żywice z naniesionymi na nie grupami funkcyjnymi o stałym ładunku (tzw. jony związane), w których bezpośrednim otoczeniu znajdują się odpowiednie przeciwjony zapewniające elektryczną obojętność układu (patrz rysunek 2). W przypadku wymiany anionów, z reguły jako grupy jonowymienne, stosowane są czwartorzędowe zasady amoniowe, a w wymianie kationów grupy sulfonowe.

Gdy przeciwjon na powierzchni wymiany zostanie zastąpiony przez jon substancji rozpuszczonej, ten ostatni jest czasowo zatrzymywany przez jony związane. Rozdzielane jony próbki różnią się między sobą czasem przebywania wewnątrz kolumny, wynikającym z ich różnych powinowactw do fazy stacjonarnej, co jest bezpośrednią przyczyną rozdzielania.



Rys. 2. Przykład wypełnienia kolumny do HPIC anionów (AS 10, Dionex Co.). Wypełnienie stanowią silnie porowate ziarna o średnicy $\sim 8.5 \mu\text{m}$ wykonane z sieciowego kopolimeru etylenodiwinylbenzenu (45%) i diwinylbenzenu (55%), na ich powierzchni znajdują się chemicznie związane grupy sulfonowe. Z powierzchnią związane są 65 nm kulki latexowe ze szczepionymi czwartorzędowymi grupami amoniowymi, które stanowią powierzchnię wymiany jonowej.

Na przykład jeśli przez kolumnę, wypełnioną wymienniczem anionowym (anionitem), przepływa eluent zawierający jony hydroksylowe, to czwartorzędowe jony amoniowe osadzone na powierzchni wiążą się z nimi. Gdy próbka zawierająca aniony A^- i B^- zostanie wprowadzona do układu, aniony te wymieniają aniony hydroksylowe zgodnie z reakcjami (1) i (2):



Rozdział anionów jest determinowany przez ich różne powinowactwa do fazy stacjonarnej. Ilościową miarą tego równowagowego procesu jest **współczynnik selektywności**, k_{X/OH^-} zdefiniowany w następujący sposób:

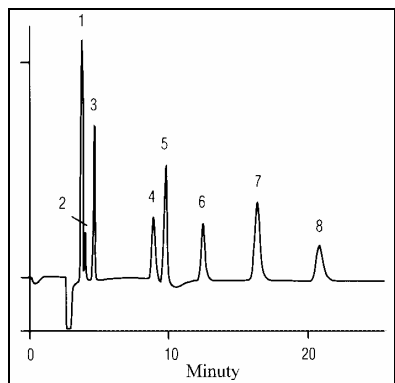
$$k_{X/OH^-} = \frac{[X^-]_S \times [OH^-]_M}{[OH^-]_S \times [X^-]_M} \quad (3)$$

gdzie: $[X^-]_{M,S}$ oznacza stężenie jonu próbki odpowiednio w fazie ruchomej (M) i stacjonarnej (S) a $[OH^-]_M$ - stężenie jonu hydroksylowego odpowiednio w fazie ruchomej (M) i stacjonarnej (S).

W oparciu o współczynnik selektywności można oszacować efektywność jonu jako eluentu. Jony o dużym współczynniku selektywności są w pierwszym rzędzie używane jako eluenty, dlatego że wykazują one dużą siłę elucji nawet w roztworach rozcieńczonych. Wybierając eluent należy generalnie kierować się zasadą, że współczynniki selektywności jonu eluentu i jonu próbki powinny mieć porównywalne wielkości. Gdy jony próbki eluują zbyt szybko, musi być zmniejszona siła eluentu, lub zmieniony jon eluentu na inny o niższym współczynniku selektywności.

Inną miarą powinowactwa jonów do fazy stacjonarnej jest **wagowy współczynnik podziału** λ , który dla jonu X^- został zdefiniowany jako:

$$\lambda = \frac{[X^-]_S}{[X^-]_M} \quad (4)$$



Rys. 3. Rozdział anionów HPIC, kolumny: separacyjna IonPac AS10 4-mm, koncentracyjna IonPac AC10, eluent: 85 mM NaOH, przepływ 1 ml/min, próbka: 10 ml 1,2% kwasu borkowego (1-10 µg/l anionów), koncentrator płukany wodą dejonizowaną; (1) F^- , (2) CH_3COO^- , (3) $HCOO^-$, (4) $B(OH)_4^-/CO_3^{2-}$, (5) Cl^- , (6) NO_2^- , (7) SO_4^{2-} , (8) $C_2O_4^{2-}$, detekcja konduktometryczna z supresją.

W większości przypadków, zamiast wagowego współczynnika podziału, stosuje się **stosunek podziału składnika między fazę stacjonarną i ruchomą k'** (*capacity factor*) zdefiniowany jako:

$$k' = \lambda \times \frac{m_R}{V_S} \quad (5)$$

gdzie: m_R masa wypełnienia kolumny, V_S objętość fazy ruchomej.

Jak widać współczynnik k' może być wyznaczony w oparciu o wagowy współczynnik podziału. Jednak prostsze jest obliczenie go z danych chromatograficznych z wykorzystaniem wielkości retencyjnych (patrz uzupełnienia A.1

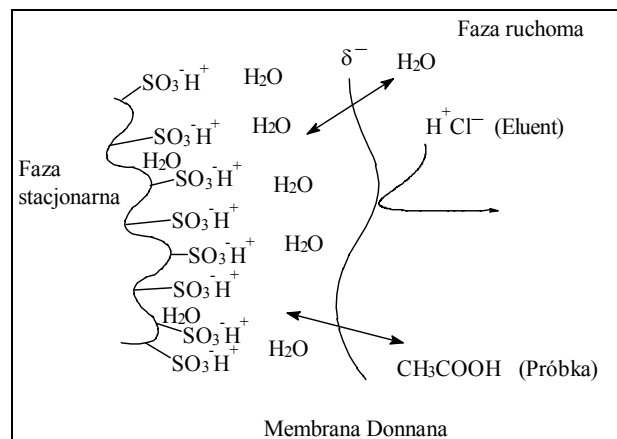
równanie II).

Zakres zastosowania HPIC obejmuje między innymi oznaczanie jonów nieorganicznych takich jak np. F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO^- , ClO_2^- , ClO_3^- , ClO_4^- , BrO_3^- , IO_3^- , PO_2^{3-} , PO_3^{3-} , PO_4^{3-} , $P_2O_7^{4-}$, $P_3O_{10}^{5-}$, $P_4O_{13}^{6-}$, PO_3F^{2-} , S^{2-} , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, SCN^- , CN^- , OCN^- , NO_2^- , NO_3^- , N_3^- , SiO_3^{2-} , SiF_6^{2-} , $B_4O_7^{2-}$, BF_4^- , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , NH_4^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} ,

Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , kationów lantanowców, anionów kwasów organicznych, amin alifatycznych, węglowodanów itp. Przykład wykorzystania HPIC w analizie anionów jest przedstawiony na rysunku 3.

2.2 Wysokosprawna Chromatografia Jonowykluczająca (HPICE)

Wysokosprawna chromatografia jonowykluczająca (HPICE) jest wariantem chromatografii jonowej, w

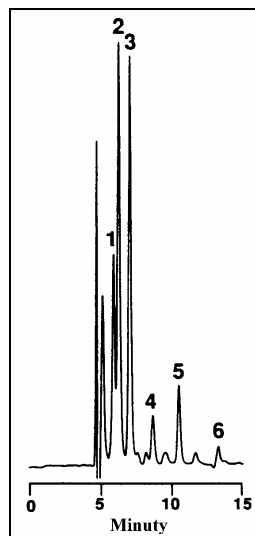


Rys. 4. Schemat rozdzielania metodą HPICE

fazy wodne a ich migracja przez kolumnę jest opóźniona. Natomiast substancje zjonizowane, nieprzenikające do wnętrza porów, nie są zatrzymywane w kolumnie i opuszczają ją w pierwszej kolejności.

HPICE jest stosowane w celu szybkiej separacji słabych kwasów nieorganicznych, kwasów organicznych, alkoholi, aldehydów, aminokwasów, a także grupowego oddzielania związków nieorganicznych od organicznych. Połączona z HPIC metoda ta może być używana do analizy próbek złożonych, takich jak: mocz, protoplazma, wyciągi z masy papierniczej, próbki żywności i napojów (rysunek 5) itp.

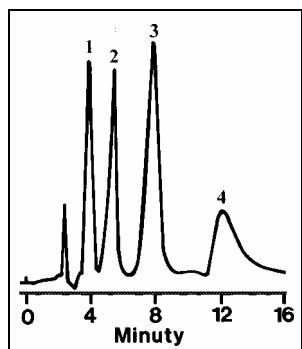
Rys. 5. Rozdział kwasów organicznych w białym winie HPICE (rozcieńczenie 1/25), kolumna separacyjna: HPICE-AS1, temp. 30 °C, eluent: 2 mM kwas oktanosulfonowy w 2% 2-propanolu, przepływ: 0,8 ml/min, próbka: 50 µl, detekcja konduktometryczna supresor AMMS-ICE, regenerant 5mM TBAOH 2-3 ml/min, kwasy: (1) cytrynowy, (2) winowy, (3) maleinowy, (4) bursztynowy i mlekowy, (5) octowy, (6) węglowy (Dionex AN 21).



2.3 Chromatografia Par Jonowych (Chromatografia Jonowa z Fazą Ruchomą, MPIC).

Mechanizm MPIC nie jest jak dotąd dokładnie poznany. Zgodnie z modelem *tworzenia par jonowych*, jony substancji rozpuszczonej X (oznaczanej) oddziałują z lipofilowymi jonami L (stanowiącymi składnik eluentu) tworząc kompleks XL. Kompleks ten może być odwracalnie wiązany z niepolarną powierzchnią fazy stacjonarnej S, którą stanowi tzw. „faza odwrócona” - tj. faza o polarności mniejszej niż eluent, dając kompleks XLS. Rozdzielane jony próbki (w postaci kompleksów typu - XL) różnią się między sobą czasem przebywania wewnątrz kolumny, wynikającym z ich różnych powinowactw do niepolarniej powierzchni fazy stacjonarnej („trwałością” kompleksu XLS), co stanowi przyczynę rozdzielania.

Według alternatywnego modelu, lipofilowe jony eluentu są adsorbowane na powierzchni fazy stacjonarnej tworząc LS. Na powierzchni niepolarniej fazy stacjonarnej powstaje dynamiczny wymiennicz jonowy, z którym oddziałują jony substancji rozpuszczonej X. Jony o charakterze hydrofobowym, jak sulfonian y alkilowe i aryłowe, mogą penetrować wewnątrz warstewki utworzonej przez kompleksy LS, gdzie o ich czasie przebywania decyduje adsorpcja. Jony bardziej hydrofilowe, jak SO_4^{2-} , penetrują tylko strefę zewnętrzną, a o ich czasie przebywania wewnątrz kolumny decyduje mechanizm wymiany jonowej opisany dla HPIC.



Rys. 6. Rozdział kwasów tłuszczowych MPIC, kolumny: separacyjna IonPac-NS1, ochronna IonPac-NG1, eluent: 10 mM NH_4OH w 35% izopropanolu, przepływ 0,7 ml/min, próbka 100 μl , stężenie sumaryczne 25-500 mg/l, kwasy: (1) laurowy, (2) mirystynowy, (3) palmitynowy, (4) stearynowy (Dionex AN45).

MPIC znalazła zastosowanie do oznaczeń jonów hydrofobowych, takich jak: siarczany i sulfonian y alkilowe i aryłowe, aminy alifatyczne i aminy czwartorzędowe, alkaloidy, barbiturany, pochodne kwasów tłuszczowych (rysunek 6). Ponadto MPIC umożliwia szybki rozdział Γ^- , SCN^- , ClO_4^- , BF_4^- , a także cyjankowych kompleksów metali.

3. METODY DETEKCJI W CHROMATOGRAFII JONOWEJ

Detektory są urządzeniami określającymi zmiany w składzie eluentu, na podstawie różnic pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi eluentu i substancji oznaczanej (**analitu**). Niezależnie od rodzaju detektora i właściwości wykorzystywanej podczas detekcji, eluent zawierający substancję oznaczaną, po przejściu przez kolumnę, trafia do przepływowego naczynka pomiarowego. Aby uniknąć niepożądanego rozmycia pików chromatograficznych pojemność takiego naczynka jest rzędu 0,01-10 μl . W większości przypadków o wyborze detektora decyduje rodzaj metody oddzielania i skład zastosowanego eluentu. Detektory mogą działać w sposób bezpośredni, gdy oznaczany jon posiada właściwości fizykochemiczne (np. absorpcja UV przy wybranej długości fali), różniące się diametralnie od właściwości będących w

dużym nadmiarze jonów eluentu. Jeśli ten warunek jest spełniony możemy niekiedy mówić o selektywności a nawet specyficzności detektora. Znacznie częściej jednak mamy do czynienia z metodami wykorzystującymi zmianę cechy eluentu jonowego (np. przewodnictwa elektrycznego) jaka zachodzi na skutek obecności jonów analitu. Jeśli mierzona cecha fizyczna analitu jest intensywniejsza od eluentu, mówimy o detekcji *bezpośredniej*; w przypadku odwrotnym o detekcji *pośredniej*.

3.1 Detekcja Konduktometryczna

Detekcja konduktometryczna (przewodnictwa jonowego) jest najbardziej uniwersalną metodą stosowaną w chromatografii jonowej. Zajmuje ona centralną pozycję wśród metod detekcji a niekiedy nazywana jest również „*koniem roboczym*” chromatografii jonowej. Metodą konduktometryczną mogą być oznaczane anality, które po przejściu przez kolumnę analityczną są w stanie dotrzeć do detektora w postaci jonowej. Zalicza się do nich jony mocnych kwasów i zasad, takich jak chlorki, siarczany, potas, sód itp. Jony słabych elektrolitów bada się wybierając pH eluentów, tak aby maksymalnie zwiększyć stopień dysocjacji analitu. W przypadku pomiarów z użyciem supresji jonowej o tym czy jon słabego elektrolitu będzie wykryty czy też nie decyduje pH eluentu po supresji. Wraz ze wzrostem stopnia dysocjacji analitu wzrasta czułość oznaczenia. W chromatografii anionów, czułość jest niska dla anionów o pK_a większym od 6. Aniony o pK_a większym od 7 w ogóle nie są wykrywane. Wszystkie organiczne grupy kwasowe mają pK_a poniżej 4,75, stąd konduktometria jest dogodną metodą detekcji kwasów organicznych. Z kolei organiczne zasady to w większości aminy, które są oznaczane w postaci kationów amoniowych ($R-NH_3^+$). Aminy alifatyczne mają pK_a około 10 i są łatwo wykrywalne. Natomiast aminy aromatyczne mają pK_a w zakresie od 2 do 7. Są to wartości zbyt niskie, aby pozwolić na detekcję konduktometryczną z supresją jonową gdyż ta przekształcałaby je do formy niejonowej (aminy te mogą być z powodzeniem oznaczane za pomocą detekcji amperometrycznej i UV).

W detektorze konduktometrycznym wykorzystuje się zdolność roztworów elektrolitów umieszczonych w polu elektrycznym powstającym pomiędzy dwoma elektrodami przepływowego naczynka konduktometrycznego (*rysunek 7*) do przewodzenia prądu na skutek transportu jonów.¹

Prąd płynący przez zawarty między elektrodami słup elektrolitu wyraża się zgodnie z prawem Ohma równaniem (6):

$$i = \frac{U}{R} \quad (6)$$

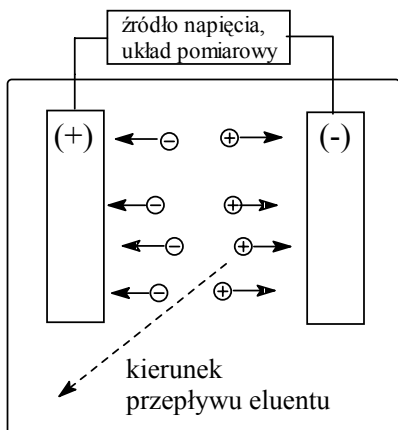
gdzie: U jest napięciem elektrycznym przyłożonym do elektrod (V), R oznacza oporność słupa elektrolitu pomiędzy elektrodami (Ω).

Oporność zależy od składu elektrolitu, przy elektrolicie o stałym składzie jest wprost proporcjonalna do odległości l pomiędzy elektrodami i odwrotnie proporcjonalna do pola powierzchni A elektrody:

¹ Aby zapobiec zachodzeniu reakcji elektrodowych w pomiarach konduktometrycznych stosuje się prąd szybkozmienny o częstotliwości około 1 kHz, a elektrody wykonuje z metali szlachetnych

$$R = \rho \times \frac{l}{A} \quad (7)$$

gdzie: ρ jest współczynnikiem proporcjonalności zwanym opornością elektryczną (opornością właściwą) elektrolitu.



Rys. 7. Schemat ideowy przepływowego naczynka konduktometrycznego

Odwrotność oporności G nazywa się **przewodnością** (konduktancją) a jej jednostką jest simens ($S = \Omega^{-1}$):

$$G = \frac{A}{\rho \times l} = \frac{\kappa \times A}{l} \quad (8)$$

przy czym $\kappa = 1/\rho$ ($S \text{ cm}^{-1}$) jest to **przewodność elektrolityczna** (przewodnictwo właściwe elektrolitu). Po przekształceniu:

$$\kappa = G \times K_C \quad (9)$$

$$K_C = \frac{l}{A} \quad (10)$$

wielkość K_C zwana **stałą naczynka konduktometrycznego** charakteryzująca układ pomiarowy jest stałą i niezależna od właściwości elektrolitu.

Przewodność elektrolityczna roztworów rozcieńczonych jest sumą indywidualnych udziałów przewodności wszystkich jonów w roztworze pomnożonych przez ich stężenie. Prawidłowość ta, nazywana *prawem niezależnego ruchu jonów Kohlrauscha*, przedstawiona jest równaniem (11):

$$\kappa = \frac{\sum_i \lambda_i^o \times z_i \times c_i}{1000} \quad (11)$$

gdzie: c_i jest stężeniem molowym jonu w roztworze, z_i wartościowością jonu ładunku, a λ_i^o jest **graniczną przewodnością molową** danego jonu² (jest to przewodność jonu podzielona przez jego stężenie i ekstrapolowana do nieskończenie dużego rozcieńczenia) wyrażoną w $S \times \text{cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$.

² Zgodnie z zaleceniami IUPAC zawsze podaje się wzór jednostki chemicznej, do której odnosimy stężenie c np. $\lambda(\text{Mg}^{2+}) = 2\lambda(1/2\text{Mg}^{2+})$. Przy takim ujęciu, i założeniu że przyjęta jednostka ma pojedynczy ładunek, pojęcie *przewodności molowej* danego jonu jest tożsame z używanym jeszcze w literaturze, ale niezalecanym, pojęciem *przewodnictwa równoważnikowego* jonu.

Tabela 1. Graniczne przewodności molowe wybranych jonów w roztworze wodnym w temperaturze 18 i 25°C

Aniony	18°C	25°C	Kationy	18°C	25°C
OH ⁻	171	198,3	H ⁺	315	349,8
F ⁻	47,3	55,4	Li ⁺	32,8	38,6
Cl ⁻	65,5	76,4	Na ⁺	42,8	50,1
Br ⁻	68,0	78,1	K ⁺	63,9	73,6
I ⁻	66,5	76,8	Rb ⁺	66,5	77,8
SCN ⁻	56,5	66	Ag ⁺	53,5	61,9
NO ₂ ⁻		71,4	1/2Ca ²⁺	50,7	59,5
NO ₃ ⁻	61,8	71,5	1/2Sr ²⁺	50,6	59,4
1/2SO ₄ ²⁻	68	80	1/2Ba ²⁺	55	65
1/2C ₂ O ₄ ²⁻	63,0	73,5	1/2Pb ²⁺	60,8	71,2
1/2CO ₃ ²⁻	70,0	83,3	1/2Mg ²⁺	45	53
HCO ₃ ⁻	40,5	47,0	1/2Zn ²⁺	46	54
1/2CrO ₄ ²⁻	72	83	1/2Fe ²⁺		53,5
HCOO ⁻		54,6	1/3Fe ³⁺		68
CH ₃ CO ₂ ⁻	35,0	40,9	1/2Hg ²⁺		63,6
CH ₃ CH ₂ CO ₂ ⁻		35,8	1/2Co ²⁺		49
C ₆ H ₅ CO ₂ ⁻		32,3	NH ₄ ⁺	63,9	73,5
1/2Ftalan ²⁻		38	N(CH ₃) ₄ ⁺	40,0	44,9
Salicylan ⁻		30	N(C ₂ H ₅) ₄ ⁺	28,2	32,6
CH ₃ O ₂ SO ₂ ⁻		48,8	S(C ₂ H ₅) ₂ ⁺		36,1

Dane zawarte w tabeli 1 pozwalają na obliczenie przewodności elektrolitycznej roztworów jonowych o stężeniu nie przekraczającym 1 mM. Na przykład roztwór 0,2 mM benzooesanu sodowego (C₆H₅COONa) i 0,1 mM chlorku magnezu (MgCl₂) zawiera 2×10⁻² mola anionów benzooesanowych, 2×10⁻² mola kationów sodowych 2×10⁻² mola anionów chlorkowych i 1×10⁻² mola dwuwartościowych kationów magnezowych. Stąd obliczona ze wzoru (11) przewodność elektrolityczna takiego roztworu wynosi 42,36 μS/cm.

Przyczynę różnic przewodności molowych pomiędzy poszczególnymi jonami stanowi ich ruchliwość u_i^0 gdyż:

$$\lambda_i^0 = F \times u_i^0 \quad (12)$$

gdzie: F oznacza Stałą Faradaya (9,648456×10⁴ C mol⁻¹).

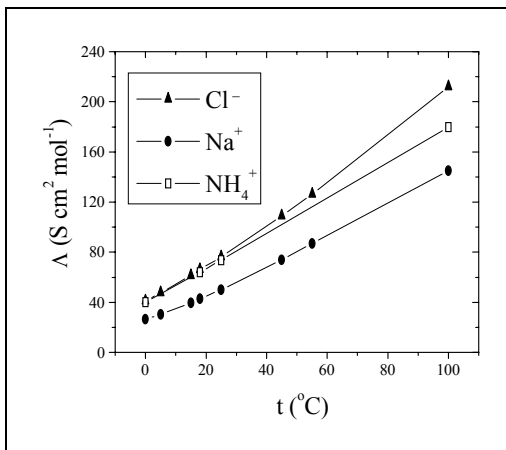
Z równania (12) wynika, że udział poszczególnych rodzajów jonów w przeniesieniu ładunku elektrycznego przez roztwór nie jest jednakowy, ponieważ ich ruchliwości nie są jednakowe.

Z kolei ruchliwości jonów zależą od kilku czynników, z których najważniejsze to: (i) wielkość jonu (jony większe poruszają się w polu elektrycznym wolniej niż małe), (ii) składu elektrolitu (jony, których otoczki hydratacyjne są większe poru-

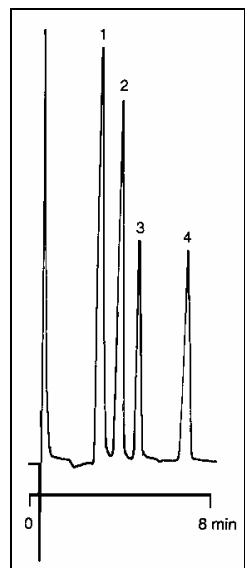
szają się wolniej od jonów z małymi otoczkami *vide* aniony fluorkowe i chlorkowe), (iii) temperatury³ (rysunek 8).

Przedstawione wyżej cechy, od których zależy przewodnictwo elektrolitu, nakładają pewne ograniczenia na zastosowanie metody bezpośredniej detekcji konduktometrycznej w chromatografii jonowej.

Przede wszystkim, chcąc stosować metodę detekcji bezpośredniej w tzw. „**chromatografii jednokolumnowej**” (bez supresji, z częściowym elektronicznym tłumieniem przewodności eluentu) i oczekując dużej różnicy przewodności pomię-

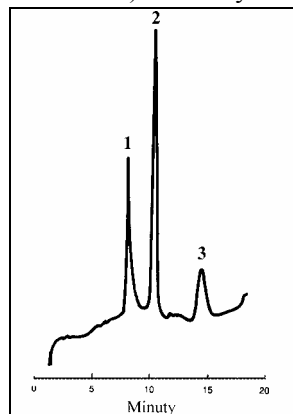


Rys. 8. Przykład zmiany granicznej przewodności molowej jonów Cl⁻, Na⁺, NH₄⁺ pod wpływem zmiany temperatury roztworu w zakresie od 0 do 100 °C.



Rys. 9. Rozdział anionów, kolumna separacyjna. IonSpher 5A 100x3-mm, eluent wodoro-ftalan potasowy 5 mM, przepływ 1 ml/min, próbka 10 μl, stężenie 0,2 g/l, (1) HCOO⁻, (2) Cl⁻, (3) NO₂⁻, (4) NO₃⁻, detekcja konduktometryczna bez supresji (Chrompack AN396B).

dzy anitem a eluentem, przy wyborze eluentu ograniczeni jesteśmy do eluentów o niskich własnych przewodnościach molowych. Praktycznie są to elenty, w których skład wchodzi jony organiczne o względnie dużych cząsteczkach (o małej ruchliwości). Na przykład, w analizie anionów zastosowanie znalazły rozcieńczone (10⁻⁴ - 10⁻³ M) roztwory soli kwasów benzooesowego, ftalowego i *o*-sulfobenzooesowego (rysunek 9). Aby jednak mogły być one użyte, pH fazy ruchomej musi znajdować się w granicach 4 do 7, w którym to zakresie pH w/w kwasy organiczne są zdysocjowane i mogą pełnić rolę eluentów. Jakkolwiek metoda ta daje zadawalające rezultaty dla podstawowych jednowartościowych anionów (czułość 2-50 μg/l), to użycie innych eluentów z zastosowaniem supresji (tzw. „**chromatografia dwukolumnowa**”, patrz punkt 3.1.1) pozwala na uzyskanie czułości co najmniej o rząd wielkości wyższej. Natomiast zastosowanie KOH jako



Rys. 10. Rozdział anionów HPLC, kolumna separacyjna. PRP-X100 250x4,1-mm, eluent: 3,2 mM KOH pH 11,5, przepływ 3 ml/min, próbka: 100 μl; (1) B(OH)₄⁻ 50 mg/l (2) F⁻ 50 mg/l, (3) SiO₃²⁻ 50 mg/l, detekcja konduktometryczna pośrednia. (Hamilton Appl.66).

³ Wartość granicznej przewodności molowej jonu w temperaturze t (λ_t^0) można obliczyć znając wartość przewodności w 25 °C (λ_{25}^0) posługując się przybliżonym wzorem:

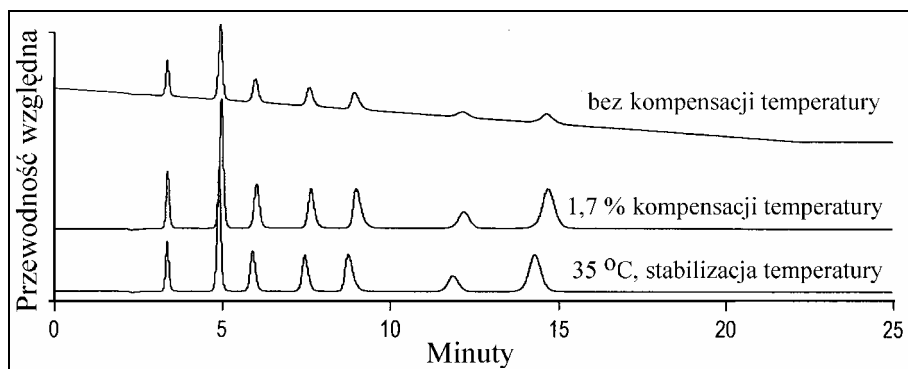
$$\lambda_t^0 = \lambda_{25}^0 \times e^{\beta(t-25)} \quad (13)$$

w którym współczynnik obliczeniowy β dla większości jonów przybiera wartości bliskie 0,02.

eluentu w chromatografii jednokolumnowej wraz z pośrednią detekcją konduktometryczną pozwala na oznaczanie anionów słabych kwasów o $pK_a > 7$ (rysunek 10).

Drugi decydujący czynnik, jakim jest wpływ składu elektrolitu na przewodność molową jonów, wymaga szczególnej dbałości o stabilność składu eluentu. Utrzymanie odpowiedniego reżimu podczas kalibracji i właściwego pomiaru (w dużej mierze jest to funkcja jakości użytej aparatury) pozwala na uzyskanie dobrej powtarzalności i odtwarzalności oznaczeń.

W końcu, duża wrażliwość przewodności molowej jonów na zmiany temperatury, wymaga stabilizacji temperatury detektora lub elektronicznej kompensacji efektów temperaturowych (rysunek 11).



Rys. 11. Wpływ kontroli temperatury naczynka konduktometrycznego na jakość pomiaru (Chromatograf DX-120, Dionex Co.)

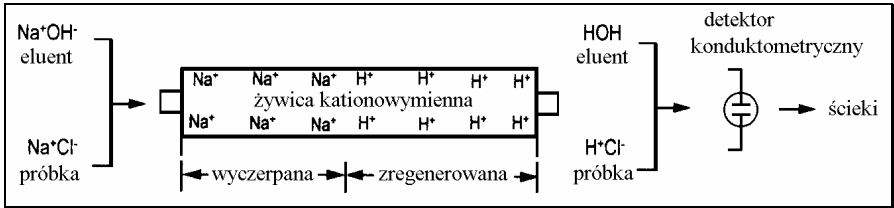
Stabilizacja temperatury detektora jest szczególnie istotna w chromatografii jednokolumnowej, w której przewodność eluentu jest wysoka. Dla przewodności linii podstawowej eluentu około $300 \mu\text{S}$, zmiana temperatury o 1°C skutkuje wzrostem przewodności o około $6 \mu\text{S}$, co odpowiada 60% na $10 \mu\text{S}$ skali pomiaru. Takie wahania linii podstawowej mogą uniemożliwić oznaczenie wielu jonów występujących w małych stężeniach. Ten niekorzystny efekt ma mniejsze znaczenie w przypadku chromatografii dwukolumnowej, gdzie w rezultacie supresji, przewodność linii podstawowej jest zredukowana do około $20 - 30 \mu\text{S}$.

3.1.1 Supresja - Tłumienie Przewodności Eluentu

Użycie silnych elektrolitów jako eluentów w chromatografii jonowej z bezpośrednią detekcją konduktometryczną wymaga zastosowania dodatkowego procesu w celu usunięcia przewodnictwa eluentu bez naruszania badanych składników próbki (tzw. supresję, ang. suppress - tłumić). Praktycznie funkcję taką może pełnić każdy proces chemiczny, w wyniku którego składniki eluentu są zamieniane w mniej przewodzące związki np. reakcje wymiany jonowej, kompleksowania itp.

Już w początkowej fazie rozwoju chromatografii jonowej opracowano metodę zmniejszającą sygnał przewodności wynikający z przewodnictwa eluentu (Hamish Small, 1975). Problem ten rozwiązano poprzez zastosowanie drugiej specjalnej

kolumny (*kolumny tłumienia*) umieszczonej po kolumnie analitycznej. W kolumnie tej, wypełnionej silnie kwasową żywicą kationowymienną, następuje wymiana kationu eluentu na jon wodorowy. Składniki eluentu opuszczają kolumnę tłumienia w postaci słabo zdysocjowanej. Na przykład, gdy w chromatografii anionów eluentem jest roztwór wodorotlenku, po procesie supresji kolumnę tłumienia opuszczają elektrycznie obojętne cząsteczki wody. Natomiast aniony próbki, które z jonami wodorowymi tworzą mocniejsze kwasy, docierają do naczynka konduktometrycznego w postaci zdysocjowanej, gdzie są wykrywane (*rysunek 12*).



Rys. 12. Schemat działania kolumny tłumienia (*supresora kolumnowego*) w chromatografii jonowej „dwukolumnowej”.

Ponieważ kolumna tłumienia zatrzymuje jony eluentu, musi być ona okresowo regenerowana. W omawianym przypadku do regeneracji używa się kwasu siarkowego. Aby zminimalizować straty na regenerację, parametry obydwu kolumn muszą być zoptymalizowane. Mimo to regeneracja kolumny tłumienia nigdy nie jest pełna, co prowadzi do stopniowej zmiany czasów retencji i rozmycia pików.

Obecnie miejsce klasycznej supresji kolumnowej prawie całkowicie zastąpiły nowoczesne metody supresji, o których będzie mowa w punkcie 5.

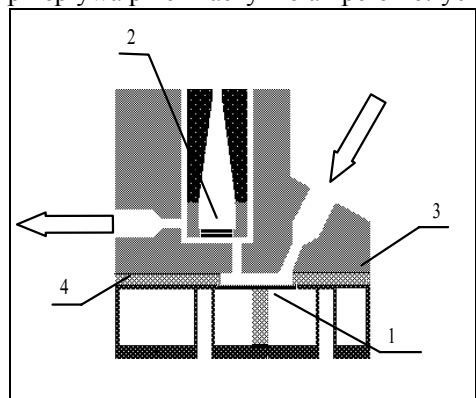
3.2 Detekcja Elektrochemiczna⁴

Metody detekcji elektrochemicznej znalazły zastosowanie w analizie jonów substancji, które ze względu na ich niski stopień dysocjacji, są trudno oznaczalne lub nieoznaczalne metodą konduktometryczną. Polegają one na pomiarze prądu lub ładunku powstającego podczas elektrochemicznego utleniania-redukcji analitu na powierzchni elektrody roboczej. Podczas elektrochemicznego utleniania elektrony są przenoszone z analitu do elektrody roboczej, natomiast podczas redukcji w kierunku odwrotnym.

Konwencjonalna detekcja **amperometryczna** (DC amperometria) polega na pomiarze prądu przy stałym potencjale elektrody roboczej, wykonanej z metalu szlachetnego (*rysunek 13*). Potencjał elektrody roboczej jest utrzymywany względem elektrody odniesienia (Ag/AgCl), o stałym, niezależnym od składu eluentu potencjale. Trzecią elektrodę - elektrodę pomocniczą stanowi elektroda węglowa lub przewo-

⁴ Aczkolwiek konduktometria również może być zaliczana do metod elektrochemicznych to jednak za takie zwykle się uważa metody, w których zachodzą elektrodowe reakcje chemiczne.

dająca obudowa naczynka amperometrycznego. Kiedy elektroaktywna substancja przepływa przez naczynko amperometryczne częściowo się utlenia (lub redukuje).

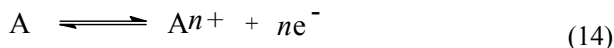


Rys. 13. Schemat cienkowarstwowego naczynka amperometrycznego detektora elektrochemicznego ED40 Dionex Co. 1 - elektroda robocza (Ag, Pt), 2 - elektroda odniesienia (Ag/AgCl), 3 - elektroda pomocnicza (obudowa naczynka), 4 - elastyczna uszczelka nieprzewodząca.

Reakcja ta prowadzi do powstania pomiędzy elektrodą roboczą, a elektrodą pomocniczą prądu proporcjonalnego do stężenia analitu. Natężenie prądu jest rejestrowane w postaci chromatogramu. Ze względu na małą powierzchnię elektrody roboczej (do $0,5 \text{ cm}^2$) w typowym naczynku amperometrycznym z przepływem około 1 ml/min mniej niż 10% analitu ulega reakcji elektrodowej. Użycie naczynka o większej powierzchni elektrody roboczej pozwala na pełną konwersję analitu (ta technika analityczna to **kulometria**). Zarówno amperometria jak i kulometria mogą być używane w wariacie detekcji bezpośredniej jak i pośredniej. W przypadku detekcji pośredniej, reakcji elektrodowej ulega nie

substancja oznaczana, ale jej pochodna (np. odpowiedni związek kompleksowy) uzyskana w procesie derywatywacji pokolumnowej.

We wszystkich metodach elektrochemicznych warunkiem zajścia reakcji utleniania-redukcji jest odpowiednio dobrany potencjał elektrody roboczej. Reakcja polegająca na przeniesieniu n elektronów z substancji A do elektrody (równanie 14),



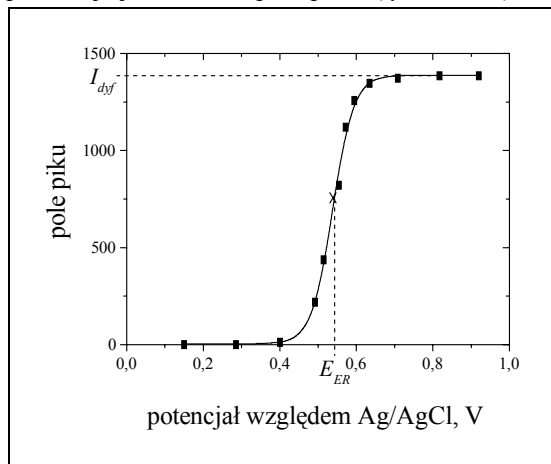
zachodzi wtedy gdy do elektrody roboczej przyłożony jest potencjał E_{ER} określony wzorem Nernsta (15):

$$E_{ER} = E_0 + \frac{0,059}{n} \times \log \frac{[A^{n+}]}{[A]} \quad (15)$$

gdzie: $[A^{n+}]$, $[A]$ to stężenia równowagowe utlenionej i zredukowanej formy analitu na powierzchni elektrody, E_0 potencjał standardowy, odpowiada sytuacji gdy stężenia $[A^{n+}]$ i $[A]$ są sobie równe.

Dąży się do tego, aby wydajność utleniania analitu była jak najwyższa (jak najwyższy mierzony prąd) dlatego potencjał elektrody roboczej powinien być wyższy od potencjału standardowego. Nie zawsze jednak potrzebne wartości potencjału można znaleźć w tablicach. Aby je uzyskać wykonuje się pomiar **woltametryczny** (*woltametria hydrodynamiczna*) polegający na przepuszczaniu przez naczynko roztworu oznaczanej substancji w nieaktywnym elektrolicie (np. KCl). Zwiększając stopniowo potencjał elektrody roboczej rejestruje się pole piku chromatograficznego

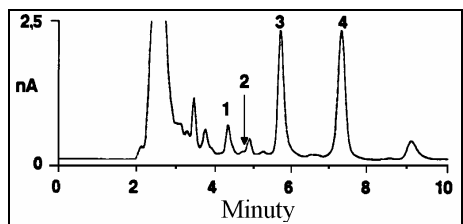
aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, powyżej której zwiększenie napięcia nie powoduje już wzrostu pola piku. (rysunek 14).⁵



Rys. 14. Pole piku serotoniny w funkcji potencjału elektrody roboczej.

gdzie: F oznacza stałą Faradaya, P powierzchnię elektrody, D i c odpowiednio współczynnik dyfuzji i stężenie analitu, δ grubość warstwy dyfuzyjnej tj. odległość pomiędzy powierzchnią elektrody a miejscem, w którym stężenie analitu jest równe średniemu stężeniu analitu w roztworze.

Optymalną wielkością potencjału elektrody roboczej stosowaną w detekcji amperometrycznej jest wielkość nieco niższa od odpowiadającej prądowi dyfuzyjnemu (w przypadku prezentowanym na rysunku 7 jest to około 0,6 V). Dodatkowo zwiększanie potencjału elektrody prowadzi do zwiększenia szumów, a także do obniżenia selektywności pomiaru (gdyż zwiększa to liczbę substancji, które mogą być utleniane).



Rys. 15. Katecholoaminy w moczu (ekstrakt), kolumna separacyjna: Zorbax C-18, eluent: bufor cytrynianowo/octanowy, 20% metanol, 1% OSA, 10 μ M EDTA, przepływ 1 ml/min, próbka: 20 μ l; (1) noradrenalina (2) adrenalina, (3) DHBA (wzorzec wewnętrzny, (4) dopamina, detekcja amperometryczna (DC).

Osiągnięta wartość odpowiada sytuacji, w której rejestrowane natężenie prądu jest limitowane przez szybkość dyfuzji cząsteczek analitu do powierzchni w roztworze. Te graniczną wartość prądu nazywa się prądem dyfuzyjnym I_{dyf} . Wartość prądu dyfuzyjnego opisywana jest wzorem (16):

$$I_{dyf} = \frac{n \times F \times P \times D \times c}{\delta} \quad (16)$$

gdzie: F oznacza stałą Faradaya, P powierzchnię elektrody, D i c odpowiednio współczynnik dyfuzji i stężenie analitu, δ grubość warstwy dyfuzyjnej tj. odległość pomiędzy powierzchnią elektrody a miejscem, w którym stężenie analitu jest równe średniemu stężeniu analitu w roztworze.

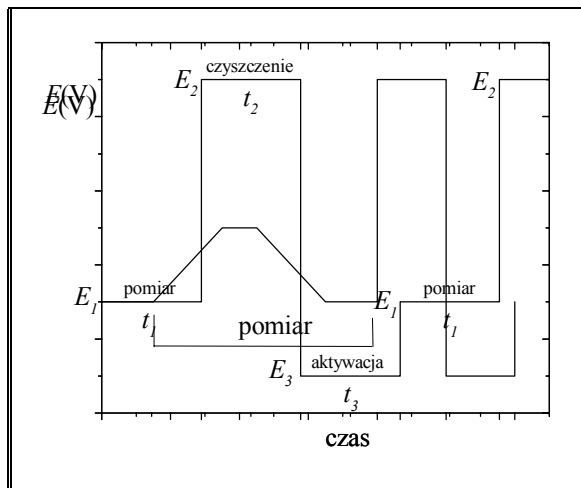
Główne zastosowania klasycznej detekcji amperometrycznej (amperometrii DC) stanowią związki organiczne o znaczeniu biologicznym, posiadające w swym składzie grupy fenolowe i katecholowe, takie jak: adrenalina, dopamina i inne neurotransmitery, których detekcja wykracza poza możliwości metody konduktometrycznej (rysunek 15).

Wadą klasycznej amperometrii są pro-

⁵ Zakres zastosowanego potencjału jest zależny od materiału elektrody i składu elektrolitu (eluentu). W metodach elektrochemicznych wybór elektrody roboczej jest ograniczony przez cztery główne czynniki (i) limity potencjału materiału elektrody w eluencie, (ii) możliwość tworzenia kompleksów z substancjami rozpuszczonymi, (iii) kinetykę reakcji elektrochemicznej, (iv) szum tła. Szersze informacje na ten temat można znaleźć w cytowanej literaturze, a także w notach aplikacyjnych producentów detektorów.

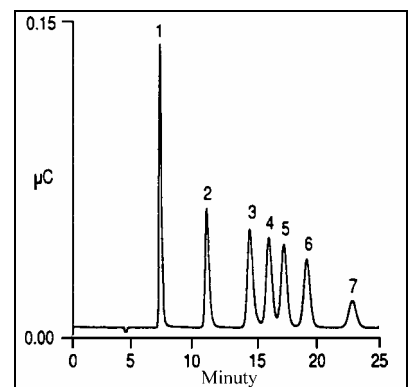
blemy związane ze stopniowym zmniejszaniem się czułości metody. Wiąże się to z osadzaniem na powierzchni elektrody roboczej trwałych produktów reakcji elektrochemicznej, co powoduje zmniejszanie się dostępnej dla elektrolitu powierzchni roboczej elektrody. Zmniejsza się w ten sposób efektywność reakcji Faradaya na elektrodzie. W takiej sytuacji czułość metody musi być sprawdzana przez częste zadawanie próbki wzorcowej. Gdy odpowiedź detektora przestaje być zadawalająca należy wymienić lub oczyścić elektrodę roboczą. Jednym ze sposobów pokonania problemów związanych z adsorpcją produktów reakcji na powierzchni elektrody jest zastosowanie zamiast stałego potencjału sekwencji krótkich impulsów potencjału.

W **amperometrii impulsowej** (PAD) detektor mierzy prąd tylko podczas krótkich przedziałów czasu, w których prawdopodobieństwo wadliwego działania elektrody jest znikome. Dodatkowo potencjał podawany na elektrodę może mieć wartości większe lub mniejsze od potencjału pomiarowego. Pozwala to oczyścić powierzchnię elektrody i aktywować ją, poprawiając odpowiedź detektora. Na rysunku 16 przedstawiona jest typowa sekwencja impulsów potencjału przyłożonych do elektrody roboczej.



Rys. 16. Sekwencja impulsów potencjału w amperometrii i detekcji geometrycznej.

Prąd jest mierzony przez czas t_1 , gdy do elektrody przyłożony jest potencjał pomiarowy (E_1).⁶ W tym czasie na powierzchni elektrody mogą się osadzać niewielkie ilości zanieczyszczeń. W przedziałach czasu t_2 i t_3 , gdy przyłożone są potencjały (E_2) i (E_3), z elektrody usuwane są odpowiednio utleniające i redukujące zanieczyszczenia, a także zredukowana jest powierzchnia elektrody (E_3). Tak więc po zakończeniu cyklu potencjał pomiarowy może być przyłożony do czystej elektrody.



Rys. 17. Rozdział oligo- i monocukrów, kolumna separacyjna: CarboPac MA1 250x4-mm, eluent: 0,6 M NaOH, przepływ 0,4 ml/min, próbka: (1) inozytol 18 mg/l (2) ksylitol 15,2 mg/l, (3) sorbitol 18,2 mg/l, (4) dulcytol 18,2 mg/l, (5) mannitol 18,2 mg/l, (6) glikoza 18 mg/l, (7) fruktoza 18 mg/l, detekcja amperometria impulsowa (PAD) elektroda złota (Dionex TN20).

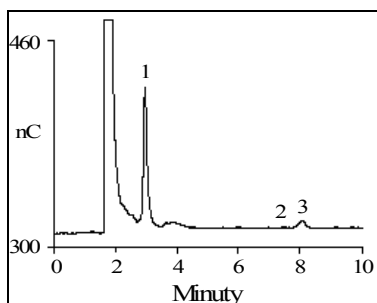
Optymalne wartości potencjałów wyznacza się w niezależnym eksperymencie elektrochemicznym takim jak cyklowoltmetria, w

⁶ Ponieważ w amperometrii impulsowej prąd jest rejestrowany w przedziale czasu, jednostką sygnału jest kulomb C - jednostka ładunku.

którym wartość stosowanego potencjału jest powoli zmieniana pomiędzy wartościami dodatnimi i ujemnymi w obydwu kierunkach. Odpowiednie wartości potencjałów (i czasy) można znaleźć także w literaturze np. w notach aplikacyjnych producentów aparatury chromatograficznej.

Obecnie główny obszar zastosowań amperometrii impulsowej to analiza cukrów prostych, dwucukrów, policukrów, glikoprotein, alkoholi, aldehydów, amin, aminokwasów, tioli i tioeterów (*rysunek 17*).

Kolejnym rodzajem detekcji amperometrycznej jest **amperometria integracyjna**. Metoda ta jest użyteczna dla amin i związków siarkowych ponieważ ich utlenianie na powierzchni elektrody metalowej, katalizowane jest przez powstawanie tlenku metalu. W amperometrii impulsowej prąd jest mierzony dla stałej wartości potencjału E_t . Natomiast w amperometrii integracyjnej prąd jest mierzony podczas przemiatania potencjałem, rosnącym w czasie powstawania tlenku metalu i malejącym podczas jego redukcji. Przykład sekwencji impulsów potencjału, w amperometrii integracyjnej, jest przedstawiony na *rysunku 18*. Amperometria integracyjna w znaczący sposób minimalizuje efekty tła wywołane powstawaniem tlenku metalu, a także zmniejsza efekty wywołane zmianą pH podczas pomiaru. Poniżej przedstawiony jest przykład zastosowania amperometrii integracyjnej do badania zawartości związków siarkowych w materiałach biologicznych (*rysunek 19*).



Rys. 19. Oznaczenie glutationu w komórkach ludzkich SiHa cervical carcinoma. kolumny: separacyjna Zorbax RP300-C18, ochronna: Zorbax RP300-C18 Guard Cartridge, eluent: 1,5% acetonitryl w 0,1 M HClO_4 , próbka: 25 μl dziesięciokrotnie rozcieńzonego hydrolizatu, (1) glutation zredukowany (GSH) pmol, (2) glutation (GSSG) (brak), (3) nieznan, detekcja: amperometria integracyjna - elektroda złota (Dionex AN110).

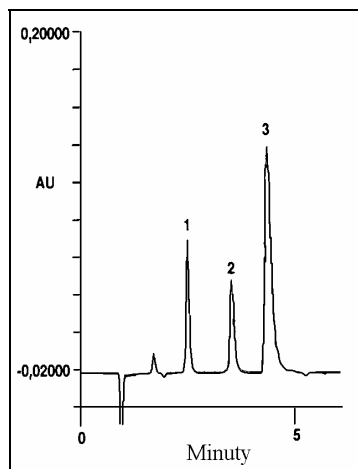
3.3 Detekcja Absorpcyjna

Detekcja absorpcyjna w zakresie światła widzialnego i nadfioletu opiera się na dobrze znanym prawie Lamberta-Beera, które dla przypadku gdy oznaczana substancja jest w pełni zdysocjowana ma postać:

$$\Delta A = \left(\varepsilon_S^x - \frac{x}{y} \varepsilon_E^y \right) \times C_S \times l \quad (17)$$

gdzie: ΔA oznacza zmianę absorbancji wywołaną pojawieniem się jonów analitu w naczynku spektrofotometrycznym detektora, C_S stężenie analitu (mol L^{-1}), ε_S^x i ε_E^y to molowe współczynniki absorpcji odpowiednio jonów analitu i eluentu ($\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$), x i y wartościowości jonów, l długość drogi optycznej (m).

Detekcja absorpcyjna w chromatografii jonowej ma jednak znacznie mniejsze znaczenie niż w chromatografii cieczowej (HPLC). **Bezpośrednia detekcja absorpcyjna** jonów nieorganicznych ($\Delta A > 0$) jest utrudniona ponieważ nie zawierają one odpowiednich chromoforów. Jony nieorganiczne absorbują zwykle poniżej 220 nm (tabela 2). Główne zastosowanie bezpośrednia detekcja absorpcyjna znalazła w oznaczaniu azotanów i azotynów (rysunek 20) jak również bromków i jodków w wodzie pitnej. Jest to metoda szczególnie użyteczna gdy oznaczenie prowadzi się w obecności dużych stężeń chlorków i siarczanów. Jednak i tutaj występuje ograniczenie wywołane powstawaniem ujemnych pików absorbancji Cl^- i SO_4^{2-} .



Rys. 20. Rozdział azotanów i azotynów HPIC, kolumny: separacyjna IonPac AS9, ochronna IonPac AG9, eluent: 1,7 mM NaHCO_3 , 1,8 mM Na_2CO_3 , przepływ 2 ml/min, próbka: 25 μl (1) NO_3^- 3 mg/l, (2) Br^- 10 mg/l, (3) NO_2^- 10 mg/l, detekcja UV w 210 nm (Dionex AU132).

Tabela 2. Długości fali optymalne dla bezpośredniej detekcji absorpcyjnej wybranych jonów

Jon	Długość fali [nm]
Cl^-	190
Br^-	200
I^-	236
CrO_4^{2-}	365
NO_2^-	207
NO_3^-	215
SCN^-	215
$\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$	215
kompleksy metal-Cl	215
kompleksy metal-CN	215
kompleksy metal-EDTA	210
kompleksy metal-PAR*	490-530

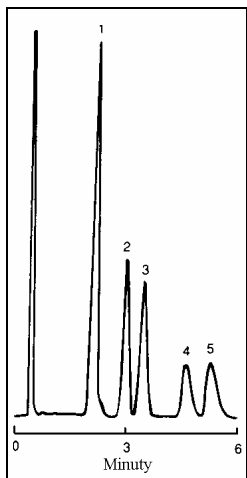
* 4-(2-pyridylazo)-rezorcynol

Tabela 2 cd.

Jon	Długość fali [nm]
N_3^-	195
PO_4^{3-}	190
SO_4^{2-}	190
cytrynian	205

Większe możliwości daje technika **derywatyzacji** pokolumnowej prowadzącej do wytworzenia jonów kompleksowych absorbujących w zakresie UV-Vis. Została ona z powodzeniem wykorzystana do oznaczania metali przejściowych takich jak żelazo (II) i (III), mangan, nikiel, kobalt, cynk, kadm czy miedź.

W metodzie **detekcji pośredniej** ($\Delta\lambda < 0$) wykorzystuje się eluenty oparte o aromatyczne kwasy karboksylowe (wykorzystywane w metodzie chromatografii jednokolumnowej z detekcją konduktometryczną), intensywnie absorbujące światło w zakresie ultrafioletu. W metodzie tej pojawienie się słabo absorbujących jonów analitu w naczynku spektrofotometrycznym detektora objawia, się silnym spadkiem absorbancji roztworu, rejestrowanym jako piki ujemne. Przykład takiego oznaczenia dla mieszaniny pięciu anionów jest przedstawiony na *rysunku 21* (chromatogram w układzie odwróconym). Największą czułość metody otrzymuje się w zakresie długości fali odpowiadającym maksimum molowego współczynnika absorpcji eluentu. Przygotowując eluent dla pośredniej detekcji UV-Vis dąży się do kompromisu pomiędzy często sprzecznymi tendencjami. Z jednej strony zależy nam na odpowiednio dobranej sile elucji, która jest funkcją pH i stężenia eluentu. Z drugiej strony, aby wyniki pomiaru absorpcyjnego były obciążone jak najmniejszym błędem, stężenie i pH eluentu powinny być dobrane, tak aby sumaryczna absorbancja znajdowała się w przedziale 0,2 - 0,8. Obecnie stosowane detektory spektrofotometryczne, dzięki płynnej regulacji długości fali światła analizującego, pozwalają na dobranie odpowiednich warunków pomiaru. Po zatrzymaniu przepływu umożliwiają one rejestrację widma absorpcji substancji znajdującej się w detektorze i ustalenie najkorzystniejszej wartości długości fali, w której wykonuje się pomiar.



Rys. 21. Rozdział anionów HPLC, kolumna separacyjna. PRP-X100 150x4,1-mm, eluent: 2,0 mM benzoosan sodowy pH 6,5, przepływ 2,5 ml/min, próbka: 100 μ l; (1) F⁻, (2) Cl⁻, (3) NO₂⁻, (4) Br⁻, (5) NO₃⁻, detekcja UV pośrednia w 260 nm (Hamilton Appl.77).

3.4 Detekcja Fluorescencyjna

Istotą **detekcji fluorescencyjnej** jest pomiar intensywności emisji światła o określonej długości fali, emitowanego przez wykrywany związek w wyniku jego wzbudzenia światłem o wyższej energii niż światło emitowane. Detektory fluorescencyjne są najbardziej specyficznymi i selektywnymi ze wszystkich detektorów stosowanych w chromatografii cieczowej. Wynika to z tego, że poszczególne związki mogą być wzbudzone tylko światłem o określonej długości fali zapewniającym przejście do najniższego wzbudzonego stanu singletowego cząsteczki. Powrót (dezaktywacja) cząsteczki do stanu podstawowego wiąże się z emisją fotonów promieniowania świetlnego o charakterystycznej długości fali.

W chromatografii jonowej wykorzystuje się metodę derywatywacji przed- lub po- kolumnowej w celu uzyskania fluoryzującego analitu, gdyż tylko nieliczne jony (np. UO_2^{2+} , czy jony obojnacze aminokwasu tryptofanu), posiadają naturalną zdolność do fluorescencji. Dobre wyniki osiągnięto metodą derywatywacji między innymi dla oznaczeń polifosforanów, jodków, azotynów, tiosiarczanów, amoniaku, rubidu, cezu, potasu, a także aminokwasów w hydrolizacie białkowym.

Dobierając eluent do oznaczeń z detekcją fluorescencyjną należy pamiętać o znanym z fotochemii efekcie filtra wewnętrznego. Efekt ten polega na absorpcji promieniowania, wzbudzającego analit jak i emitowanego przez analit, przez cząsteczki rozpuszczalnika (eluentu). Idealny eluent powinien być więc „przezroczysty” zarówno w zakresie fal światła wzbudzającego jak i emitowanego.

Innym rozwiązaniem jest zastosowanie **pośredniej detekcji fluorescencyjnej** z wykorzystaniem takich eluentów jak np. salicylany.

3.5 Inne Metody Detekcji

Poza metodami detekcyjnymi przedstawionymi powyżej, stosowana jest niekiedy **metoda refraktometryczna** (pomiaru współczynnika załamania światła). Ma ona jednak ograniczone zastosowanie z uwagi na małą czułość i niewielką możliwość rozróżnienia jonów próbki od jonów fazy ruchomej. Do wad detekcji refraktometrycznej należy to, że wskazania detektora zmieniają się w zależności od składu fazy ruchomej, a także to, że wymaga on termostatowania z dokładnością $\pm 0,01^\circ\text{C}$. Dlatego detektor refraktometryczny nie nadaje się do pracy przy stosowaniu elucji gradientowej. Zaletą detektora refraktometrycznego jest natomiast możliwość użycia dość dużych stężeń eluentów (kwasy ftalowy, salicylowy, p-hydroksybenzoesowy, o-sulfobenzoesowy), co pozwala na użycie faz stałych o dużej zdolności wymiany jonów.

Inne, rzadziej stosowane w chromatografii jonowej metody detekcji to: **detekcja absorpcji atomowej i cząsteczkowej** oraz **detekcja radiometryczna**.

4. KOLUMNY SEPARACYJNE I ELUENTY

Dobór wypełnienia kolumny separacyjnej i rodzaj użytego eluentu jonowego decydują o jakości rozdzielania chromatograficznego. Poniżej zostały przedstawione podstawowe informacje dotyczące materiałów wypełnień i eluentów stosowanych w chromatografii jonowej.⁷

⁷ Obecnie wybór kolumny jest ułatwiony przez to, że znajdujące się obecnie w użyciu kolumny są wyspecyfikowane do konkretnego rodzaju analiz. Kolumnie dostarczonej przez producenta towarzyszą zwykle dość szczegółowe opisy typowych oznaczeń, które można wykonać z jej użyciem, a także informacje dotyczące przygotowania eluentów i regeneracji kolumny.

4.1 HPIC

4.1.1 Kolumny

Stosowane w chromatografii jonowej HPIC **fazy stałe (jonity)** to prawie wyłącznie żywice syntetyczne. Są to stosunkowo obojętne, porowate materiały polimerowe stanowiące rdzeń (szkielet, osnowę)⁸, do którego przyłączone są aktywne grupy jonowymienne. Grupy te mogą być silnie lub słabo zasadowe lub kwasowe a także mieszane. W zależności od rodzaju grup jonowymiennych rozróżnia się *anionity* - zdolne do wymiany anionów, *kationity* - zdolne do wymiany kationów i *jonity amfoteryczne* - zdolne do wymiany zarówno anionów jak i kationów.

Tabela 3. Rodzaje jonitów

Jonit	Grupa jonowymienna
<p><i>Anionity</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - silnie zasadowe -średnio i słabo zasadowe 	<ul style="list-style-type: none"> -N⁺(CH₃)₃ -N⁺(CH₃)₂H₄OH -NH₂, =NH, -N, -N⁺R₃
<p><i>Kationity</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - silnie kwasowe - średnio kwasowe - słabo kwasowe <p>-bardzo słabo kwasowe</p>	<ul style="list-style-type: none"> -SO₃⁻ -PO₃²⁻ -COO⁻ -CH₂N(CH₂COO⁻)₂ -OH
<p><i>Amfoteryczne</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -COO⁻ i -N⁺(CH₃)₃

Grupy jonowymienne mogą znajdować się zarówno na powierzchni jonitu (żywicy) jak i w jego osnowie.

Większość jonitów to jonity organiczne o szkielecie z kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu (PS/DVB)⁹, który pełni rolę środka sieciującego łańcuchy polistyrenu. Są one bardzo szeroko stosowane, gdyż wykazują bardzo dobrą stabilność w zakresie pH 0 - 14. Umożliwia to użycie eluentów o bardzo wysokim pH, pozwalającym na jonizację substancji, które w pH obojętnym są niezjonizowane jak np. cukry czy słabe kwasy przedstawione w przykładzie na *rysunku 10*. Zawartość diwinylobenzenu w kopolimerze określa **stopień usieciowania**. Usieciowanie ma decydujący wpływ na skuteczność jonitu. Im jest ono wyższe, tym spęcznienie jonitu w roztworze jest mniejsze¹⁰. Usieciowanie bezpośrednio wpływa na proces wymiany jonowej.

⁸ Inne rodzaje podłoża stanowią materiały oparte na matrycy krzemionkowej (do tej grupy należy materiał kolumny użytej w przykładzie na *rysunku 9*), które mogą być pokryte polimerem zawierającym grupy jonowymienne lub sorbenty z unieruchomionymi kompleksującymi grupami funkcyjnymi np. eterami koronowymi, a także materiały nieorganiczne np. zhydroksylowane tlenki glinu, aluminosilikaty, heteropolikwasy lub nierozpuszczalne sole metali.

⁹ Do szeroko stosowanych jonitów organicznych należą również jonity oparte o polimery metakrylanowe i winylowe.

¹⁰ Stopień usieciowania wypełnienia polimerowego materiału kolumny może być miarą jej odporności na działanie eluentów organicznych stosowanych w HPLC. Im jest on wyższy tym odporność ta jest

Jony o dużym promieniu jonowym wskutek hydratacji mogą być eluowane szybciej z jonitu o niższym usieciowaniu, niż z jonitu o wysokim stopniu usieciowania.

Liczba i rodzaj grup jonowymiennych ma bezpośredni wpływ na charakterystykę rozdzielczą jonitu. Silnie kwasowe lub zasadowe grupy są znacznie lepiej zdysocjowane niż słabe. Liczba grup jonowymiennych¹¹ również wpływa na proces wymiany jonowej, ponieważ zwiększenie liczby miejsc aktywnych w jednostce objętości powoduje dłuższe zatrzymywanie jonów próbki w kolumnie wypełnionej jonitem.

Aktywność jonów na żywicy jest trudna do oceny ilościowej, lecz można ją oszacować stosując opisany w rozdziale 2.1 współczynnik selektywności k , który jest miarą powinowactwa jonu próbki do grupy jonowymiennej na żywicy względem jonu eluentu. Im silniej wiązany jest jon przez grupę jonowymienną, tym wyższy będzie współczynnik selektywności. Co oznacza, że jon będzie dłużej przyłączony do grupy jonowymiennej i później zostanie wymyty z kolumny.

Współczynniki selektywności (i czasy retencji) dla anionów rozdzielanych na najczęściej stosowanym, silnie zasadowym anionicie można uszeregować w następującym porządku rosnącym: $\text{OH}^- < \text{F}^- < \text{ClO}_3^- < \text{BrO}_3^- < \text{HCOO}^- < \text{IO}_3^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{H}_2\text{PO}_4^- < \text{HCO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{CN}^- < \text{NO}_2^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{HPO}_4^{2-} < \text{SO}_3^{2-} < \text{SO}_4^{2-} < \text{C}_2\text{O}_4^{2-} < \text{CrO}_4^{2-} < \text{MoO}_4^{2-} < \text{WO}_4^{2-} < \text{S}_2\text{O}_3^{2-} < \text{I}^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{salicylan} < \text{cytrynian}$.

Dla kationów rozdzielanych na silnie kwasowym kationicie porządek ten przedstawia się następująco: $\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Ag}^+ < \text{Tl}^+ << \text{UO}_2^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ba}^{2+} << \text{Al}^{3+} < \text{Sc}^{3+} < \text{Y}^{3+} < \text{Eu}^{3+} < \text{Pr}^{3+} < \text{Ce}^{3+} < \text{La}^{3+} << \text{Pu}^{4+}$.

Zestawienie to pozwala na wyciągnięcie pewnych ogólnych wniosków, takich jak ten, że jony trójwartościowe są wiązane silniej niż jony dwu i jednowartościowe. Co oznacza, że dla wymycia jonów trójwartościowych należy używać silniejszych eluentów niż dla jonów dwuwartościowych. Inny wniosek to taki, że jony o tej samej wartościowości a o większym promieniu jonowym są silniej zatrzymywane przez żywicę niż jony o małym promieniu.

Powyższe zestawienie ma jednak charakter bardzo przybliżony, ze względu na to, iż często reakcja wymiany jonowej nie jest jedynym mechanizmem działającym podczas rozdzielania chromatograficznego.

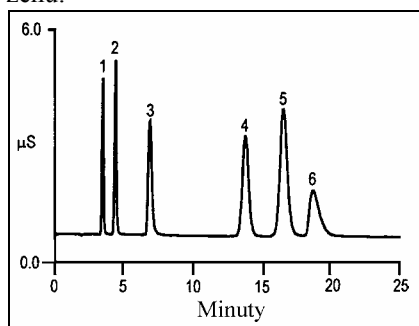
W przykładzie na *rysunku 22* migracja kationów potasu przez kolumnę jonowymienną jest celowo opóźniana przez unieruchomione na powierzchni żywicy ligandy eteru koronowego *18-crown-6*. Promień wewnętrzny cząsteczki tego eteru (0,138 nm) odpowiada promieniowi jonowemu K^+ . Na skutek oddziaływań z eterem koronowym jon K^+ opuszcza kolumnę jako szósty, a nie jako trzeci kation próbki (jak to można było przewidywać na podstawie powyższego zestawienia). Tak zaprojektowane wypełnienie kolumny pozwala na oznaczanie śladowych ilości jonów NH_4^+ i Na^+ w próbce, a także prostych amin alifatycznych, z którymi kation K^+ zwykle interferuje.

większa. Do niedawna, kolumny o zwiększonej odporności na działanie rozpuszczalników organicznych były oznaczane symbolem SC (ang. *solvent compatible*) np. IonPac AS9-SC. Obecnie odporność na rozpuszczalniki organiczne przyjęto jako regułę dla nowo powstających kolumn.

¹¹ Charakteryzuje ją **zdolność wymiany jonów** - ilość grup jonowymiennych w jednostce objętości lub masy jonitu. Wyraża się ją zwykle w milirównoważnikach na gram (meq/g) lub mililitr lub zgodnie z układem SI w mmol/g (w odniesieniu do jednowartościowych grup jonowymiennych).

Na procesy fizykochemiczne w kolumnie wpływa również wiele innych czynników takich jak **położenie miejsc aktywnych**. Jony zatrzymywane przez grupy znajdujące się na powierzchni jonitu charakteryzują się krótszym czasem retencji, niż zatrzymywane przez grupy w osnowie.

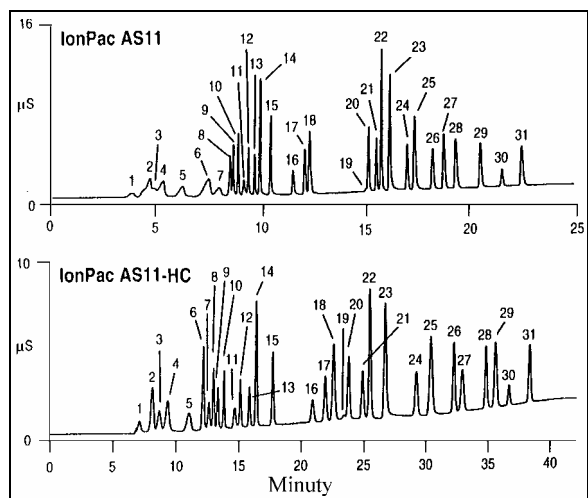
Zarówno zdolność wymiany jonów, jak i położenie miejsc aktywnych są kształtowane w procesach wytwarzania wypełnień kolumn. Rozwinięcie powierzchni wymiany jonowej jest osiągane zwykle przez wytworzenie makro i mikro porów w ziarnach żywicy. Inną technologią (rozwijaną przez *Dionex Co.*) jest naniesienie na powierzchnię ziaren polimerowych, mikroziaren wykonanych z lateksu. Mikroziarna lateksowe utrzymują się na powierzchni ziaren polimerowych dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy grupami sulfonowymi a amoniowymi. Na *rysunku 2* w rozdziale 2.1 przedstawiony jest przykład materiału wypełnienia kolumny anionowymiennej, w którym połączono zastosowanie otoczki z ziaren lateksowych z makroporowatą strukturą ziaren kopolimeru etylenodiwinyllobenzenu i diwinyllobenzenu.



Rys. 22. Rozdział kationów HPIC, kolumny: separacyjna IonPac CS15 4-mm, ochronna IonPac CG15, eluent: 5 mM H_2SO_4 , 9% acetonitryl, przepływ 1,2 ml/min, próbka: 25 μ l, (1) Li^+ 1 mg/l, (2) Na^+ 4 mg/l, (3) NH_4^+ 10 mg/l, (4) Mg^{2+} 5 mg/l, (5) Ca^{2+} 10 mg/l, (6) K^+ 10 mg/l, detekcja konduktometryczna supresor CSRS-II, zewnętrzne zasilanie wodne.

Dla tego typu wypełnienia powierzchnię wymiany jonowej stanowią grupy amoniowe osadzone na powierzchni mikroziaren lateksowych. W przypadku wypełnienia kolumny kationowej na powierzchnię może być osadzona druga warstwa mikroziaren lateksowych ze szczepionymi sulfonowymi grupami kationowymiennymi.

Podstawowe różnice pomiędzy kolumnami z wypełnieniem **mikroporowatym** z powierzchniowo osadzonymi grupami funkcyjnymi i **makroporowatym** można przedstawić porównując działanie kolumny z wypełnieniem mikroporowatym IonPac AS11 i jej odpowiednika z wypełnieniem makroporowatym IonPac AS11-HC (*rysunek 23*). Wypełnienie kolumny AS11-HC jest podobne do pokazanego na *rysunku 2*, natomiast ziarna wypełnienia kolumny AS11 nie posiadają makroporów. Relacja całkowitych zdolności wymiany jonów dla tych kolumn wynosi w przybliżeniu 6,5:1 na korzyść kolumny wysokiej pojemności oznaczonej symbolem HC (ang. *high capacity*).



WO₄²⁻ 20 mg/l, (26) PO₄³⁻ 20 mg/l, (27) fitalan 20 mg/l, (28) cytrynian 20 mg/l, (29) CrO₄²⁻ 20 mg/l, (30) cis-akotynian 20 mg/l, (31) trans-akotynian 20 mg/l. Detekcja konduktometryczna supresor ASRS-II autosupresja. (Dionex Co.)

Jak widać z rysunku 23 rozdział anionów na kolumnie o niskiej pojemności dokonuje się w czasie, prawie o połowę krótszym niż na kolumnie makroporowatej. Dla wyższych stężeń jonów może wystąpić tu jednak poszerzenie pików i efekty związane z przeładowaniem kolumny. Problemy te mogą być wyeliminowane poprzez rozcieńczenie próbki przed pomiarem, co nie zawsze jest korzystne. Kolumna makroporowata pozwala na badanie bardziej stężonych próbek bez konieczności rozcieńczenia i niebezpieczeństwa przeładowania kolumny. Kolumny makroporowate pozwalają na stosowanie bardziej stężonych eluentów o większej sile elucji. Cechę tę można jednak wykorzystać tylko, wtedy gdy pozwala na to stosowany system detekcji (np. detekcja konduktometryczna z supresją). W przypadkach, gdy niewskazane jest używanie zbyt stężonych eluentów tj. bezpośredniej detekcji konduktometrycznej i pośredniej detekcji absorpcyjnej, stosowane są zazwyczaj kolumny o mniejszej zdolności wymiany jonów.

O charakterystyce kolumny wypełnionej żywicą jonowymienną decydują nie tylko takie parametry jak rodzaj żywicy, stopień usieciowania, wielkość porów, rodzaj i ilość grup wymiennych, ale również rozkład wielkości ziaren i jakość upakowania kolumny (patrz uzupełnienia A.II.).

Im mniejsze jest zróżnicowanie wielkości ziaren i lepsze upakowanie - tym wyższa jest selektywność kolumny. Szybkość eluowania dla podobnych jonów ulega zróżnicowaniu wskutek niejednorodnego upakowania i zróżnicowania wielkości ziaren lub po prostu z powodu złego upakowania i w efekcie uzyskuje się słabe rozdzielanie. Niejednorodny przepływ przez kolumnę może być spowodowany nie tylko nieprawidłowym wypełnieniem kolumny, lecz może być także wynikiem uszkodzenia wypełnienia na skutek wstrząsu mechanicznego, szoku termicznego lub nagłej i silnej zmiany równowagi chemicznej.

4.1.2 Eluenty

Dobór eluentu w HPIC zależy głównie od używanej metody detekcji. Ponieważ w większości przypadków detekcja anionów i kationów odbywa się za pomocą detektorów konduktometrycznych, najczęściej stosowane eluenty można podzielić na dwie grupy:

- (i) - eluenty stosowane z detekcją konduktometryczną i *chemicznym* tłumieniem (supresją) przewodnictwa eluentu („chromatografia dwukolumnowa”)
- (ii) - eluenty stosowane z detekcją konduktometryczną i *elektroniczną* kompensacją przewodnictwa eluentu („chromatografia jednokolumnowa”)

Eluenty należące do pierwszej grupy powinny charakteryzować niewielkim przewodnictwem jonowym po chemicznej modyfikacji jaka ma miejsce podczas przejścia eluentu przez supresor.

Jak widać z zestawienia w tabeli 4 eluentami w HPIC anionów z detekcją konduktometryczną i *chemicznym* tłumieniem przewodnictwa są sole słabych kwasów (w tym aminokwasów), których jony są protonowane podczas supresji. Powstające podczas supresji słabe kwasy są zdysocjowane w bardzo niewielkim stopniu i wnoszą bardzo niewielki udział do całkowitego przewodnictwa elektrolitu. Wymienione eluenty, a w szczególności $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pokrywają praktycznie cały zakres zastosowań HPIC anionów. Roztwory $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ są roztworami buforowymi, a od ich stężeń zależy pH eluentu. Stąd dobierając stężenie składników eluentu oprócz wymaganej siły elucji należy brać pod uwagę pH jakie otrzymamy, które należy dobrać, tak aby wszystkie oznaczane substancje były zdysocjowane ($\text{pH}(\text{eluentu}) > \text{pK}_a(\text{najsłabiej dysocjującego składnika próbki})$).

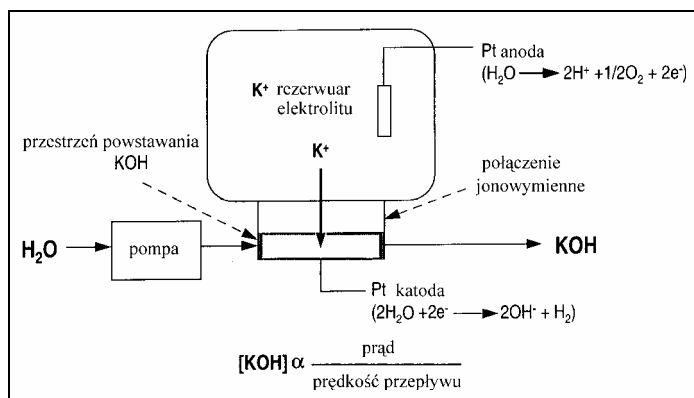
Tabela 4. Najczęściej stosowane eluenty w HPIC anionów z detekcją konduktometryczną i *chemicznym* tłumieniem przewodnictwa eluentu.

Eluent	Jon eluentu	Produkt supresji	Siła elucji
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	$[\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$	silny
$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3\text{H}/\text{NaOH}$	$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3^{2-}$	$\text{RNH}_2^+\text{CH}(\text{R}')\text{SO}_3^{2-}$	dość silny
$\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{CO}_2\text{H}/\text{NaOH}$	$\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{CO}_2^-$	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{CO}_2^-$	dość silny
$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$	$[\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$	dość silny
NaHCO_3	HCO_3^-	$[\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$	słaby
NaOH	OH^-	H_2O	słaby
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	H_3BO_3	bardzo słaby

Współcześnie, zastosowanie supresorów membranowych o dużej wydajności tworzenia protonów pozwala na dość swobodne operowanie wielkością siły elucji. Nawet słabe eluenty (o małym powinowactwie jonów do żywicy jonowymiennej) jak NaOH czy $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ mogą być wykorzystywane w postaci stosunkowo stężonych roztworów (0,1 mol/l). Eluenty te doskonale się nadają do prowadzenia rozdzielania z elucją gradientową.

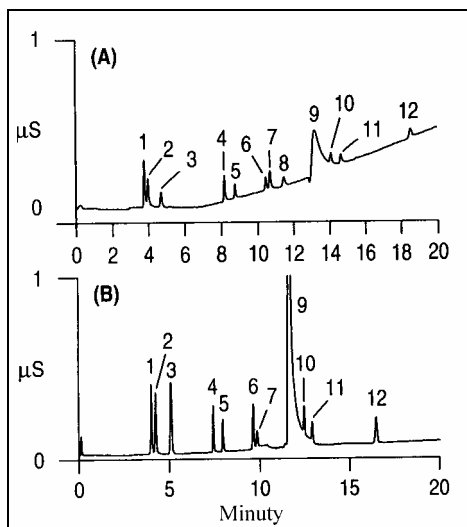
Bardzo nowoczesnym i unikalnym rozwiązaniem jest automatyczna generacja eluentu o pożądanym składzie.

W generatorze eluentu EG40 (Dionex Co.) przedstawionym schematycznie na *rysunku 24* jony K^+ są wprowadzane do wyjściowego elektrolitu, którym jest czysta woda, poprzez półprzepuszczalną membranę oddzielającą rezerwar jonów K^+ od strumienia elektrolitu.



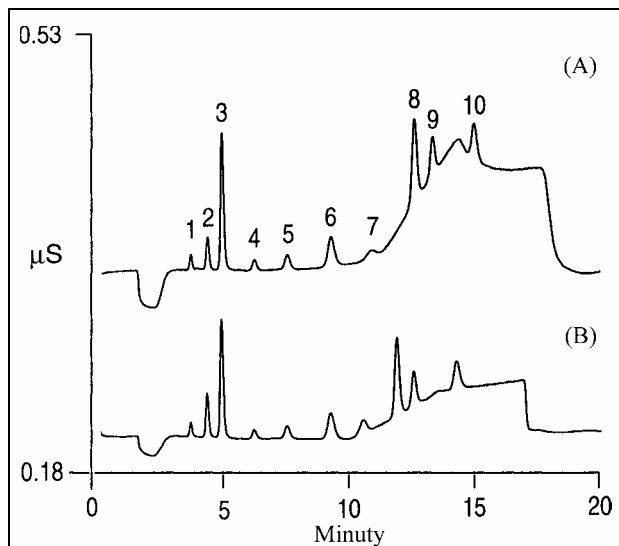
Rys. 24. Schemat działania automatycznego generatora eluentu EG40 (Dionex Co.)

W rezultacie otrzymuje się eluent, którego głównym składnikiem jest całkowicie zdysocjowany KOH. Szybkość dozowania jonów K^+ do roztworu jest kontrolowana napięciem pomiędzy dwoma elektrodami platynowymi. Anoda jest umieszczona wewnątrz rezerwaru jonów a katoda znajduje się w kontakcie ze strumieniem eluentu. Regulując napięcie na elektrodach i prędkość przepływu można z dużą dokładnością regulować stężenie eluentu w zakresie od 0,1 do 100 mM. Możliwy do uzyskania tą metodą gradient stężenia jest praktycznie pozbawiony pulsacji. Otrzymanie podobnie dokładnego gradientu za pomocą najlepszej nawet pompy gradientowej jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe. Dodatkowo, elektroniczna kontrola parametrów pozwala na dostosowanie wartości prądu supresora membranowego do aktualnego stężenia eluentu. Na *rysunku 25* przedstawiono porównanie rozdzielu śladowych ilości anionów za pomocą klasycznej elucji gradientowej uzyskanej za pomocą pompy gradientowej z elucją gradientową uzyskaną za pomocą generatora eluentu EG40.



Rysunek 25. Analiza śladowa anionów HPLC, kolumny: separacyjna IonPac AS11 2-mm, ochronna IonPac AG11, (A) eluent: NaOH 0,5 mM od 0 do 2,5 min, 0,5 mM do 5 mM od 2,5 do 6 min, 5 mM do 26 mM od 6 do 20 min, (B) 0,5 do 26 mM KOH w ciągu 20 min (źródło EG40), przepływ 0,5 ml/min, próbka: 750 μl ; Detekcja konduktometryczna supresor ASRS zewnętrzne zasilanie wodne. (A) (1) F^- 1,4 $\mu g/l$, (2) octan 3 $\mu g/l$, (3) mrówczan 0,88 $\mu g/l$ (4) Cl^- 1,2 $\mu g/l$, (5) NO_2^- 0,71 $\mu g/l$, (6) Br^- 1,6 $\mu g/l$, (7) NO_3^- 1,8 $\mu g/l$, (8) nieznan (9) CO_3^{2-} (10) SO_4^{2-} 0,81 $\mu g/l$, (11) szczawian 1,3 $\mu g/l$, (12) PO_4^{3-} 3,2 $\mu g/l$; (B) (1) F^- 0,9 $\mu g/l$, (2) octan 3 $\mu g/l$, (3) mrówczan 3 $\mu g/l$ (4) Cl^- 0,9 $\mu g/l$, (5) NO_2^- 0,9 $\mu g/l$, (6) Br^- 3 $\mu g/l$, (7) NO_3^- 0,9 $\mu g/l$, (8) nieznan (9) CO_3^{2-} (10) SO_4^{2-} 0,9 $\mu g/l$, (11) szczawian 0,9 $\mu g/l$, (12) PO_4^{3-} 3,0 $\mu g/l$;

Jak już wspomniano w punkcie 3.1, elenty stosowane z detekcją konduktometryczną i *elektroniczną* kompensacją przewodnictwa to praktycznie te elenty, w których skład wchodzi jony organiczne o względnie dużych cząsteczkach (o małej ruchliwości). Najczęściej stosowane w analizie anionów są rozcieńczone (10^{-4} - 10^{-3} M) roztwo-



Rys. 26. Rozdział kationów HPIC, kolumny: separacyjna IonPac CS12A 4-mm, ochronna IonPac CG10, eluent: kwas metanosulfonowy od 17,7 do 43,5 mM, przepływ 1,0 ml/min, próbka: 750 μ l, (1) Li^+ 0,16 $\mu\text{g/l}$, (2) Na^+ 0,64 $\mu\text{g/l}$, (3) NH_4^+ 1,25 $\mu\text{g/l}$, (4) K^+ 0,63 $\mu\text{g/l}$, (5) Rb^+ 3,13 $\mu\text{g/l}$, (6) Cs^+ 3,13 $\mu\text{g/l}$, (7) Mg^{2+} 0,63 $\mu\text{g/l}$, (8) Ca^{2+} 3,13 $\mu\text{g/l}$, (9) Sr^{2+} 3,13 $\mu\text{g/l}$, (10) Ba^{2+} 4,69 $\mu\text{g/l}$, detekcja konduktometryczna supresor CSRS-II.

żone do jonów węglanowych i pozwala na rozdzielanie anionów dwuwartościowych. Odpowiednie sole kwasu ftalowego wykazują jeszcze większą siłę elucji i nadają się do rozdzielania anionów trójwartościowych. Do rozdzielania anionów trójwartościowych stosowane są sole kwasu benzeno-1,3,5-trikarboksylowego.

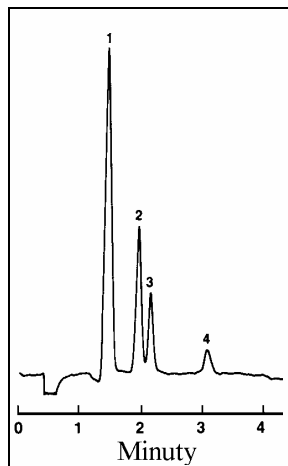
Większość eluentów tej grupy może być stosowana wraz z pośrednią detekcją absorpcyjną.

W HPIC kationów podział eluentów na związane z detekcją konduktometryczną i *chemicznym* tłumieniem (supresją) przewodnictwa eluentu oraz z detekcją konduktometryczną i *elektroniczną* kompensacją przewodnictwa eluentu, nie jest już tak wyrazisty jak w przypadku rozdzielania anionów.

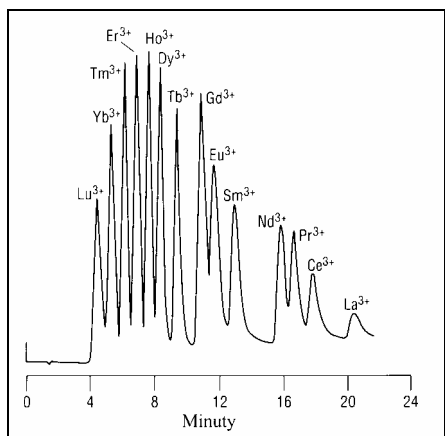
Do rozdzielania kationów metali alkalicznych, NH_4^+ i małych amin alifatycznych są używane mocne kwasy (np. solny i azotowy) w stężeniach 0,002 do 0,04 M niezależnie od tego czy stosuje się supresję czy też nie. Rozdział metali alkalicznych można przeprowadzić używając bardzo rozcieńczonego roztworu azotanu Ce^{3+} z pośrednią detekcją fluorescencyjną.

Rozdział dwuwartościowych kationów metali za

ry soli kwasów benzooesowego, ftalowego i *o*-sulfobenzoesowego, dlatego że łączą one w sobie znaczące powinowactwo do anionitów pokrytych grupami amoniowymi z względnie niską przewodnością molową. Aby w/w kwasy organiczne były zdysocjowane i mogły pełnić rolę eluentów wartość pH fazy ruchomej musi znajdować się w granicach 4 do 7. Jednocześnie bezpośrednia detekcja konduktometryczna nie pozwala na stosowanie dużych stężeń tych eluentów. Powinowactwo jonów benzoosanowych do faz stacjonarnych jest zbli-



Rys. 27. Rozdział kationów HPIC, kolumna separacyjna PRP-X200, eluent: 1,2 mM azotan etylenodiaminowy, przepływ 2 ml/min, próbka: 100 μ l; (1) Mg^{2+} , (2) Ca^{2+} , (3) Sr^{2+} , (4) Ba^{2+} , detekcja konduktometryczna bez supresji. (Hamilton Appl. 61).



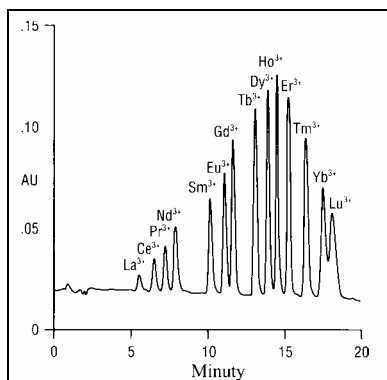
Rys. 28. Rozdział kationów lantanowców HPIC, kolumny separacyjna. IonPac CS3, ochronna IonPac CG3, eluent: kwas α -hydroksyzizomasłowy od 56 do 280 mM w ciągu 23 min, przepływ 1,0 ml/min, próbka: 50 μ l po 10 mg/l każdego kationu, detekcja pośrednia UV/Vis w 530 nm po derywatywacji PAR w reaktorze membranowym przepływ 1,7 ml/min (Dionex TN23).

oraz mieszaniny kwasów 2,3-diaminopropionowego i solnego jako eluentów umożliwia rozdział kationów dwuwartościowych. Siłę elucji tego eluentu można regulować poprzez protonowanie odpowiedniej liczby grup funkcyjnych kwasu 2,3-diaminopropionowego dobierając odpowiednio pH roztworu. Kwas 2,3-diaminopropionowy, w zależności od pH, może występować w roztworze w postaci jedno lub dwuwartościowych kationów o różnej sile elucji, a produktem supresji tego kwasu jest każdorazowo jego jon obojętny. Natomiast w HPIC kationów dwuwartościowych bez supresji stosuje się mieszaniny etylenodiaminy z kwasami dwukarboksylowymi (szczawiovym lub winowym) lub z kwasami mineralnymi (rysunek 27). Rozdziału wielowartościowych kationów metali ciężkich i przejściowych dokonuje się stosując jako związki kompleksujące słabe kwasy organiczne (na przykład kwas 2,6-pirydyno-dikarboksylowy i kwas α -hydroksyzizomasłowy). Reakcje kompleksowania tych kationów umożliwiające ich rozdzielenie (rysunek 28). W zależności od użytego związku kompleksującego kationy metali wielowartościowych mogą być także rozdzielane jako kompleksowe aniony (rysunek 29) lub cząsteczki obojętne.

pomocą rozcieńczonych roztworów kwasów mineralnych jest niemożliwy ze względu na to, że mają one znacznie większe powinowactwo do faz stacjonarnych niż protony (patrz zestawienie w punkcie 4.1.1). Użycie bardziej stężonych roztworów mocnych kwasów w systemach bez supresji jest niemożliwe ze względu na to, że wysokie tło przewodnictwa eluentu uniemożliwia czułą detekcję. W systemach z supresją wymagane jest użycie supresorów membranowych o bardzo dużej wydajności (patrz rysunki 22 i 25).

Na rysunku 26 przedstawiony został przykład oznaczania śladowych ilości jedno- i dwuwartościowych kationów metali z użyciem kwasu metanosulfonowego w elucji gradientowej z supresją membranową.

Zastosowanie supresora membranowego



Rys. 29. Rozdział kationów lantanowców jako kompleksy anionowe HPIC, kolumny separacyjna. IonPac CS5, ochronna IonPac CG5, eluenty: 1) woda dejonizowana 18-M Ω od 20 do 50%, 2) 100 mM kwas szczawiovym od 75 do 25%, 3) 100 mM kwas diglikolowy od 5 do 25%, w ciągu 10 min, przepływ 1,0 ml/min, próbka: 50 μ l po 5 mg/l każdego kationu, detekcja pośrednia UV/Vis w 530 nm po derywatywacji PAR w reaktorze membranowym przepływ 1,7 ml/min (Dionex TN23).

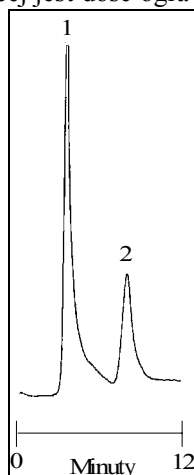
4.2 HPICE

4.2.1 Kolumny

Wybór faz stacjonarnych w chromatografii jonowykluczającej jest dość ograniczony. Sprowadza się on praktycznie do w pełni sulfonowanych kationitów na bazie kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu, na których rozdziela się słabo zdysocjowane kwasy organiczne i nieorganiczne. (Rozdział słabych zasad techniką HPICE nie doczekał się jak dotąd szerszego zastosowania.) Stopień dyfuzji kwasów do wnętrza fazy stacjonarnej, decydujący o czasach ich retencji, zależy od stopnia usieciowania kationitu. Silniejsze kwasy rozdzielają się lepiej przy niskim około 2% usieciowaniu wypełnienia, słabsze przy usieciowaniu około 12%. Większość oferowanych obecnie kolumn ma wypełnienie o „kompromisowym” około 8% usieciowaniu i wielkości ziarna (5-15 μm) zapewniającej szybką dyfuzję składników eluentu przez wypełnienie.

4.2.2 Eluenty

Najprostszym eluentem stosowanym w HPICE jest czysta, dejonizowana woda. Wadą wody jako eluentu jest to, że w pH bliskim obojętnego spora część słabych kwasów i zasad jest całkiem dobrze zdysocjowana a przez to słabo zatrzymywana w mechanizmie jonowykluczającym. Ogólnie, do rozdziału słabych kwasów stosuje się jako eluenty roztwory kwaśne, do słabych zasad zasadowe. Woda w pH zbliżonym do obojętnego obecnie jest stosowana głównie w oznaczaniu węglanów (rysunek 30). Do rozdziału kwasów organicznych stosuje się rozcieńczone roztwory kwasów mineralnych solnego, siarkowego, a także perfluorohexanowego i oktanosulfonowego (niekiedy z dodatkiem mannitolu), w zależności od metody detekcji i używanego rodzaju supresora (w przypadku konduktometrii). W wielu przypadkach długi czas retencji alifatycznych monokwasów i kwasów aromatycznych może być skrócony przez dodanie do eluentu niewielkich ilości rozpuszczalników organicznych (acetonitrylu, 2-propanolu, etanolu), które blokują centra adsorpcyjne na powierzchni fazy stacjonarnej przyspieszając elucję (rysunek 5).

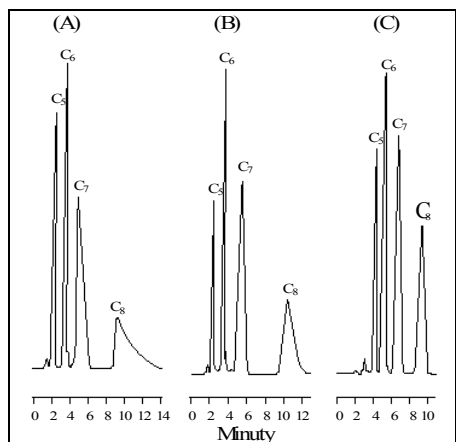


Rys. 30. Oznaczenie węglanów w produktach radiolizy wodnych roztworów tiaproliny (aminokwasu tioeterowego), kolumna separacyjna. HPICE-ASI 4-mm, eluent: woda dejonizowana 18-M Ω zakwaszona do pH 6,7 za pomocą HClO₄, próbka: 10 μl , 1) mocne kwasy, 2) HCO₃⁻, detekcja konduktometryczna

4.3 MPIC

W chromatografii par jonowych MPIC używa się faz stacjonarnych zbudowanych z neutralnych, hydrofobowych kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu

(PS/DVB) oraz tzw. *fazy związanych* oktadecylosilanowych (ODS, C_{18})¹² opartych na matrycy krzemionkowej. Wybrana faza stacjonarna w zależności od używanej fazy ciekłej może być wykorzystana zarówno do rozdzielania anionów jak i kationów. Fazy ODS są również używane w chromatografii ciekłowej w odwróconym układzie faz (RP ang. *reversed phase*). Nie należy jednak używać tej samej kolumny do RP-HPLC i MPIC, ponieważ używanie odczynników stosowanych w chromatografii par jonowych może powodować trwałe zmiany aktywności kolumny przy stosowaniu w zwykłej chromatografii ciekłowej z odwróconym układem faz.



Rys. 31. Efekt hydrofobowości reagentów i stężenia modyfikatora organicznego w rozdziale alkilosulfonianów MPIC, kolumna separacyjna. IonPac NS1, eluenty: (A) 2 mM NH_4OH /acetonitryl (85:11), (B) 2 mM TMAOH/acetonitryl (82:18), (C) 2 mM TBAOH/acetonitryl (63:37), detekcja konduktometryczna supresor ASRS-II. (Dionex TN12).

W odróżnieniu od HPIC w MPIC o selektywności rozdzielania chromatograficznego decyduje przede wszystkim faza ruchoma. Dwa główne składniki tworzące wodną fazę ruchomą stanowią *rozpuszczalnik organiczny* i *reagent* dzięki któremu powstają pary jonowe. Dla uzyskania odpowiedniego rozdzielania zmienia się rodzaj i stężenie każdego z tych składników. Jony hydrofilowe są najlepiej rozdzielane z użyciem reagentów hydrofobowych a anality hydrofobowe z użyciem reagentów hydrofilowych (rysunek 31). Aby rozdział był skuteczny jony reagentu powinny być możliwie małe, tak aby o rozdziale par reagent-analit decydowały w jak największym stopniu indywidualne cechy analitu. Reagenty anionowe muszą być w formie wodorotlenkowej a kationowe w formie kwasowej (protonowanej), aby umożliwić detekcję konduktometryczną z supresją.

Tabela 5. Najczęściej stosowane reagenty w MPIC w kolejności rosnącej hydrofobowości.

Analiza anionów	Analiza kationów
wodorotlenek amonowy	kwas solny, kwas nadchlorowy
wodorotlenek terametyloamoniowy	kwas heksanosulfonowy
wodorotlenek tetrapropylamoniowy	kwas heptanosulfonowy
wodorotlenek butyloamoniowy	kwas oktanosulfonowy

Ponieważ efektywna pojemność kolumny chromatograficznej jest zależna głównie od reagentu, retencja analitu zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia reagentu. Stężenie graniczne reagentu jest wyznaczane przez jego elektrostatyczne oddziaływania z fazą stacjonarną a także, przez pojemność supresora.

¹² W tego rodzaju fazach na powierzchni żelu krzemionkowego związane są łańcuchy alkilowe zakończone grupami funkcyjnymi.

Podobnie jak w HPICE dodatek organicznych modyfikatorów do eluentu (acetonitrylu, metanolu, izopropanolu) blokujących centra adsorpcyjne na powierzchni fazy stacjonarnej i zmniejszających polarność fazy ruchomej, przyspiesza elucję (rysunek 31).

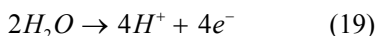
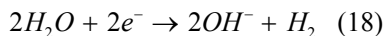
5. SUPRESORY

Tradycyjne supresory w postaci kolumny jonowymiennej przedstawione w punkcie 3.1.1 już powoli odchodzą do przeszłości. Zadecydowały o tym uciążliwości związane z wymaganą dla prawidłowej pracy kolumny okresową jej regeneracją. Ponadto podczas eksploatacji kolumn tłumienia pojawiają się problemy z powtarzalnością i odtwarzalnością wyników związane z niepełną ich regeneracją.

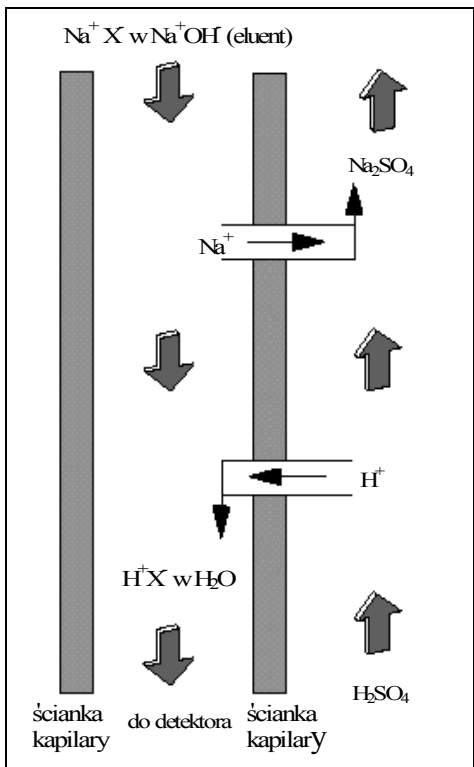
Mimo swych wad idea supresji kolumnowej jest nadal wykorzystywana. Jednym z takich rozwiązań jest zmechanizowany układ do supresji w HPIC anionów, w którym stosuje się kilka kolumn tłumienia pracujących okresowo. Podczas gdy jedna z kolumn pełni aktualnie rolę supresora,

dwie pozostałe są regenerowane roztworem kwasu mineralnego i płukane wodą dejonizowaną.

Innym rozwiązaniem jest zastosowanie elektrochemicznej regeneracji niewielkich kolumn tłumienia. Regeneracja elektrochemiczna polega na elektrolizie wodnej fazy ruchomej wewnątrz wyczerpanej kolumny tłumienia, na końcach której są umieszczone elektrody. Podczas elektrolizy wody na katodzie generowane są aniony wodorotlenkowe a na anodzie kationy wodorowe według reakcji (18) i (19).

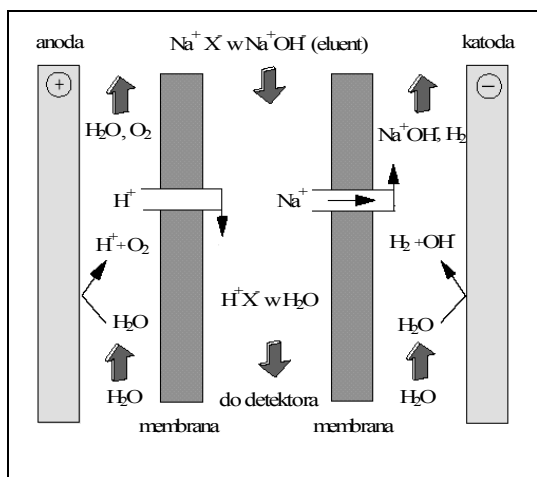


Wygenerowane elektrochemicznie kationy H^+ regenerują stosowane w chromatografii anionów kationowymienne kolumny tłumienia, a aniony OH^- regenerują anionowymienne kolumny tłumienia, stosowane w chromatografii kationów.



Rys. 32. Schemat działania supresora kapilarnego w HPIC anionów.

Sterowany przepływ fazy ruchomej wymusza migrację odpowiednich jonów wzdłuż kolumny i ich dotarcie do osadzonych na powierzchni żywicy grup jonowymien-nych. Obydwa przedstawione rozwiązania umożliwiają quazi-ciągłą pracę chromatografu jonowego.



Rys. 33. Schemat działania autosupresora membranowego (ASRS) w HPLC anionów.

zajmuje odpowiednia liczba kationów wodorowych przenikających do wnętrza kapilary ze strumienia kwasu siarkowego.

Oparte o tę samą zasadę współczesne supresory są zbudowane z płaskich, ułożonych wielowarstwowo membran co daje znacznie większą powierzchnię wymiany jonowej i większą wydajność supresji w stosunku do starszych supresorów kapilarnych.

W kolejnej generacji supresorów membranowych tzw. *autosupresorów* do wytwarzania jonów wodorowych i wodorotlenowych wykorzystano procesy elektrodowe (18) i (19). Napięcie podane na elektrody wymusza odpowiedni ruch jonów, które są wymieniane między eluentem a regenerantem poprzez membranę w procesie elektrodializy (rysunek 33). W tego rodzaju supresorach jako regenerantów używa się: (i) czystej, dejonizowanej wody (autosupresja z zewnętrznym zasilaniem wodnym), (ii) roztworów kwasów (lub zasad) o odpowiednio dobranym składzie (supresja chemiczna bez podawania napięcia na elektrody), czy wreszcie (iii) fazy ruchomej, która opuściła już detektor konduktometryczny (autosupresja z zawracaniem eluentu). Obecnie produkowane supresory membranowe charakteryzują się małymi objętościami własnymi (cecha bardzo pożądana w HPLC), dużymi wydajnościami wymiany jonowej, szerokim zakresem możliwych do stosowania prądów, a także zwiększoną odpornością membran na rozpuszczalniki organiczne stosowane w HPLC. Poprawiona została również odporność membran na ciśnienia występujące podczas rozdzielania chromatograficznego. Zastosowanie supresorów membranowych o dużej wydajności wymiany jonowej pozwoliło na wprowadzenie na szeroką skalę do chromatografii jonowej elucji gradientowej (gradient stężenia) bez potrzeby uciekania się do tzw. gradientu izoprzewodnościowego¹³ czy równoważenia przewodnictwa.

¹³ Skład eluentów mieszanych podczas wytwarzania gradientu jest tak dobrany, aby przewodność eluentu była stała.

Oddzielną kategorię supresorów stanowią supresory o działaniu ciągłym, które jest oparte o procesy wymiany jonowej zachodzące poprzez membrany jonowymienne (dializa). W początkowym okresie wykorzystywano do tego celu supresory kapilarne (rysunek 32). W tego rodzaju supresorze podczas analizy anionów eluent (np. NaOH), zawierający jony analitu, płynie wewnątrz włókna kapilarnego, na zewnątrz którego w przeciwnym kierunku płynie kwas siarkowy. Jony sodowe opuszczają wnętrze kapilary poprzez kationowymienną ściankę a ich miejsce

6. ZASTOSOWANIA

Pełna prezentacja całej gamy zastosowań techniki chromatografii jonowej (HPIC, HPICE, MPIC) znacznie przekracza ramy tego opracowania. W możliwościach jakie niesie ze sobą ta metoda analityczna pozwala zorientować się przedstawiona poniżej lista procedur analitycznych zalecanych przez amerykańskie agendy rządowe, w których wykorzystywana jest metodyka chromatografii jonowej. Zestawienie to jest uzupełnione przez listę procedur analitycznych (not aplikacyjnych) wykorzystujących chromatografię jonową, proponowanych przez *Dionex Co.*

Co warte zauważenia, zakres zastosowań chromatografii jonowej daleko wykracza poza związki, które w potocznym rozumieniu zwykło się uważać za jonowe.

Agencja Ochrony Środowiska (EPA)

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
200.10	Determination of Trace Elements in Marine Waters by On-Line Chelation Preconcentration and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.	Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , VO^{2+} , VO_2^{2+} , UO_2^{2+}	wody morskie, wody rzeczne, solanka
200.13	Determination of Trace Elements in Marine Waters by Off-Line Chelation Preconcentration with Graphite Furnace Atomic Absorption.	Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+}	wody morskie, wody rzeczne, solanka
218.16	Determination of Dissolved Hexavalent Chromium in Drinking Water, Ground Water, and Industrial Waste Water Effluents by Ion Chromatography.	CrO_4^{2-}	woda pitna, woda gruntowa, przemysłowa, woda odpadowa
300.0	The Determination of Inorganic Anions in Water by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_2^- , ClO_3^- , BrO_3^-	woda pitna, woda powierzchniowa, woda gruntowa, woda reaktorowa, ciała stałe, ługi
300.1	The Determination of Inorganic Anions in Water by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_2^- , ClO_3^- , BrO_3^-	woda pitna, woda powierzchniowa, woda gruntowa, woda reaktorowa, ciała stałe, ługi
300.6	Chloride, Orthophosphate, Nitrate, and Sulfate in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography.	Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-}	wody opadowe
300.7	Dissolved Sodium, Ammonium, Potassium, Magnesium, and Calcium in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography.	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}	wody opadowe
7199	Determination of Hexavalent Chromium in Drinking Water, Groundwater, and Industrial Waste Water Effluents by Ion Chromatography.	CrO_4^{2-}	woda pitna, woda gruntowa, przemysłowa, woda odpadowa
9056	Anion Chromatography Method.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	spalone próbki stałe, wszystkie wody

Standard methods

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
4110	Determination of Anions by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	woda powierzchniowa, woda gruntowa, ścieki wodne, woda pitna

Agencja Standartów i Materiałów (ASTM)

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
D2036-97	Cyanides in Water.	cyjanki	roztwory wodne
D4327-91	Anions in Water by Chemically Suppressed Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	woda pitna, ścieki wodne
D4856-90	Determination of Sulfuric Acid Mist in the Workplace Atmosphere (Ion Chromatographic).	H_2SO_4	próbki powietrza
D5085-90	Determination of Chloride, Nitrate, and Sulfate in Atmospheric Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography.	Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}	wody opadowe
D5257-93	Dissolved Hexavalent Chromium in Water by Ion Chromatography.	CrO_4^{2-}	ścieki wodne, woda powierzchniowa, wo- da pitna

Narodowy Instytut Bezpieczeństwa Pracy (NIOSH)

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
S173	Formic acid.	kwas mrówkowy	próbki powietrza
2008	Chloroacetic Acid.	kwas chlorooctowy	próbki powietrza
3509	Aminoethanol Compounds II.	etanoamina, dietanoamina, trietanoamina	próbki powietrza
5022	Arsenic, organo-compounds.	kwasy arsenoorganiczne	próbki powietrza
6004	Sulfur Dioxide.	SO_2 , SO_4^{2-}	próbki powietrza
6005	Iodide	I^-	próbki powietrza
6011	Bromine and Chlorine	Br^- , Cl^-	próbki powietrza
6701	Ammonia	NH_4^+	próbki powietrza
7604	Chromium, Hexavalent	CrO_4^{2-}	próbki powietrza
7903	Acids, Inorganic	Br^- , Cl^- , F^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	próbki powietrza

Urząd Bezpieczeństwa Pracy (OSHA)

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
ID-104	Sulfur Dioxide in Workplace Atmospheres (Bubbler).	SO_2	próbki powietrza
ID-108	Bromine in Workplace Atmospheres.	Br^- , BrO_3^-	próbki powietrza
ID-177	Iodide in Workplace Atmospheres.	I^-	próbki powietrza
ID-180	Phosphine in Workplace Atmospheres.	PO_3^{3-}	próbki powietrza
ID-182	Nitric Dioxide in Workplace Atmospheres (IC).	NO_2^-	próbki powietrza
ID-188	Ammonia in Workplace Atmospheres-Solid Sorbent.	NH_4^+	próbki powietrza
Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
ID-190	Nitric Oxide in Workplace Atmospheres.	NO_2^-	próbki powietrza

ID-202	Determination of Chlorine Dioxide in Workplace Atmospheres.	ClO_2^-	próbki powietrza
--------	---	------------------	------------------

Noty Aplikacyjne, noty uzupełniające i noty techniczne *Dionex Co.*

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
AN2	Analysis of Nitrate and Sulfate Collected on Air Filters.	NO_3^- , SO_4^{2-}	próbki powietrza
AN4	Analysis of Engine Coolants by Ion Chromatography.	aniony i kationy	roztwory chłodzące
AN21	Organic Acids in Wine.	kwasy: cytrynowy, winowy, mlekowy, maleinowy, bursztynowy, octowy, węglowy, fumarowy	wina
AN24	Determination of Formaldehyde as Formate Ion.	mrówczany, octany, Cl^- , F^-	próbki powietrza
AN25	Determination of Inorganic Ions and Organic Acids in Non-Alcoholic Carbonated Beverages.	Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , cytryniany, kwasy: cytrynowy, maleinowy, malonowy, mrówkowy, pirogronowy, bursztynowy, Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}	napoje bezalkoholowe
AN31	Determination of Anions in Acid Rain by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	
AN36	Determination of Oxalate in Urine by Ion Chromatography.	szczawiany	mocz
AN37	Determination of Iodide in Milk Products.	I^-	
AN45	Fatty Acid Analysis.	kwasy tłuszczowe	emulsja wodna
AN46	Ion Chromatography: A Versatile Technique for the Analysis of Beer.	cukry proste, dwucukry, kwasy organiczne, jony nieorganiczne	piwo
AN51	Method for Determination of Anions in Sodium Hydroxide.	aniony nieorganiczne	ług sodowy
AN53	Method for the Determination of Trace Sulfate in Brine.	SO_4^{2-} w ilościach śladowych	solanka
AN54	Determination of Sulfite in Food and Beverages by Ion Exclusion Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.	SO_3^{2-}	żywność i napoje
AN55	Determination of Metal Cyanides.	cyjanki	roztwory wodne
AN56	Determination of Trace Anions and Key Organic Acids in High Purity, Ammoniated, and Borated Waters Found in Steam Cycle Power Plants.	aniony, kwasy organiczne w ilościach śladowych	woda obiegowana w energetyce

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
AN61	Tobramycin in Pharmaceutical Formulations.	tobramycyna	farmaceutyki
AN65	Analysis of Inositol Phosphates.	fosforany	płyiny fizjologiczne
AN66	Neomycin in Topical Lotions Polysaccharide Analysis: Maltodextrins, Dextrans.	neomycyna, wielocukry	płyiny do przemywania ran

AN67	Polysaccharide Analysis: Maltodextrins, Dextrans, Inulin and Other Oligosaccharides.	wielocukry	roztwory wodne, farmaceutyki
AN69	Determination of Aluminum in Complex Matrices Using Chelation Ion Chromatography.	Al ³⁺	roztwory wodne
AN70	Choline and Acetylcholine.	cholina i acetylocholina	gazy fizjologiczne, roztwory wodne
AN71	Determination of Polyphosphates Using Ion Chromatography with Suppressed Conductivity Detection.	polifosforany	roztwory wodne
AN72	Determination of Trace Metals in Water Miscible Organic Solvents by Ion Chromatography/Inductively Coupled Argon Plasma Spectroscopy (IC/ICAP).	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , VO ²⁺ , VO ²⁺ w ilościach śladowych	woda, alkohole, acetonitryl
AN73	Determination of Trace Transition Metals in Reagent-Grade Acids, Bases, and Salts Using Ion Chromatography/ Inductively Coupled Argon Plasma Spectroscopy (IC/ICAP).	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺ w ilościach śladowych	roztwory zasad, kwasów i soli
AN75	Determination of Trace Transition Metals in Reagent Grade Acids, Bases, Salts, and Organic.	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺ w ilościach śladowych	roztwory zasad, kwasów i soli
AN76	Solvents Using Chelation Ion Chromatography Elimination of Iron and Aluminum Interferences in Sample Matrices by Ion Chromatography/Inductively Coupled Argon Plasma Emission Spectroscopy (IC/ICAP).	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺	roztwory wodne o dużej zawartości glinu i żelaza
AN77	Elimination of Iron and Aluminum as Matrix Interferences for Determination of Transition Metals Using Chelation Ion Chromatography.	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺	roztwory wodne o dużej zawartości glinu i żelaza
AN78	Determination of Trace Anions in Concentrated Hydrofluoric Acid.	Br ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₄ ²⁻ w ilościach śladowych	kwas fluorowodorowy
AN79	Determination of Uranium and Thorium in Complex Matrices Using Chelation Ion Chromatography.	uran i tor	złożone roztwory wodne
AN80	Determination of Dissolved Hexavalent Chromium in Drinking Water, Ground Water, and Industrial Waste Water Effluents by Ion Chromatography.	CrO ₄ ²⁻	woda pitna, woda gruntowa, przemysłowa woda odpadowa
AN81	Determination of Oxyhalides and Other Anions by Ion Chromatography Using a Borate-Based Eluent.	Br ⁻ , Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₂ ⁻ , ClO ₃ ⁻ , BrO ₃ ⁻	woda pitna

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
AN82	Analysis of Fruit Juice Adulterated with Medium Invert Sugar from Beets.	cukry proste, kwasy organiczne	soki owocowe
AN83	Size Exclusion Chromatography of Polysaccharides with Pulsed Amperometric Detection.	wielocukry	roztwory wodne
AN85	Determination of Trace Anions in Isopropyl Alcohol.	Br ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₄ ²⁻ w ilościach śladowych	alkohol izopropylowy

AN86	Determination of Trace Cations in Power Plant Waters Containing Morpholine.	kationy w ilościach śladowych	woda obiegowa w energetyce
AN87	Determination of Sugar Alcohols in Confections and Fruit Juices by High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD).	inozytol, ksylitol, sorbitol, mannitol, glikoza, fructoza, sukroze, dulcytol, arabinoza, mannoza, ksyloza, galaktoza.	solki owocowe
AN92	The Determination of Sugars in Molasses by High-Performance Anion Exchange with Pulsed Amperometric Detection.	cukry	melasa
AN93	Determination of Trace Anions in Concentrated Bases Using AutoNeutralization™ Pretreatment/Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_3^-	stężone zasady
AN94	Determination of Trace Cations in Concentrated Acids Using AutoNeutralization Pretreatment/Ion Chromatography.	Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , Ca^{2+} , dietyloamina, trietyloamina w ilościach śladowych	stężone kwasy
AN101	Trace Level Determination of Bromate in Ozonated Drinking Water Using Ion Chromatography.	BrO_3^- , Cl^- , Br^- , ClO_2^- , ClO_3^- , w ilościach śladowych	woda pitna
AN104	Analysis of Personal Care Products by IC.	aniony, kwasy organiczne	środki higieny osobistej
AN105	Glycosylation Analysis of Human Serum Transferrin Glycoforms Using Pellicular Anion-Exchange Chromatography.	glikoproteiny, wielocukry	serum, płyny fizjologiczne
AN106	Ion Chromatography in the Pharmaceutical Industry.	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , kwasy organiczne	roztwory farmaceutyków
AN107	Ions in Physiological Fluids.	Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , kwasy organiczne	płyny fizjologiczne: mocz, plazma, serum
AN108	Determination of Transition Metals in Serum and Whole Blood by Ion Chromatography.	Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} w ilościach śladowych	serum
AN109	Determination of Glyphosate by Cation-Exchange Chromatography with Postcolumn Derivatization.	glikofosforany	płyny fizjologiczne
AN110	Determination of Glutathione in Cultured Mammalian Cells with Integrated Amperometry.	glutation, glutation zredukowany	płyn komórkowy
AN112	Determination of Nitrate and Nitrite in Meat Using HPAE Chromatography	NO_2^- , NO_3^-	mięso

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
AN113	Determination of Trace Anions in High Purity Waters by High Volume/Direct Injection IC.	Cl^- , F^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Br^- , SO_4^{2-} , szczawiany w ilościach śladowych	ultra czysta woda
AN 114	Determination of Trace Anions in High Purity Waters Using Direct Injection and Two-Step Isocratic IC.	Cl^- , F^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Br^- , SO_4^{2-} , szczawiany w ilościach śladowych	ultra czysta woda
AU101	Transition Metals in Power Plant High Purity Water.	Cl^- , F^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Br^- , SO_4^{2-} , szczaw-	ultra czysta woda

AU102	Trace Anions in Power Plant High Purity Water and Borated Water.	Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Br ⁻ , SO ₄ ²⁻ , szcza- wiany w ilościach śladowych	ultra czysta woda, woda obiegowa w energetyce
AU103	Trace Anions in Power Plant High Purity Water.	Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Br ⁻ , SO ₄ ²⁻ , szcza- wiany w ilościach śladowych	ultra czysta woda
AU106	Trace Calcium and Magnesium in Brine.	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Br ⁻ , SO ₄ ²⁻ , szcza- wiany w ilościach śladowych	solanka
AU107	Direct Determination of Cyanide in Strongly Alkaline Solutions.	cyjanki	ługi
AU109	Azole Corrosion Inhibitors.	azolowe inhibitory korozji elektrochemicznej	roztwory wodne
AU111	Copper Gleam PCM or PC in LeaRonal Acid Copper Baths.	Ca ²⁺	kąpiele galwaniczne
AU113	Determination of Silica.	krzemiany	roztwory wodne
AU119	Phenols .	fenole	roztwory wodne
AU121	Monovalent Cations in Explosives.	kationy jednowartościowe	materiały wybuchowe
AU122	Determination of Iodide in Brine.	I ⁻	solanka
AU125	Monosaccharide Analysis of Serum.	cukry proste	serum
AU126	Determination of Diethanolamine and Triethanolamine in Surface Finishing, Waste Water, and Scrubber Solutions.	dietyloamina, trietyloamina	ścieki z obróbki polerskiej
TN8	The Use of Concentrator Columns in IC.	jony w ilościach śladowych	roztwory wodne
TN9	Conductivity Detection, Conductance Laws, and Electrolyte Equilibria.		
TN10	Determination of Transition Metals by Ion Chromatography.	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ w ilościach śladowych	roztwory wodne
TN12	Methods Development Using Ion-Pair Chromatography with Suppressed Conductivity Detection.		
TN16	Eluent Preparation for First Generation Dionex Columns.		

Metoda	Tytuł Metody	Analit	Matryca
TN19	Gradient Elution in Ion Chromatography: Anion Exchange with Conductivity Detection.		
TN20	Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD).	węglowodany	roztwory wodne
TN23	Ion Chromatography of Lanthanide Metals.	kationy lantanowców	roztwory wodne
TN24	Determination of Chromium by Ion Chromatography.	CrO ₄ ²⁻	roztwory wodne
TN26	Determination of Cr(VI) in Water, Waste Water, and Solid Waste Extracts.	CrO ₄ ²⁻	roztwory wodne, ścieki itp.

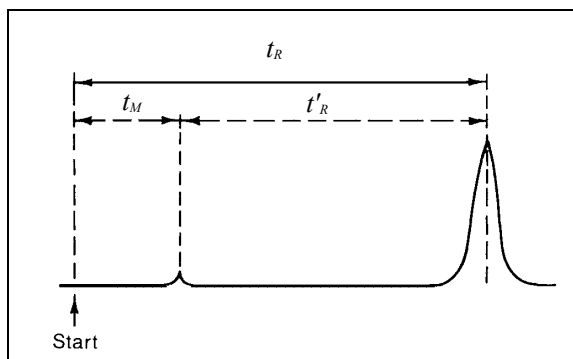
TN27	Determination of Lanthanide Metals in Digested Rock Samples by Chelation Ion Chromatography.	kationy lantanowców	lanthanow-	rozpuszczone skały
TN28	Ion Chromatography/Inductively Coupled Argon Plasma (IC/ICAP): A New Technique for Trace Metal Determinations.	metale		roztwory wodne
TN29	Automated Sample Preconcentration of Metals in Drinking Water for Inductively Coupled Argon Plasma (ICAP) Spectroscopy Monosaccharide and Oligosaccharide Analysis of Glycoproteins Electrotransferred onto Polyvinylidene.	glikoproteiny, cukry, wielocukry	cu-	roztwory wodne, płyny fizjologiczne
TN30	Fluoride (PVDF) Membranes.			
TN36	Analysis of Exoglycosidase Digestions of N-Linked Oligosaccharides Using HPAE-PAD.	glikoproteiny, wielocukry	wie-	roztwory wodne, płyny fizjologiczne
TN37	Flow Control in the GP40.			
TN39	System Suitability with PeakNet Software for GLP Compliance.			
TN40	Glycoprotein Monosaccharide Analysis Using HPAE-PAD.	glikoproteiny, wielocukry	wie-	roztwory wodne, płyny fizjologiczne
TN41	Analysis of Sialic Acids Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography.	N- i O- kwasy neuroamino-	podstawione	płyny fizjologiczne

UZUPEŁNIENIA

A. Elementy Teorii Chromatografii

A.1. Podstawowe Wielkości

Chromatogram stanowi graficzną reprezentację sygnału chromatograficznego. Składniki mieszaniny chromatografowanej, opuszczając kolumnę, są kolejno wykrywane przez detektor, a odpowiadające im pliki są rejestrowane w postaci chromatogramu (rysunek A1).

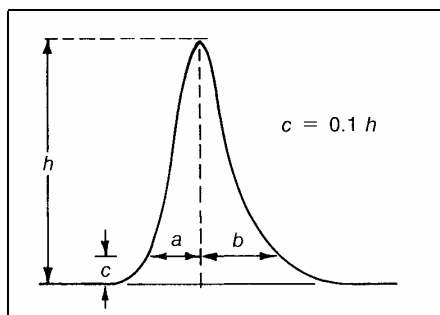


Rys. A1. Parametry retencji

Różne substancje są rozdzielane na kolumnie chromatograficznej tylko wtedy gdy różnią się między sobą czasem przebywania w kolumnie. Czas upływający od zadozowania, po którym pojawia się maksimum piku rozpatrywanego składnika próbki nazywa się **całkowitym czasem retencji** t_R . Zawiera on czas retencji substancji niezatrzymywanej przez kolumnę, zwany **czasem martwym retencji** t_M . Przez **zredukowany czas retencji** t'_R rozumie się różnicę pomiędzy całkowitym czasem retencji a czasem martwym retencji. Niekiedy korzystne jest posługiwanie się objętościami retencji, które otrzymuje się mnożąc odpowiednie czasy retencji przez objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej (eluentu).

Kształt piku chromatograficznego w pierwszym przybliżeniu opisywany krzywą Gaussa z reguły jednak nie jest idealny (rysunek A2). Prawie zawsze wykazuje on zniekształcenie, które można opisać równaniem (I).

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (I)$$



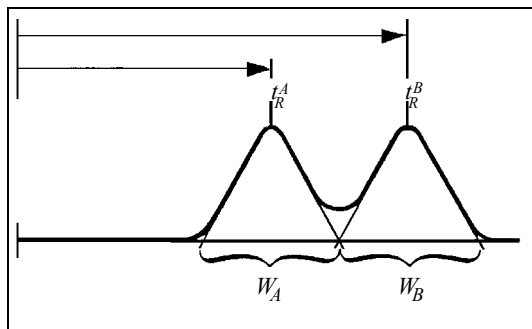
Rys. A2. Asymetria piku

Przypadek odwrotny, to jest gdy A_s jest mniejsze od jedności nazywany jest **rozmyciem przedniej części piku** (*fronting*). Za ogonowanie odpowiadają głównie procesy adsorpcyjne. Z rozmyciem przedniej części piku mamy do czynienia gdy faza stacjonarna nie zawiera dostatecznej ilości centrów adsorpcyjnych, stąd część cząsteczek (lub jonów) próbki pomija centrum piku. Praktycznie wymaga się od będących w użyciu kolumn separacyjnych aby A_s

leżał w granicach od 0,9 do 1,2. Górną granicę A_S pozwalającą jeszcze na wyodrębnienie pików stanowi liczba 2,5, powyżej której bardzo trudno jest znaleźć koniec pików.

Przy porównywaniu wielkości retencyjnych (np. do celów analizy jakościowej) należy uwzględnić to, że piki powinny być możliwie symetryczne. Retencja tej samej substancji, gdy jej pik jest niesymetryczny, zmienia się w zależności od wielkości zadozowanej próbki. Im ta ilość jest większa tym krótszy jest czas retencji analitu.

A.II. Parametry Jakości Rozdziału Chromatograficznego



Rys. A3. Rozdzielczość.

Celem każdego procesu separacyjnego jest otrzymanie odpowiedniej rozdzielczości to jest zdolności do oddzielenia składnika A od składnika B w procesie (rysunek A3).

Wykorzystując zmierzone wielkości retencyjne, można obliczyć niektóre wielkości charakteryzujące rozdział chromatograficzny. Jedną z nich jest **stosunek podziału składnika** chromatografowanego **między fazę stacjo-**

narną i ruchomą k' .

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{II})$$

Wielkością, którą można bardzo łatwo wyznaczyć, a która zależy między innymi od rodzaju rozdzielanych substancji i od rodzaju fazy stacjonarnej, jest **retencja względna α (selektywność)**. Określa się ją jako stosunek retencji dwu, zwykle trudno rozdzielających się substancji. Im bardziej α jest różne od jedności, tym lepiej dwie substancje się rozdzielają.

Rozdzielczość R jest zwykle definiowana jako odległość pomiędzy maksymi pików podzielona przez średnią szerokość podstawy tych pików (patrz rysunek A3).

$$R = \frac{t_R^A - t_R^B}{0,5(W_A + W_B)} \quad (\text{III})$$

Piki są lepiej rozdzielone im większa jest wartość R . Gdy R jest równa lub większa od 1,5, piki są rozdzielone do linii podstawowej.

Rozdzielczość jest funkcją selektywności α , stosunku podziału k' a także sprawności kolumny, wyrażoną przez **liczbę póltek** teoretycznych N .¹⁴ Liczbę póltek teoretycznych można obliczyć z piku chromatograficznego według przybliżonego wzoru (IV) wyprowadzonego przy założeniu gaussowskiego (symetrycznego) kształtu piku:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{IV})$$

gdzie: $W_{1/2}$ jest szerokością piku w połowie jego wysokości.

Liczba póltek teoretycznych jest miarą dyspersji złoża fazy stacjonarnej. Czym mniejsza jest dyspersja złoża tym większa jest liczba N . Pokazuje ona jak dobrze kolumna jest pakowana. Innymi czynnikami determinującymi liczbę póltek teoretycznych kolumny są: wielkość cząstek złoża, ich rozkład w objętości kolumny, oraz porowatość i przepuszczalność.

Kolumny używane w chromatografii jonowej są pakowane złożami o różnej wielkości i charakterze cząstek (ziaren). Jedną z najważniejszych własności złoża jest wielkość cząstek, ponieważ ma ona bezpośredni wpływ na skuteczność kolumny. uogólniając, mniejszym wymiarom ziaren odpowiada większa skuteczność rozdzielania. Występuje ona, dlatego że zastosowanie mniejszych cząstek wypełnienia zmniejsza drogę dyfuzji i minimalizuje dyspersję złoża. Także większa jednolitość wymiarów ziaren i ich upakowania zwiększa skuteczność rozdzielania chromatograficznego.

Zdefiniowaną wzorem (III) rozdzielczość R można wyrazić równaniem (V) uwzględniając jej zależność od k' , α i N :

$$R = \frac{k'_2}{1+k'_2} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (\text{V})$$

W tym wypadku k'_2 wyraża stosunek podziału dla ostatniego eluowanego składnika.

Do poprawienia rozdzielczości można dążyć wpływając na k' poprzez zwiększenie siły elucji fazy ruchomej. W metodzie HPIC osiąga się to zwiększając stężenie i siłę jonową roztworu. Postępowanie takie jest jednak ograniczone pojemnością kolumny i detektora, a także (w przypadku IC z detekcją konduktometryczną) pojemnością (lub prądem) supresora. Innym sposobem jest zwiększenie liczby póltek teoretycznych (N), zastosowanie kolumny dłuższej (lub dwu kolumn szeregowo), zwiększa to jednak czas analizy. W przypadku kolumn wypełnionych ziarnami większymi niż 10 μm , skuteczne bywa też zmniejszenie prędkości przepływu eluentu. Ostatnim sposobem zwiększenia rozdzielczości jest zwiększenie selektywności (α). W tym celu należy wybrać inną kolumnę, lepiej dopasowaną do danego problemu analitycznego lub zmienić skład eluentu na inny.

¹⁴ Pojęcie półki teoretycznej wprowadzono przez analogię do procesu destylacji. Liczba póltek teoretycznych odpowiada liczbie osiągniętych stanów równowagi pomiędzy stężeniami składnika chromatografowanego w fazie ruchomej i stałej. **Wysokość równoważna półce teoretycznej H** (wysokość półki) jest najmniejszą długością odcinka kolumny, w której osiąga się ten stan.

B. Analiza jakościowa

Parametry retencji, takie jak zredukowany czas retencji, są wielkościami charakteryzującymi substancje i mogą być użyte do ich identyfikacji. Porównuje się przy tym czas retencji chromatografowanej substancji z czasem retencji pików wzorca. W jednakowych warunkach (rodzaj kolumny, wypełnienie, temperatura, skład i prędkość przepływu eluentu) substancja chromatografowana ma zawsze takie same parametry retencji.

Identyfikacja poszczególnych substancji możliwa jest **metodą rzeczywistego czasu retencji**, w której pik identyfikuje się w zakresie założonej tolerancji standardowego czasu retencji. Przy stosowaniu metody rzeczywistego czasu retencji, identyfikacji dokonuje się przy spełnieniu poniższej nierówności:

$$t_S - t_i < T \quad (\text{VI})$$

gdzie: t_S oznacza standardowy czas retencji pików, który ma być identyfikowany, t_i zmierzony czas retencji pików identyfikowanego, T tolerancję czasu retencji pików.

W **metodzie względnego czasu retencji** identyfikacja odbywa się poprzez korektę rozbieżności czasów retencji wywołanej zmianami warunków analizy. W tej pik odniesienia identyfikuje się zgodnie z nierównością (VI), natomiast pozostałe pików zostają zidentyfikowane przy spełnieniu poniższej nierówności:

$$t_S - t_{Zi} \times \frac{t_{SO}}{t_{ZO}} < T \quad (\text{VII})$$

gdzie: t_S oznacza standardowy czas retencji pików identyfikowanego, t_{SO} standardowy czas retencji pików odniesienia, t_{ZO} zmierzony czas retencji pików odniesienia, t_{Zi} zmierzony czas retencji pików identyfikowanego, T tolerancja czasu retencji pików identyfikowanego

C. Analiza ilościowa

Podobnie jak w innych rodzajach chromatografii kolumnowej, w chromatografii jonowej ilościową zawartość składnika w próbce oblicza się wykorzystując to, że ilość tego składnika jest proporcjonalna do powierzchni lub wysokości jego pików. Wysokość pików można wykorzystać do obliczeń pod warunkiem, że są one symetryczne.

W celu analizy ilościowej wyników **metodą wzorca zewnętrznego (kalibracji bezwzględnej)**, dozuje się ściśle określone ilości analitu (przy stałej objętości próbki dozowniczej są to próbki o ściśle określonym stężeniu). Zmierzone wartości pola pików substancji wykreśla się w funkcji stężenia zadozowanej substancji. Współczynnik korekcyjny k_E jest współczynnikiem kierunkowym nachylenia prostej, określonej równaniem (VIII).

$$A_i = k_E \times C_i \quad (\text{VIII})$$

gdzie A_i pole powierzchni pików analitu w próbce wzorcowej [jednostki względne], C_i stężenie analitu w próbce wzorcowej [jednostki stężenia], k_E współczynnik korekcyjny.

Tak obliczony współczynnik korekcyjny k_E wykorzystuje się przy obliczaniu stężenia analizowanej substancji w badanej próbce. W tym celu posługując się wzorem (IX).

$$C_p = \frac{A_p}{k_E} \quad (\text{IX})$$

gdzie C_p stężenie analitu w badanej próbce, A_p pole powierzchni pików analitu.

W celu analizy ilościowej **metodą wzorca wewnętrznego**, dodaje się przed pomiarem chromatograficznym do każdej z badanych próbek określone ilości substancji wzorcowej, innej niż substancja oznaczana.

Substancja wzorcowa powinna spełniać następujące warunki: (i) być czysta i chemicznie stabilna w danych warunkach pomiarowych, (ii) eluować w pobliżu substancji oznaczanej, (iii) jej pik powinien rozdzielać się aż do linii bazowej od pików sąsiednich, (iv) mieć podobny stosunek odpowiedzi detektora do stężenia jak substancja oznaczana.

Stężenie oznaczanej substancji oblicza się ze wzoru (X)

$$C_p = \frac{A_p \times C_w}{A_w \times k_F} \quad (\text{X})$$

gdzie: C_p stężenie analitu, A_p powierzchnia pików analitu, C_w stężenie substancji wzorcowej, A_w powierzchnia pików substancji wzorcowej, k_F współczynnik korekcyjny, wyznaczony ze wzoru (X) dla uprzednio przygotowanych próbek mieszanin wzorcowych (analit / substancja wzorcowa) o znanym składzie.

Metodę dodatku substancji oznaczanej stosuje się w chromatografii wtedy, gdy występują problemy z rozdzieleniem sygnału analitu od sygnałów wnoszonych przez inne składniki analizowanej mieszaniny. Wykonanie oznaczenia polega na chromatografowaniu próbki badanej i próbki z dodaną dokładnie znaną ilością danego związku, w takich samych warunkach pomiarowych.

Stężenie analitu oblicza się ze wzoru (XI)

$$C_p = A_p \times \frac{\Delta C}{\Delta A} \quad (\text{XI})$$

gdzie: ΔC oznacza dodaną ilość związku, ΔA przyrost pola powierzchni pików odpowiadający dodanej ilości związku.

LITERATURA

„*BETTER SOLUTIONS FOR FOOD AND BEVERAGE ANALYSIS*” Dionex Corporation, Sunnyvale 1997.

Andrzej Gierak, „*ANALIZA ANIONÓW NIEORGANICZNYCH W WODZIE. CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA.*” VIII Ogólnopolskie Seminarium Chromatograficzne Nauka - Przemysł. Metody chromatograficzne w analizie żywności i środowiska.” W-14, UMCS Lublin 1997.

Rajmund Michalski, „*20 LAT CHROMATOGRAFII JONOWEJ*” Chemik 11, 298, 1996.

„*NOMENKLATURA CHROMATOGRFICZNA*” Polskie Towarzystwo Chemiczne, Warszawa 1996.

Walenty Szczepaniak, „*METODY INSTRUMENTALNE W ANALIZIE CHEMICZNEJ*” PWN, Warszawa 1996.

Helwig Schäfer, Markus Läubli, Roland Dörig, „*ION CHROMATOGRAPHY*” Metrohm AG, Herisau 1996.

Krzysztof Kulisa, Rajmund Dybczyński, Halina Polkowska-Motrenko, „*BADANIE ZJAWISKA PRZELADOWANIA KOLUMNY I JEGO WPŁYWU NA JAKOŚĆ WYNIKÓW ANALITYCZNYCH W PROCESIE OZNACZANIA ANIONÓW ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII JONÓW*” Raporty IChTJ. Seria B nr 5/96.

Zygfryd Witkiewicz, „*PODSTAWY CHROMATOGRAFII*”, WNT, Warszawa 1995.

Rajmund Michalski, „*OZNACZANIE NIEORGANICZNYCH JONÓW W WODACH MINERALNYCH*” Gaz, Woda i Technika sanitarna, 9, 310, 1995.

Joachim Weiss, „*ION CHROMATOGRAPHY*” VCH, Weinheim 1995

„*PORADNIK CHEMIKA ANALITYKA*” WNT, Warszawa 1994.

Rajmund Michalski, „*OZNACZANIE WYBRANYCH NIEORGANICZNYCH JONÓW W POWIETRZU I WODZIE TECHNIKĄ CHROMATOGRAFII JONOWEJ*” Praca doktorska. Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, Zabrze 1993.

„*GLOSARIUSZ TERMINÓW STOSOWANYCH W FOTOCHEMII*” Polskie Towarzystwo Chemiczne, Wrocław 1992.

Paul R. Haddad, Peter E. Jackson, „*ION CHROMATOGRAPHY, PRINCIPLES AND APPLICATIONS*” (Journal of Chromatography Library, volume 46) Elsevier, Amsterdam, 1990.

„*SYMBOLE I TERMINOLOGIA WIELKOŚCI I JEDNOSTEK STOSOWANYCH W CHEMII FIZYCZNEJ*” Polskie Towarzystwo Chemiczne, Ossolineum Wrocław 1989.

Roy D. Rocklin, „*CONDUCTIVITY AND AMPEROMETRY. ELECTROCHEMICAL DETECTION IN LIQUID AND ION CHROMATOGRAPHY*” Dionex Corporation, Sunnyvale 1989.

Douglas T. Gjerde, James S. Fritz, „*ION CHROMATOGRAPHY*” Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1987.

John Barltrop, John Coyle, „*FOTOCHEMIA PODSTAWY*” PWN 1987.

„*GLOSARIUSZ TERMINÓW STOSOWANYCH W FIZYCZNEJ CHEMII ORGANICZNEJ*” Polskie Towarzystwo Chemiczne, Wrocław 1983.

„*ZBIÓR WIELKOŚCI I FIZYKOCHEMICZNYCH*” PWN, Warszawa 1974.
