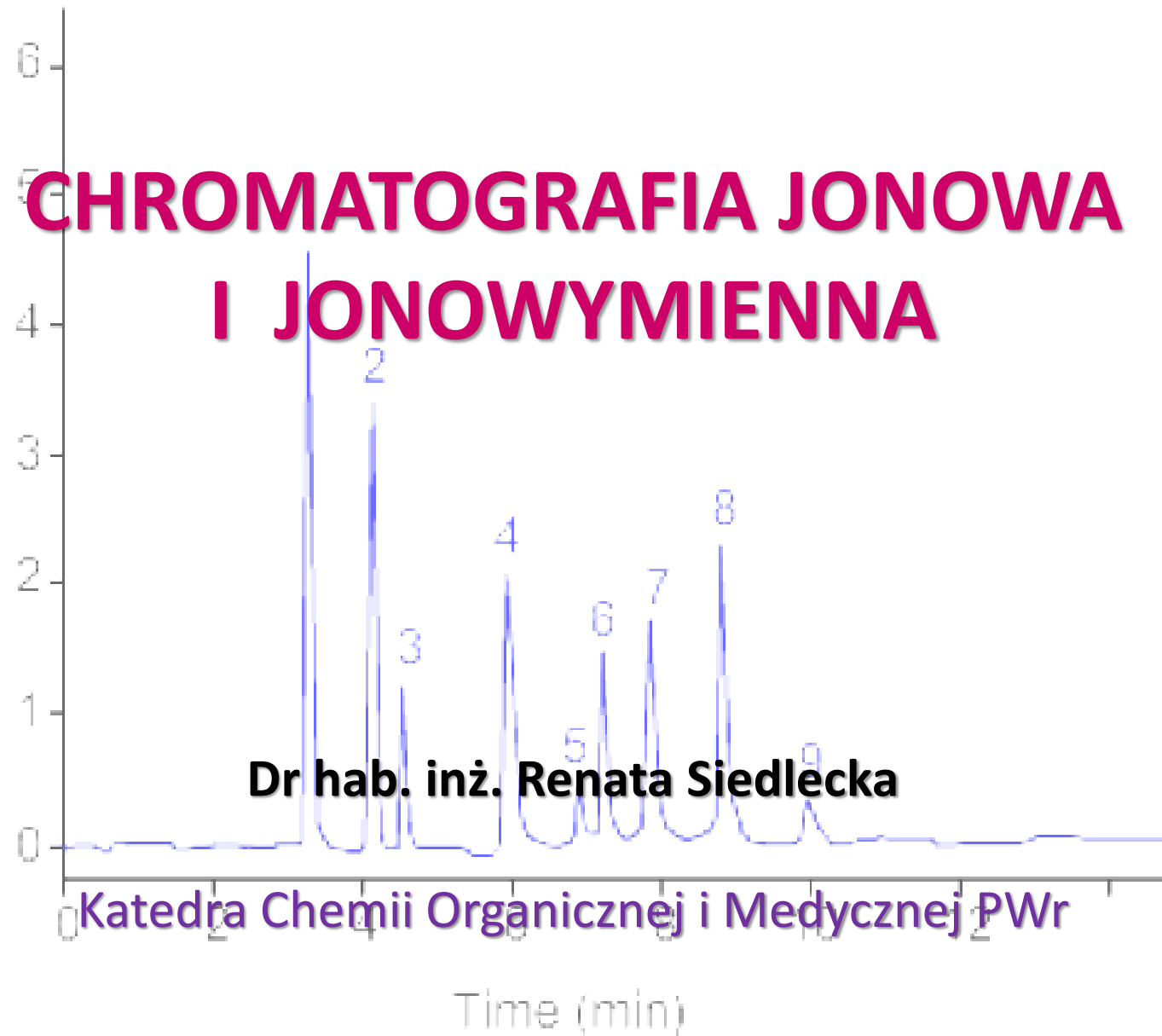


Intens  
 $\times 10^6$

# CHROMATOGRAFIA JONOWA I JONOWYMIENNA



**Dr hab. inż. Renata Siedlecka**

Katedra Chemii Organicznej i Medycznej PWr

Time (min)

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - LITERATURA

## KSIĄŻKI

1. R. Michalski, *Chromatografia jonowa*, WNT, Warszawa 2014
2. *Chromatografia cieczowa*, praca zbiorowa pod red. M. Kamińskiego i R. Kartanowicza, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2004,
3. D. Pogocki, *Wstęp do chromatografii jonowej*, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa 1998

## ARTYKUŁY

3. R. Michalski, *Zalety i ograniczenia chromatografii jonowej*, Laborant, 5/2013, <http://laborant.pl/ix.php/zalety-i-ograniczenia-chromatografii-jonowej>
4. R. Michalski, *Zastosowanie chromatografii jonowej w analizie wód i ścieków*, Laborant, 5/2013, <http://laborant.pl/index.php/zastosowanie-chromatografii-jonowej-w-analizie-wod-i-sciekow>
5. R. Michalski, *Zastosowania technik łączonych IC-ICP-MS i IC-MS w analizie specjacyjnej*, Laborant, 8/2014, <http://laborant.pl/index.php/zastosowania-technik-laczonych-ic-icp-ms-i-ic-ms-w-analizie-specjacyjnej>
6. <https://www.cytivalifesciences.com/en/pl/support/handbooks> Principles and methods **Ion exchange chromatography** – CYTIVA
7. <https://www.youtube.com/watch?v=fi0bJpxMiLI>, ThermoFisher scientific

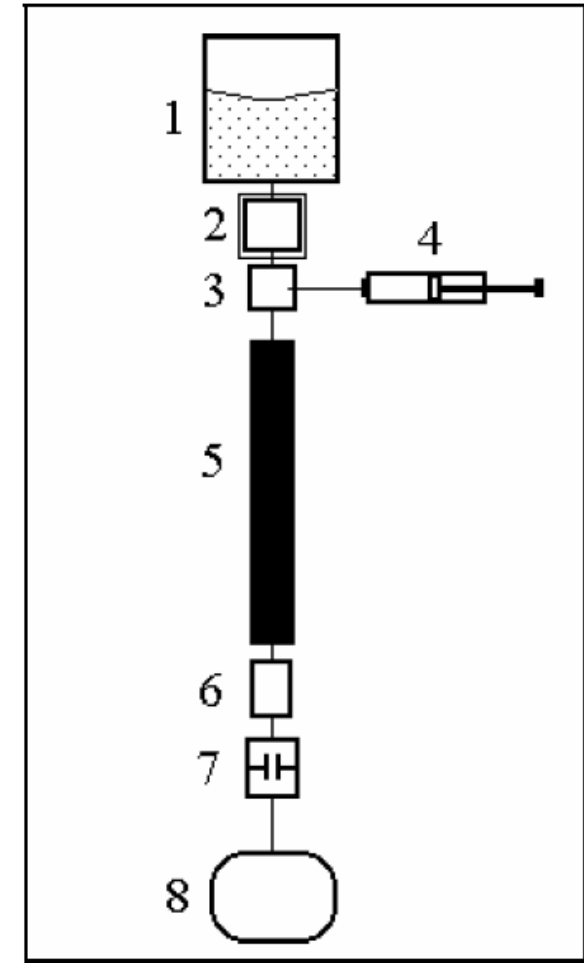
# Chromatografia

Najbardziej rozpowszechnione są metody, w których przemieszczenie mieszaniny następuje na drodze elucji, tj. gdy faza ruchoma przemieszcza się ciągle przez złożę chromatograficzne lub wzdłuż niego a próbka jest wprowadzana do układu w postaci określonej porcji.

W *chromatografii elucyjnej* fazą ruchomą jest **eluent**.

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 i przetwarzane na obraz (**chromatogram**).

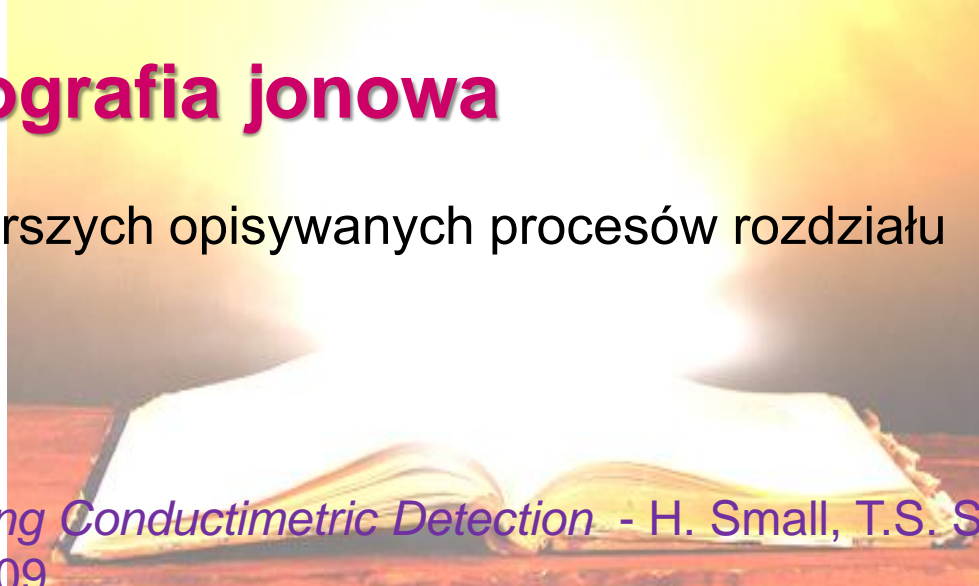


Rys. 1. Schemat ideowy chromatografu jonowego (cieczowego); 1- rezerwuuar eluentu, 2 - pompa, 3 - dozownik, 4 - strzykawka, 5 - kolumna separacyjna, 6 - układ tłumienia prądu wynikającego z przewodnictwa eluentu tzw. supresor (stosowany w przypadku IC z detekcją konduktometryczną), 7 - detektor, 8 -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

# Chromatografia jonowa

Wymiana jonowa jest jednym z najstarszych opisywanych procesów rozdziału

*Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductimetric Detection* - H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman - *Analytical Chemistry*, 1975, 47, 1801-1809



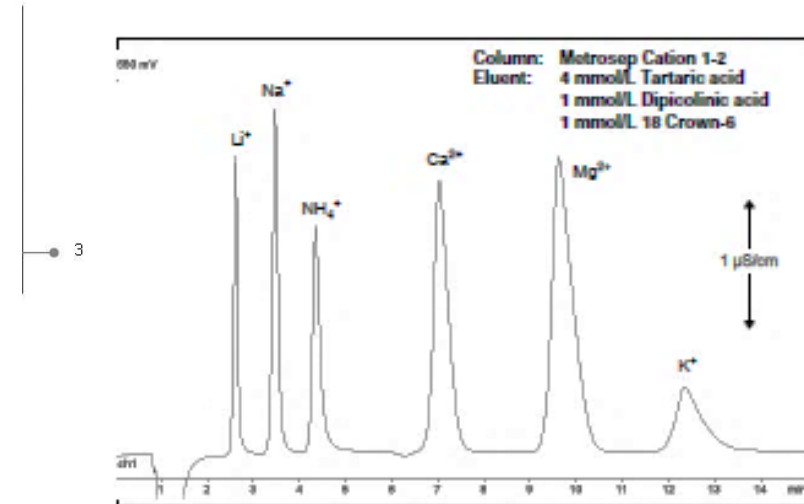
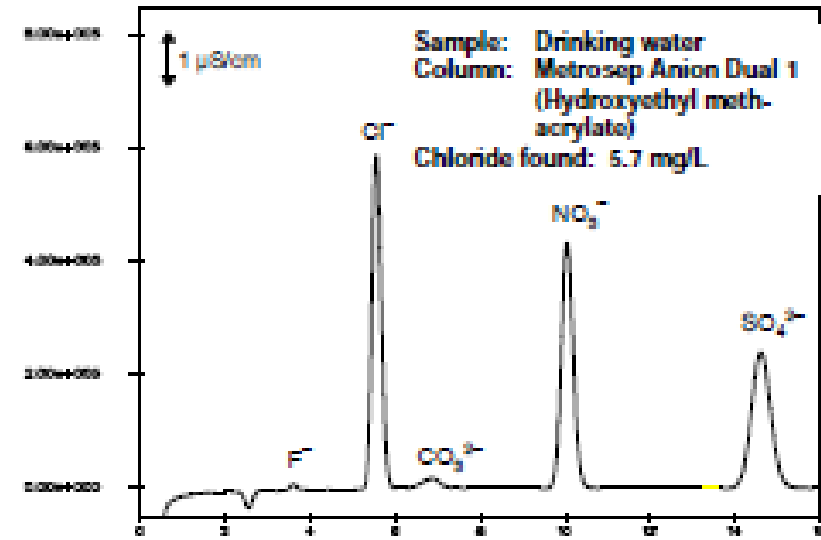
Dziś większość rutynowych analiz jonów nieorganicznych i organicznych wykonuje się tą techniką. Północnoamerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) już od końca lat siedemdziesiątych zaleca stosowanie chromatografii jonowej do badania stanu środowiska.

Technika chromatografii jonowej nieustannie się rozwija i stale podąża za rozwojem dziedzin takich jak:

- szeroko pojęta fizykochemia,
- mechanika precyzyjna,
- inżynieria materiałowa,
- elektronika i informatyka.



# Chromatografia jonowa - aparatura



# Chromatografia jonowa

*Współczesna chromatografia jonowymienna na małych cząsteczkach w wysokosprawnych kolumnach z użyciem detektorów konduktometrycznych, amperometrycznych lub spektrofotometrycznych jest nazywana **chromatografią jonową** (Ion Chromatography, **IC**).*

Rozdzielanie jest głównie wynikiem różnej zdolności składników próbki do ulegania wymianie jonowej.

## **ZALETY CHROMATOGRAFII JONOWEJ:**

- możliwość jednoczesnego oznaczania kilku jonów w próbce,
- krótki czas analizy (od kilku do kilkunastu minut),
- niskie progi wykrywalności (1 ng/ml), które mogą być dodatkowo obniżone o 2-3 rzędy przez zastosowanie kolumny zagęszczającej,
- niewielka ilość próbki potrzebna do analizy (0,1-1 ml),
- szeroki zakres oznaczanych substancji,
- łatwość przygotowania próbki do analizy,
- możliwość stosowania różnych detektorów,
- wysoka selektywność oznaczanych jonów w próbkach o złożonej matrycy

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

**CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA** (*Ion-exchange chromatography, IEC*) to inaczej retencja składników jonowych polegająca na zjawisku **WYMIANY JONOWEJ** (*Ion-exchange, IE*)

**FAZA STAZJONARNA** – jonowa, JONIT = wypełnienie kolumny (złóże)

**FAZA RUCHOMA** – jonowa, ELUENT = roztwór wodny lub wodno-organiczny

## WYMIANA JONOWA

to odwracalny i stechiometryczny proces, który polega na wiązaniu jonów obecnych w roztworze i/lub cząsteczek obdarzonych ładunkiem przez **JONIT**, który jednocześnie oddaje do roztworu jony o tym samym znaku.

Skład i budowa fazy stacjonarnej są kluczowe dla procesu rozdziału w chromatografii jonowej.

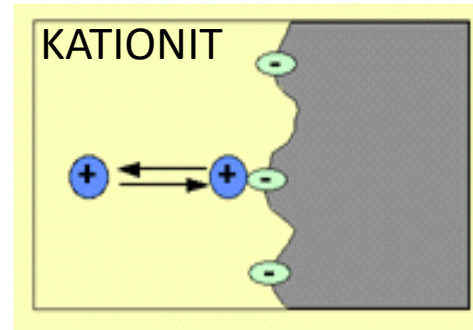
Jony oddawane do eluentu/roztworu (**przeciwjony**) =  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$

Po zakończeniu analizy jonit podlega regeneracji do postaci pierwotnej.

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## PRZECIWIJONY

to jony, np.  $H^+$  w **kationitach**,  $OH^-$  w **anionitach**, które są wymieniane z jonami z próbki dzięki czemu te ostatnie są czasowo zatrzymywane przez jonit (w kolumnie).



Różnice w *czasach zatrzymania* (*retencji*) wynikają ze zróżnicowanego powinowactwa rozdzielanych składników do fazy stacjonarnej (jonitu) i ruchomej (eluenta).

Konsekwencją tego zjawiska jest rozdzielenie jonów analitów, uzależnione przede wszystkim od rodzaju i właściwości jonitu w kolumnie.



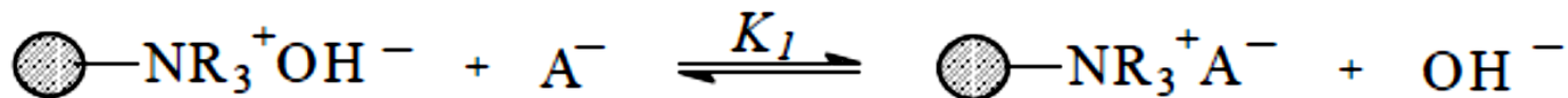
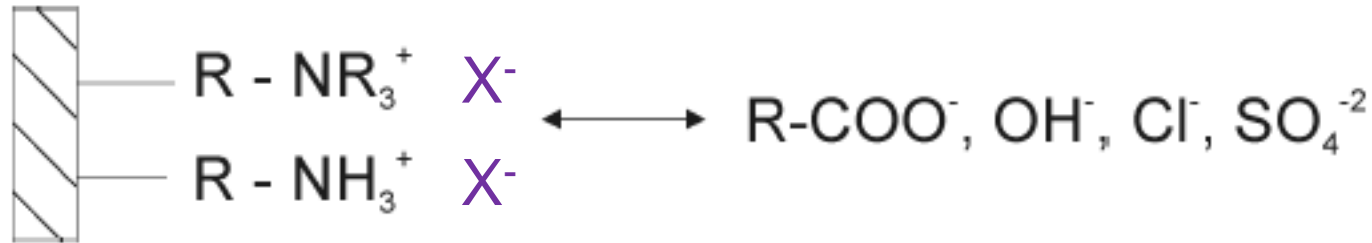
# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA

= faza stacjonarna w postaci **ANIONITU** – wyłapuje aniony

**ANIONIT** to **ZASADA** na trwale związana z powierzchnią ziarna stałej substancji;

- grupa funkcyjna z ładunkiem dodatnim na trwale związana, **ruchliwe przeciwjony** o ładunku ujemnym ( $X^-$ ), zdolne do wymiany przez inne ANIONY



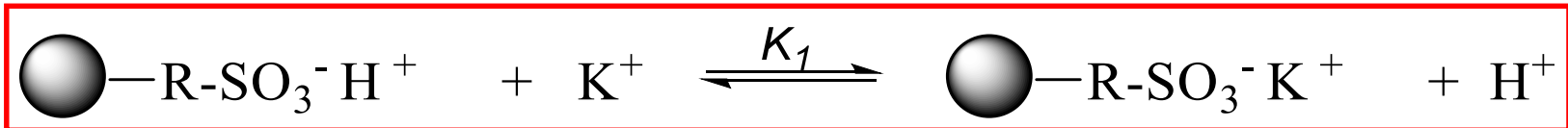
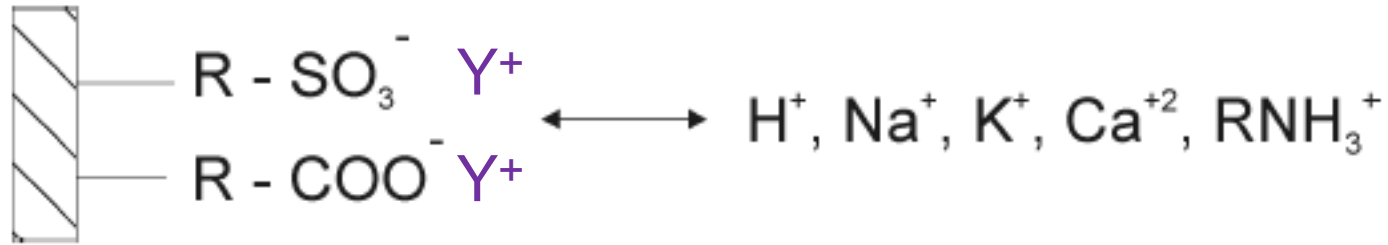
# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA

= faza stacjonarna w postaci **KATIONITU** – wyłapuje kationy

**KATIONIT** to **KWAS** na trwale związany z powierzchnią ziarna stałej substancji;

- grupa funkcyjna z ładunkiem ujemnym na trwale związana, **ruchliwe przeciwjony o ładunku dodatnim ( $Y^+$ )**, zdolne do wymiany przez inne KATIONY



# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## KOLUMNY ANIONOWYMIENNE

- do stosowania z eluentami węglanowo-wodorowęglanowymi
- do stosowania z eluentami wodorotlenowymi

## KOLUMNY KATIONOWYMIENNE

- z kationitami silnie kwasowymi
- z kationitami słabo kwasowymi

## ZAZWYCZAJ

- ♦ w chromatografii anionowymiennej stosuje się kolumny z jonitami zawierającymi **czwartorzędowe grupy amoniowe**,
- ♦ w chromatografii kationowymiennej – **grupy sulfonowe**

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

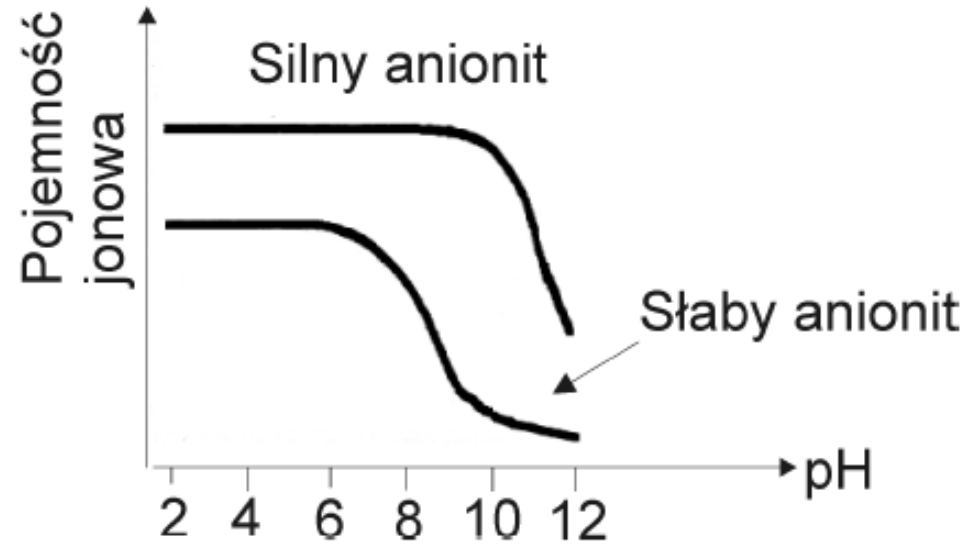
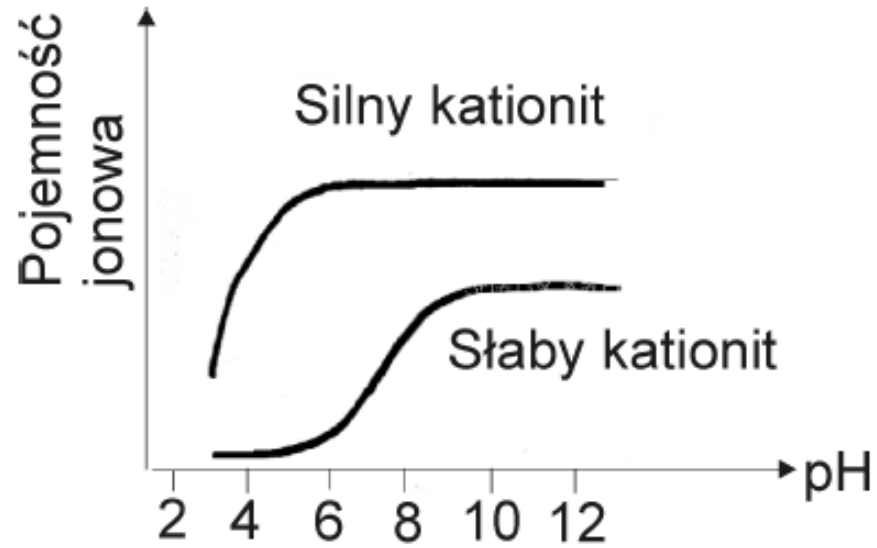
## POJEMNOŚĆ JONOWA

oznacza liczbę moli jonów, które jonit jest zdolny zatrzymać w jednostce swojej masy; jonity obciążone, po pełnym wykorzystaniu swojej pojemności jonowej wymagają zregenerowania.

*POJEMNOŚĆ JONOWA* wypełnień stosowanych w wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej (chromatografii jonowej) powinna być raczej niewielka, co zapewnia szerszy zakres liniowości sorpcji, a w konsekwencji bardziej symetryczne i wąskie piki (lepszy rozdział analizy)

*Mocne* kationity i anionity charakteryzują się najczęściej wyższą pojemnością jonową od odpowiednich *słabych* jonitów.

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia



Interesujący jest zakres, gdzie zależność pojemności jonowej od pH nie zmienia się gwałtownie lecz stopniowo.

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

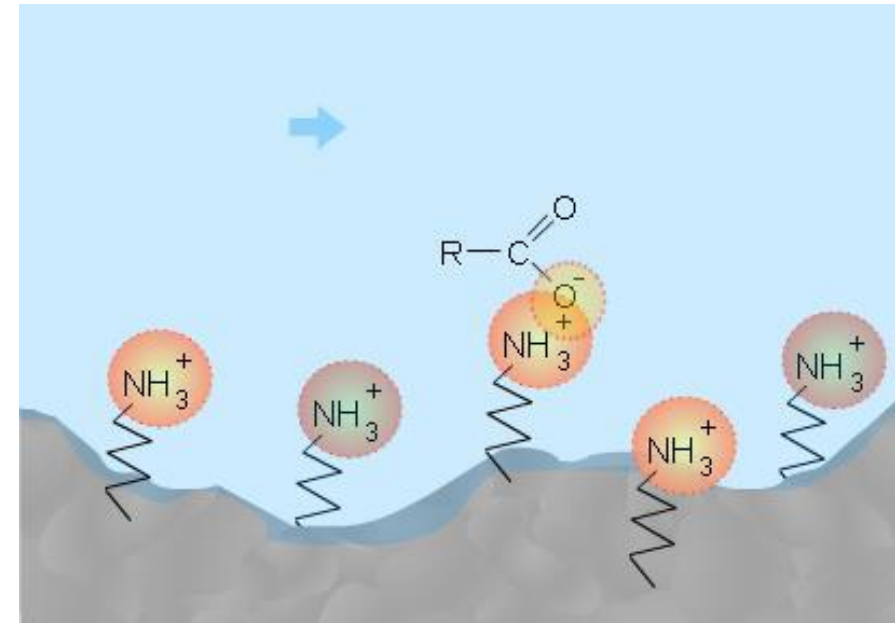
## POJEMNOŚĆ WYMIENNA

oznacza liczbę *centrów wymiany jonowej* na gram jonitu lub na kolumnę, wyrażana w miliwalach (mval) na gram jonitu lub na kolumnę

Bardziej uniwersalną jednostką jest mmol/g.

## PODZIAŁ JONITÓW

- o niskiej pojemności (<0,1 mmol/g)
- o średniej pojemności (0,1-0,2 mmol/g)
- o dużej pojemności (>0,2 mmol/g)



\*mval = miligramorównoważnik

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## JONITY SYNTETYCZNE

- \* **żywice jonowymienna**, wielkocząsteczkowe polimery nierozpuszczalne w wodzie i większości rozpuszczalników organicznych, zawierające grupy funkcyjne zdolne do wymiany jonów w roztworze/eluencie
- \* **żele krzemionkowe** chemicznie modyfikowane grupami alkilo- lub arylosulfonowymi, karboksylowymi (KATIONITY), aminowymi (ANIONITY)

**JONITY PÓLSYNTETYCZNE** - to np. węgle sulfonowane

**JONITY NATURALNE** - to KATIONITY glinokrzemianowe, głównie zeolity

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## ŻYWICE KATIONOWYMIENNE

to JONITY SYNTETYCZNE z grupami funkcyjnymi o charakterze **kwasowym**, odszczepiającymi jony  $H^+$  (wymienialne na inne kationy)

- sulfonowe,  $-SO_3H$  – mocny kationit
- fosfonowe,  $-PO_3H_2$  – mocny kationit
- karboksylowe,  $-COOH$  – średni kationit
- aminodioctanowe,  $-N(CH_2COOH)_2$  – słaby kationit
- fosfinowe,  $-PO_2H$  – słaby kationit
- fenolowe,  $-C_6H_4OH$  – b. słaby kationit



# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## ŻYWICE ANIONOWYMIENNE

to JONITY SYNTETYCZNE z grupami funkcyjnymi o charakterze **zasadowym**,  
odszczepiającymi jony  $\text{OH}^-$  (wymienialne na inne aniony)

- aminy czwartorzędowe (grupy amoniowe),  $-\text{NR}_3^+$  – mocny anionit
- aminy i sprotonowane aminy II i III ,  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{NH}$ ,  $-\text{NR}_2\text{H}^+$ ,  $-\text{NRH}_2^+$  –  
średni i mocny anionit
- grupy dialkylsulfoniowe,  $-\text{SR}_2^+$  - słaby anionit

## ŻYWICE AMFOTERYCZNE

to JONITY SYNTETYCZNE z grupami funkcyjnymi i charakterze zasadowym i kwasowym



# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## RETENCJA

rozumiana jest jako zatrzymanie jonów na jonicie w wyniku wymiany jonowej (czas przebywania wewnątrz kolumny)

Na retencję wpływ ma:

- a) Typ jonitu
- b) pH eluentu
- c) Siła jonowa eluentu
- d) Rodzaj przeciwjonu dominujący na powierzchni jonowymiennej (rodzaj przeciwjonu w eluencie)

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## ZASADY DOTYCZĄCE RETENCJI

### 1. Typ jonitu

O **czasie retencji** rozdzielanych jonów decyduje liczba i rodzaj jonowymiennych grup funkcyjnych związanych na powierzchni sorpcyjnej jonitu, a także siła jonowa i rodzaj eluentu, pH eluentu oraz rodzaj jonów analitu.

Grupy silnie kwasowe i silnie zasadowe są na powierzchni sorpcyjnej jonitu zdysocjowane w szerokim zakresie pH, a zwiększenie ilości miejsc aktywnych w jednostce objętości wypełnienia kolumny powoduje dłuższe zatrzymanie jonów w kolumnie.

Reakcje wymiany jonowej zachodzą stechiometrycznie tj. w ten sposób, że na mol każdego jonu, który wiąże się z żywicą, przypada określona ilość moli innego jonu przechodzącego do roztworu.

Są to reakcje odwracalne.

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

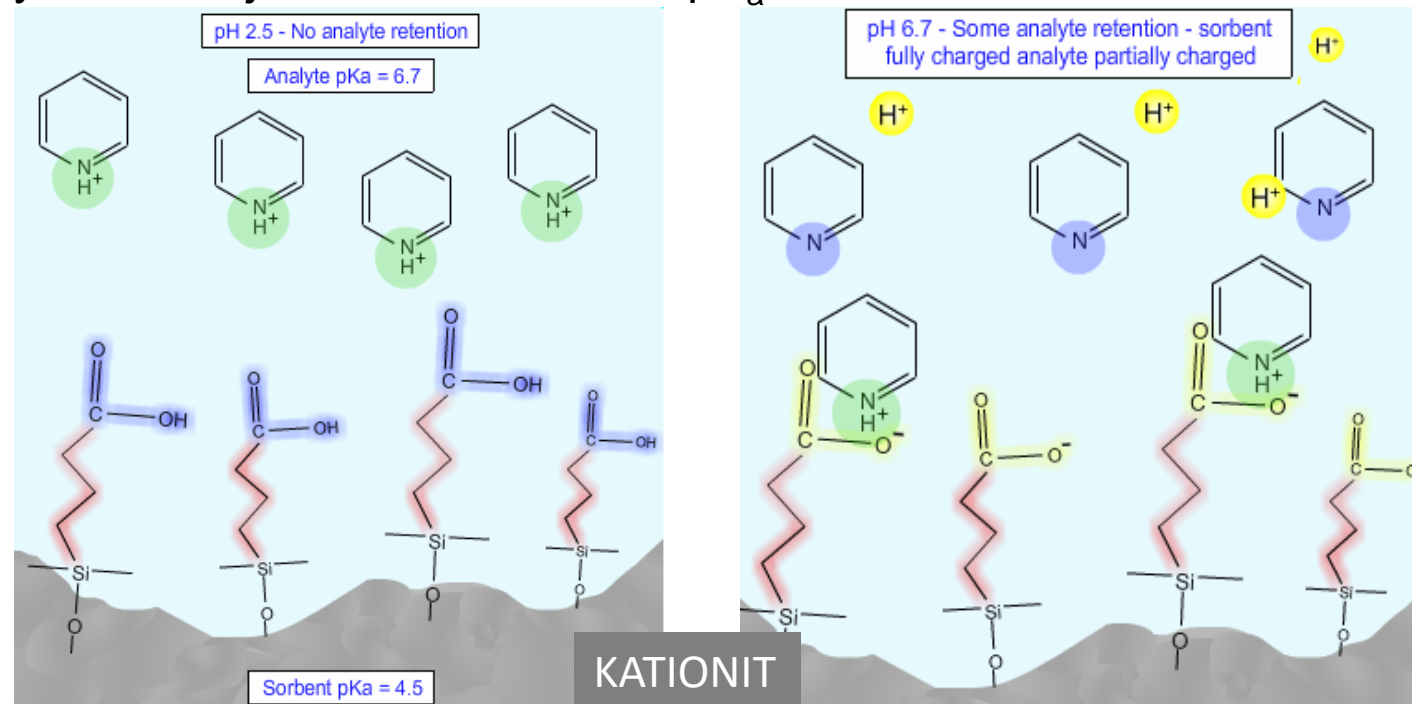
## 2. Retencję można kontrolować poprzez poprawną modyfikację pH

W przypadku wymiany **kationów**: wzrost pH obniża retencję; wyjątek: słabe wymiennicze kationów lepiej dysocjujące przy wzroście pH

- najlepiej żeby pH było ok. 1-2 jednostki wyższe niż  $pK_a$  kationów

W przypadku wymiany **anionów**: wzrost pH podwyższa retencję; wyjątek: słabe wymiennicze anionów lepiej dysocjujące przy niższym pH

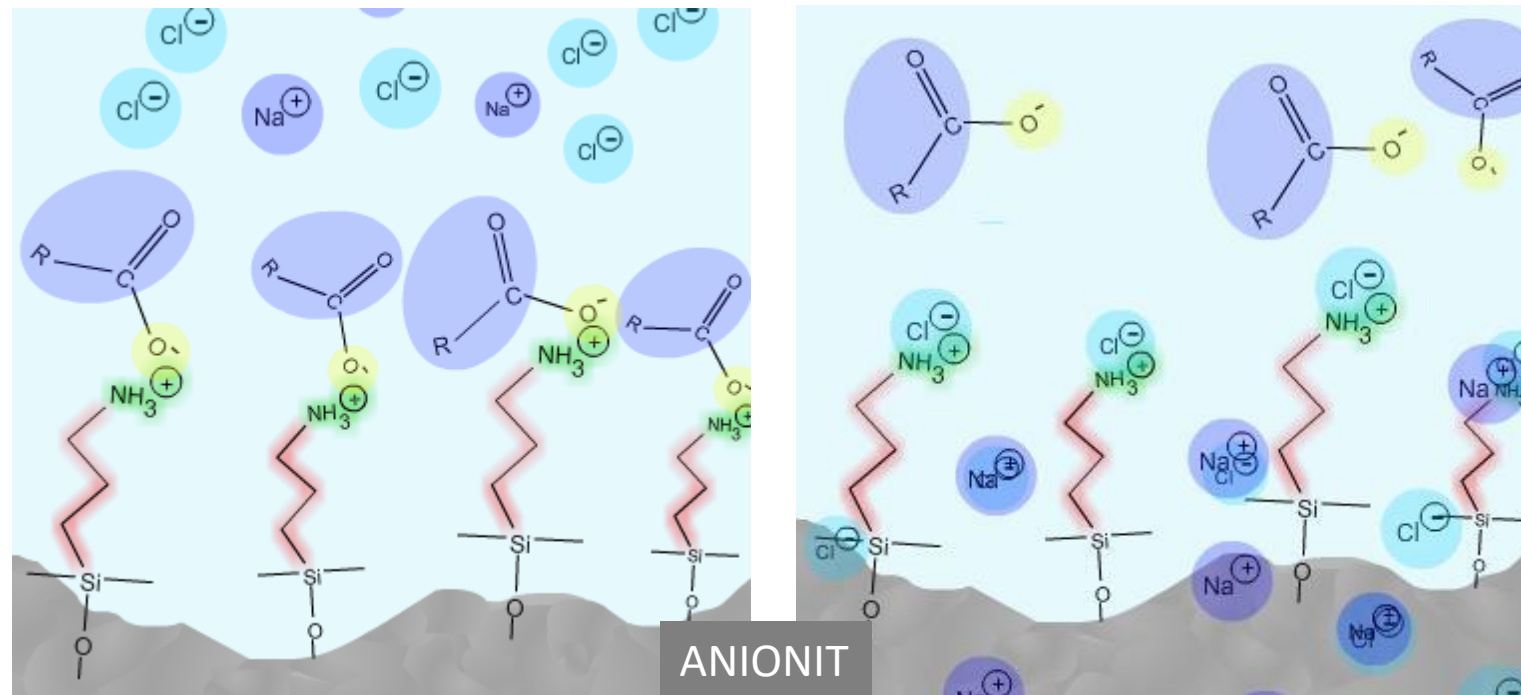
- najlepiej żeby pH było ok. 1-2 jednostki niższe niż  $pK_a$  anionów



# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## 3. Wzrost siły jonowej eluentu obniża objętość retencji ( $V_R$ )

Eluentowe układy o wysokiej sile jonowej ułatwiają desorpcję analitu i są stosowane do eluowania indywidualów z kolumny.



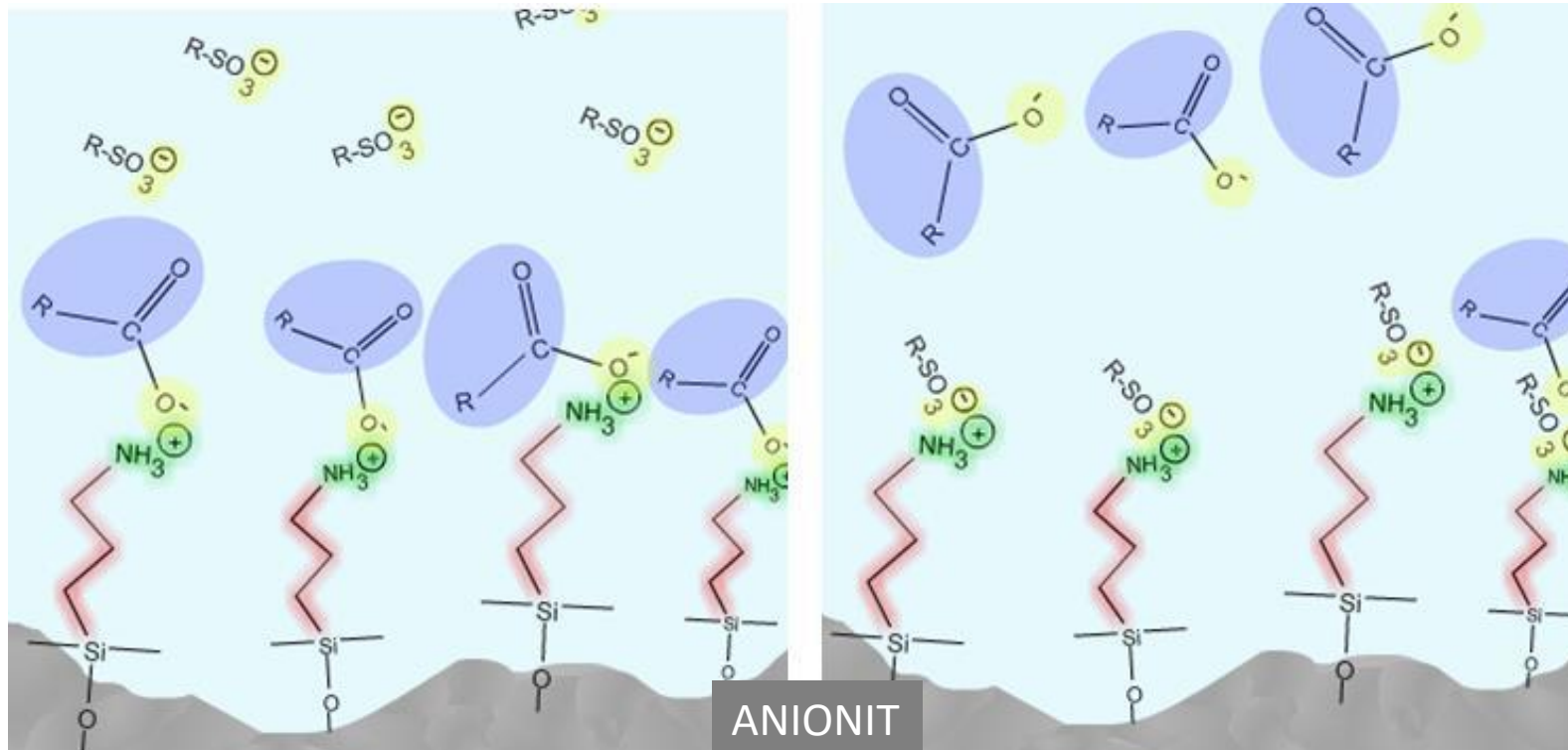
Wymywanie analityczne ułatwione przez bufor o wysokiej sile jonowej

# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

## 4. Rodzaj i siła przeciwjonu

Obniżenie retencji następuje:

- im wyższy ładunek przeciwjonu,
- im mniejsza średnica jonowa przeciwjonu,
- im łatwiej polaryzowalny przeciwjon



# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

Najpowszechniejsze formy rozdzielania, w których cząstki są eluowane przez zwiększanie siły jonowej buforu (zwykle za pomocą NaCl) przy użyciu liniowego gradientu (F. 1.9) lub stopniowej elucji (F. 1.10).

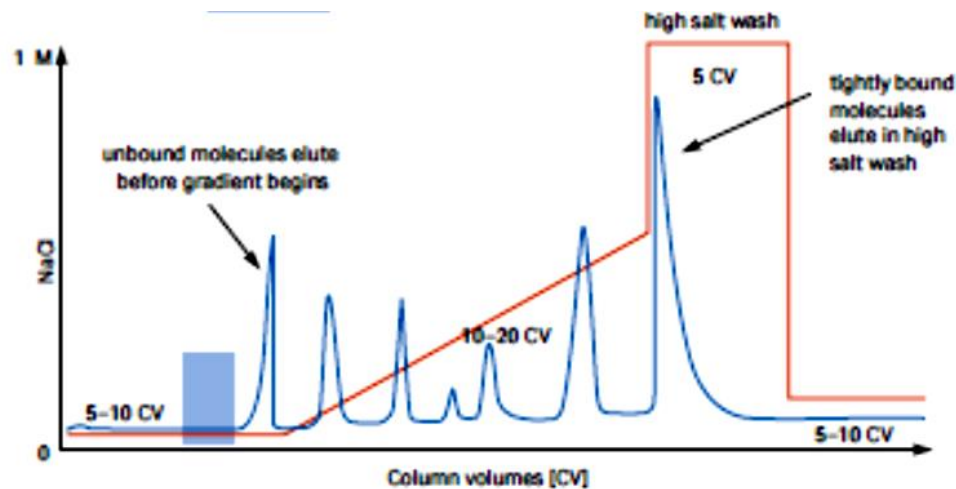


Fig 1.9. Typical high-resolution IEX separation using linear gradient elution.

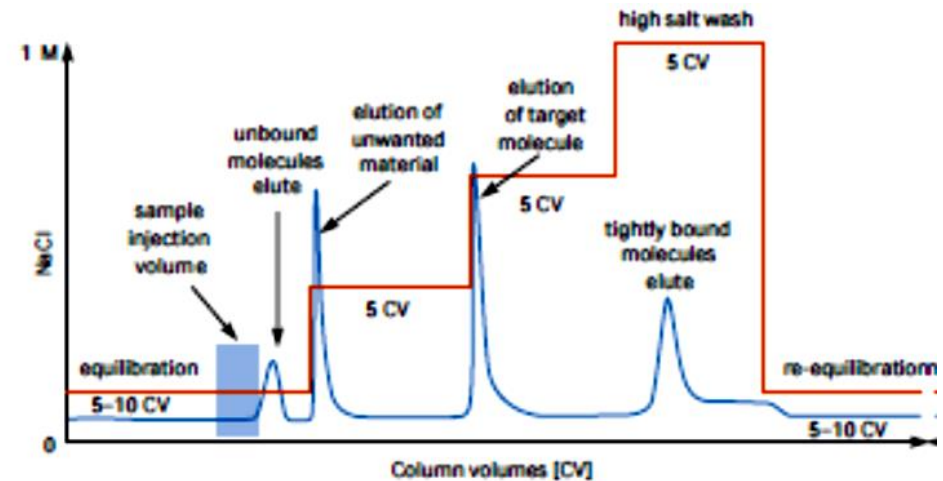


Fig 1.10. Typical IEX separation using step elution.

➔ **Elucja gradientowa** jest często stosowana, gdy rozpoczyna się od nieznanej próbki (jak najwięcej składników jest związanych z kolumną i eluowanych w różny sposób, aby zobaczyć całkowity profil białka) oraz do rozdziału lub analizy o wysokiej rozdzielczości.

➔ **Elucję stopniową** stosuje się np. gdy separacja została zoptymalizowana przy użyciu elucji gradientowej, przejście na elucję stopniową przyspiesza czas rozdzielania i zmniejsza zużycie buforu przy zachowaniu wymaganego poziomu czystości.

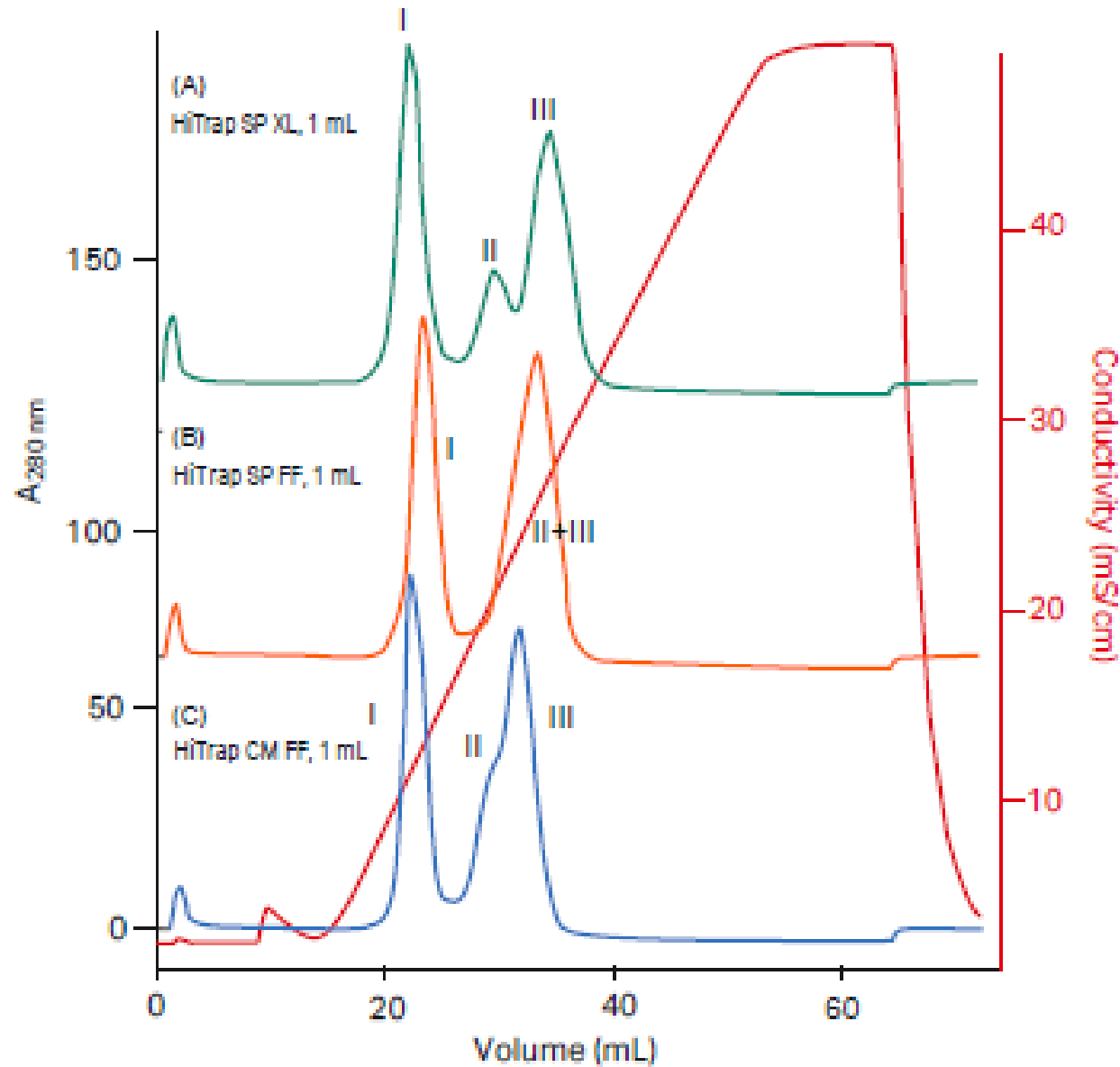
# Chromatografia jonowymienna i jonowa - pojęcia

Optymalizacja metody separacji dotyczy modyfikacji kilku parametrów:

- *Parametry jonitu* – moc, wielkość ziaren, porowatość
- *Siła jonowa* - siła elucyjna wzrasta z siłą jonową; przeciwjon eluentu kontroluje wielkość oddziaływania z fazą stacjonarną
- *pH* - kontrola selektywności; wzrost pH powoduje spadek retencji w chromatografii kationowymiennej i wzrost w anionowymiennej
- *Bufor* - siła elucyjna i selektywność zależna od przeciwjonu soli buforu; sól buforu również wpływa na pH
- *Natężenie przepływu* - sprawność: niskie aby zwiększyć rozdzielczość i poprawić kinetykę wymiany masy
- *Wzrost temperatury* - poprawia kinetykę wymiany masy i obniża lepkość fazy ruchomej



- Parametry jonitu (typ kolumny)



**Columns:**  
 (A) HiTrap SP XL, 1 mL  
 (B) HiTrap SP FF, 1 mL  
 (C) HiTrap CM FF, 1 mL

**Sample:**  
 3 mg ribonuclease A (pI = 9.3),  
 0.8 mg cytochrome C (pI = 10.3),  
 0.8 mg lysozyme (pI > 11)

**Sample volume:**  
 2 mL in start buffer

**Start buffer:**  
 20 mM sodium phosphate, pH 6.8

**Elution buffer:**  
 20 mM sodium phosphate,  
 500 mM NaCl pH 6.8

**Flow rate (flow velocity):**  
 1 mL/min (150 cm/h)

**Gradient:**  
 0% elution buffer (25 CV), 0% to  
 100% elution buffer (40 CV)

Fig 3.32. Media scouting: separation of ribonuclease A (I), cytochrome C (II), and lysozyme (III) on a range of anion exchange HiTrap columns.

## - Siła jonowa

Column: Mono Q HR 5/5  
Samples: carbonic anhydrase, transferrin, ovalbumin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin A and B

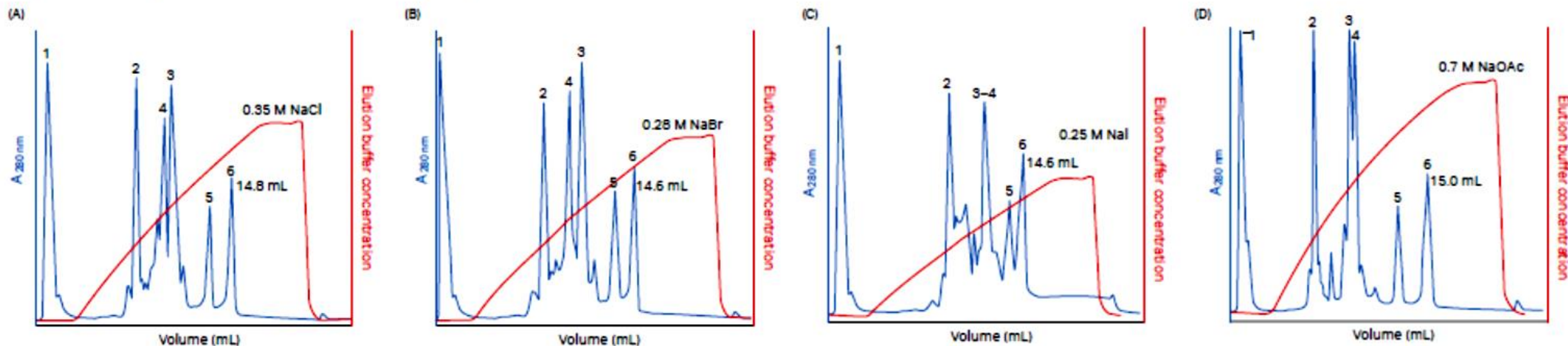


Fig 2.4. Effect of salt ions (counterions) (A) sodium chloride, (B) sodium bromide, (C) sodium iodide, and (D) sodium acetate on selectivity and resolution (Mono Q HR 5/5 now available as Mono Q 5/50 GL). Note the variation in elution order of peaks 3 and 4.

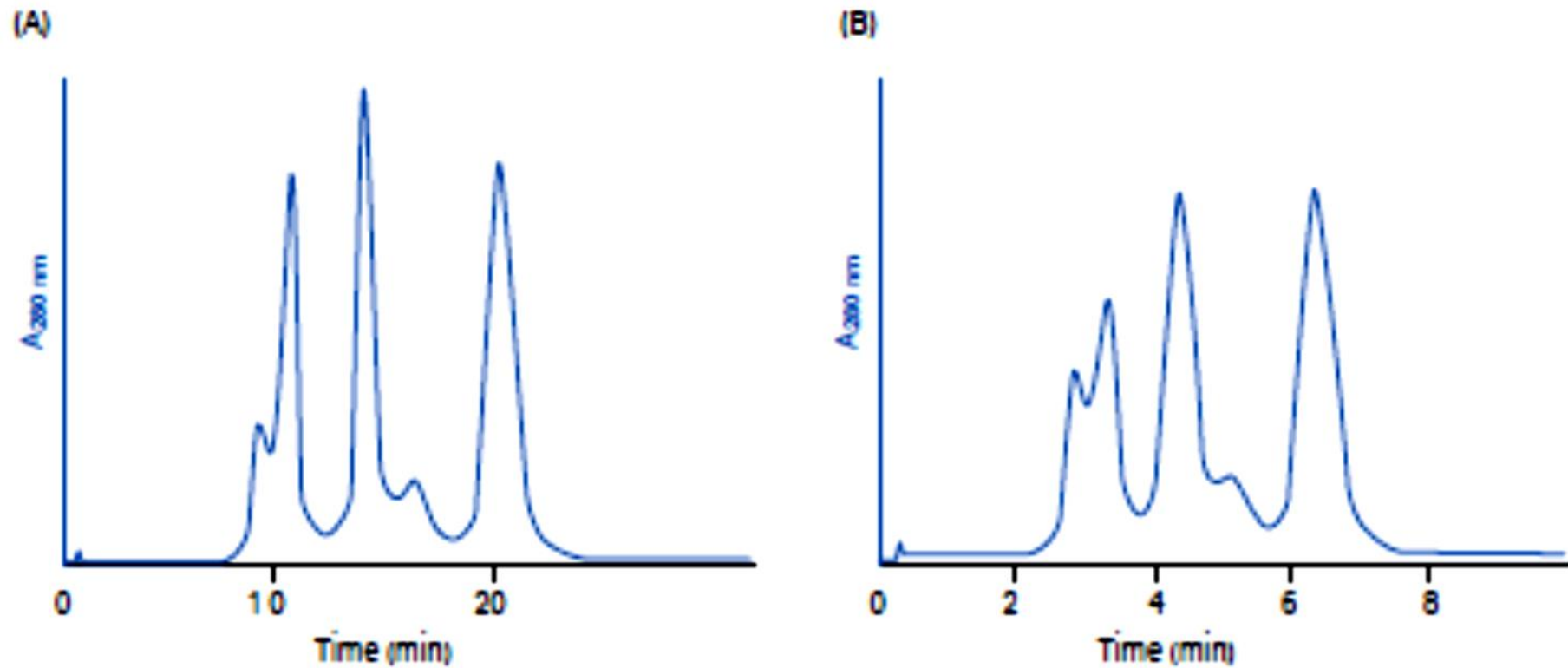
Jony soli używane w IC to prawie zawsze  $\text{Na}^+$  do wymiany kationowej i  $\text{Cl}^-$  do wymiany anionowej.

Sole, takie jak  $\text{NaCl}$ , mają chaotropowy charakter (tj. zdolność do zmniejszania polarności wody), a zatem słabszy efekt „wysalania” cząsteczek hydrofobowych. Zapewnia to maksymalną rozpuszczalność podczas elucji i poprawia regenerację. Należy unikać soli takich jak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lub  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , ponieważ przy wysokich stężeniach najprawdopodobniej powodują one wytrącanie.

W niektórych zastosowaniach alternatywne przeciwjony, np.:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  lub  $\text{HCOO}^-$  mogą poprawić, a nawet zmienić selektywność, ponieważ wykazują różne siły elucji, ale należy zauważyć, że użycie tych jonów może wpłynąć na zdolność wiązania nośnika.

## - Natężenie przepływu

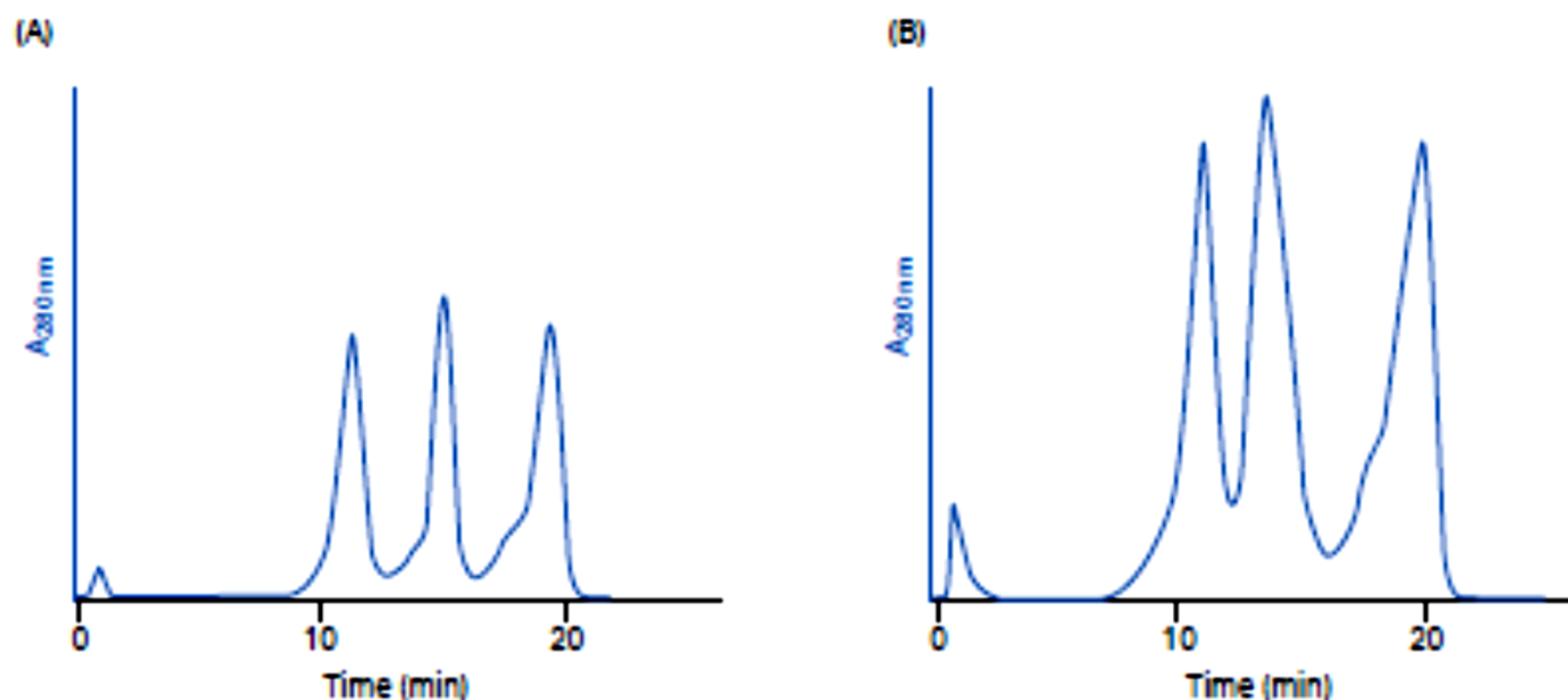
**Column:** SOURCE 30Q, 10 mm i.d. × 50 mm (4 mL)  
**Sample:** Mixture of lactoglobulin B and amyloglucosidase  
**Sample load:** 1 mg/mL of bed volume  
**Start buffer:** 20 mM BIS-Tris PROPANE, pH 7.0  
**Elution buffer:** 500 mM sodium chloride, 20 mM BIS-TRIS PROPANE, pH 7.0  
**Flow rates (flow velocities):** (A) 4 mL/min (300 cm/h)  
(B) 13 mL/min (1000 cm/h)  
**Gradient:** 0% to 100% elution buffer, 20 CV



**Fig 2.5.** Influence of increasing flow rate on resolution.

- Ilość próbki

**Column:** SOURCE 30S, 5 mm i.d. × 50 mm (1 mL)  
**Sample:** Mixture of chymotrypsinogen, cytochrome C, and lysozyme  
**Sample load:** (A) 1 mg  
(B) 10 mg  
**Start buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 6.8  
**Elution buffer:** 500 mM sodium chloride, 20 mM sodium phosphate, pH 6.8  
**Flow rate (flow velocity):** 1 mL/min (300 cm/h)  
**Gradient:** 0% to 100% elution buffer, 20 CV



**Fig 2.6.** The influence of increasing sample load on resolution.

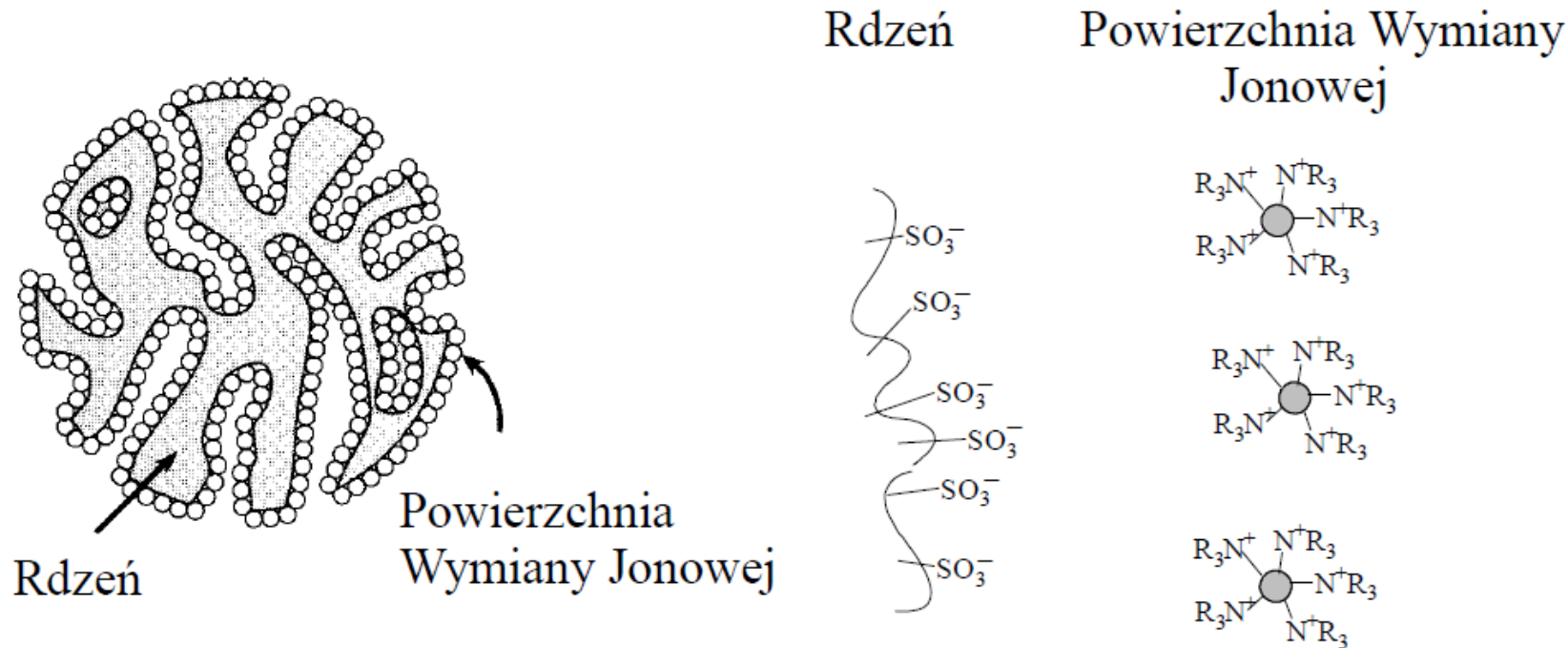
# Chromatografia jonowymienna i jonowa - podział

Ze względu na rodzaj materiału wypełnienia kolumny i jego zdolność wymienną, a przede wszystkim na mechanizm wymiany wyróżniamy:

1. **WYSOKOSPRAWNĄ CHROMATOGRAFIĘ JONOWĄ** (*High performance ion chromatography, HPIC*)
2. **WYSOKOSPRAWNĄ CHROMATOGRAFIĘ JONOWYMIENNĄ** (*High performance ion-exchange chromatography, HPICE*) – zwaną też jonowykluczającą
3. **CHROMATOGRAFIĘ PAR JONOWYCH** (*Ion pair chromatography, IPC*)

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

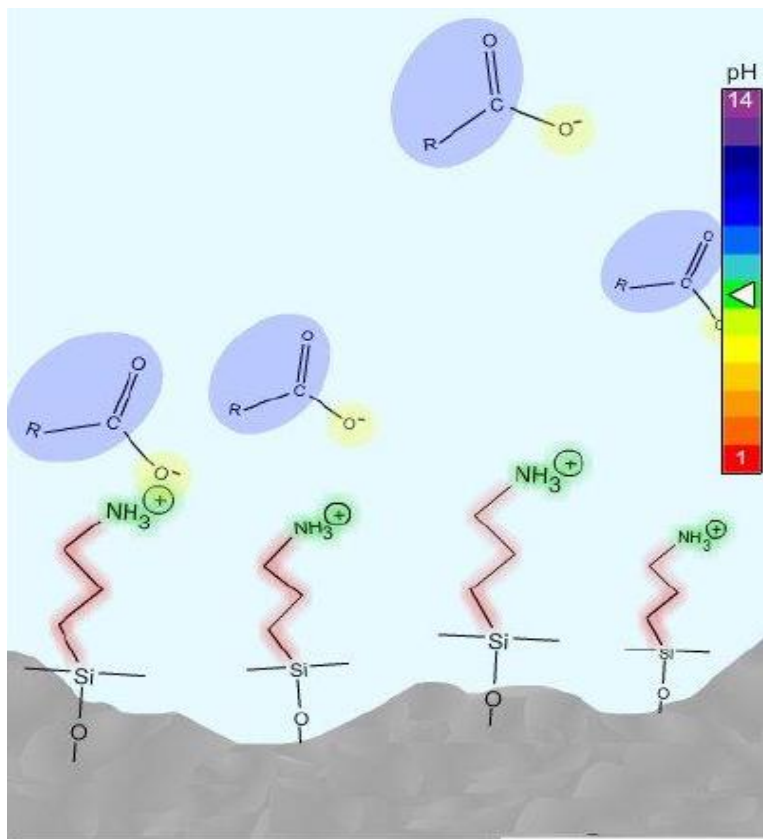
- stosuje wysokosprawne kolumny analityczne, których wypełnienia stanowią żywice z naniesionymi na nie grupami funkcyjnymi o stałym ładunku, w których bezpośrednim otoczeniu znajdują się odpowiednie przeciwjony zapewniające elektryczną obojętność układu.



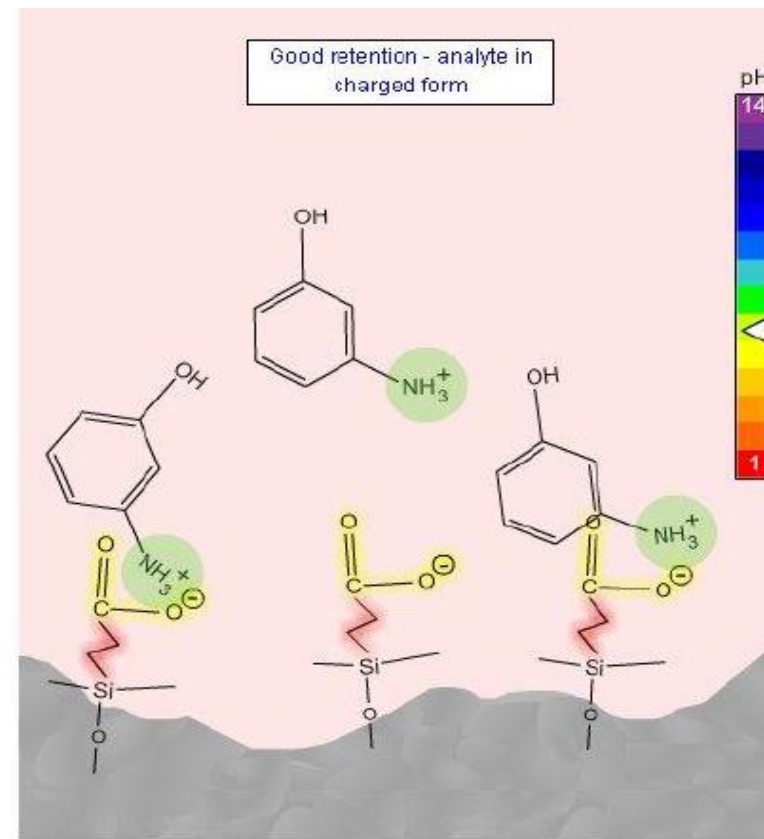
Rys. 2. Przykład wypełnienia kolumny do HPIC anionów (AS 10, Dionex Co.).

- detekcja najczęściej konduktometryczna po uprzedniej SUPRESJI jonów eluentu (tłumienie przewodnictwa eluentu)

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa



Anion exchange



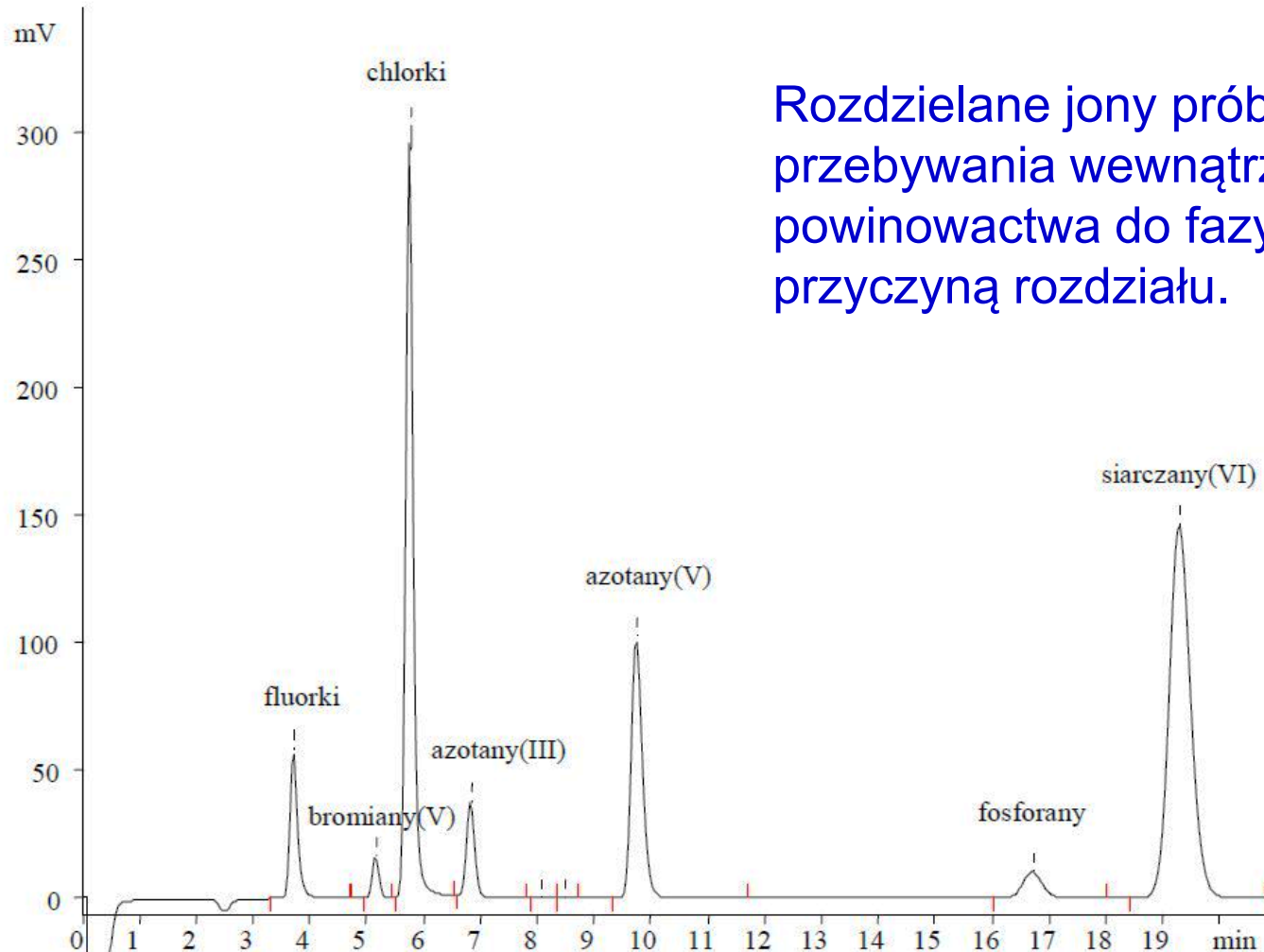
Cation exchange

Zakres zastosowania HPIC obejmuje m. in. 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.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

Chromatogram rozdzielania nieorganicznych anionów:

Kolumna analityczna - Metrosup A SUPP 5-150, eluent - 3,2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 1,0 mM  $\text{NaHCO}_3$ ,  
natężenie przepływu - 0,7 ml/min, detekcja - konduktometryczna.

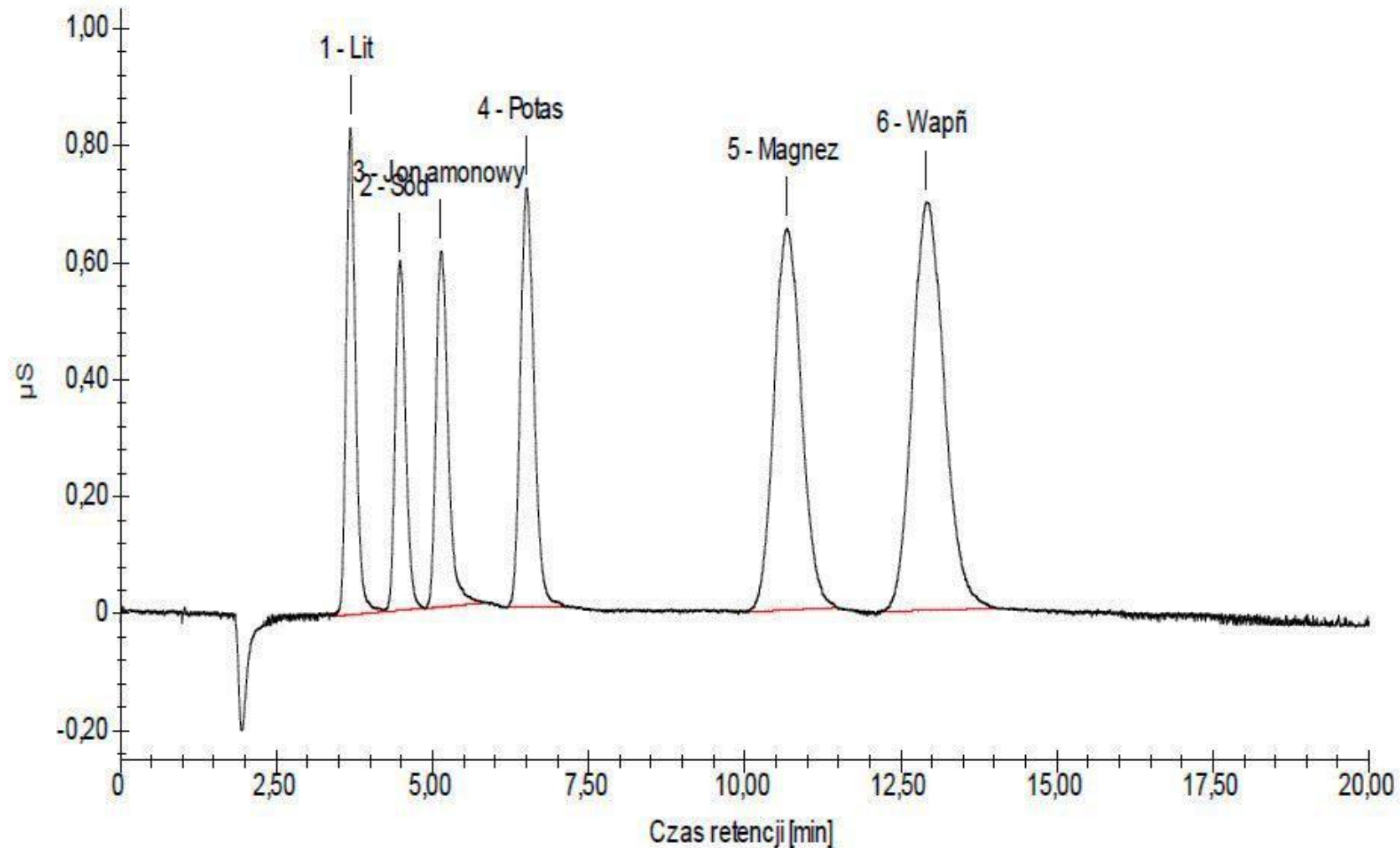


Rozdzielane jony próbki różnią się między sobą czasem przebywania wewnątrz kolumny, wynikającym z ich różnego powinowactwa do fazy stacjonarnej, co jest bezpośrednią przyczyną rozdziału.



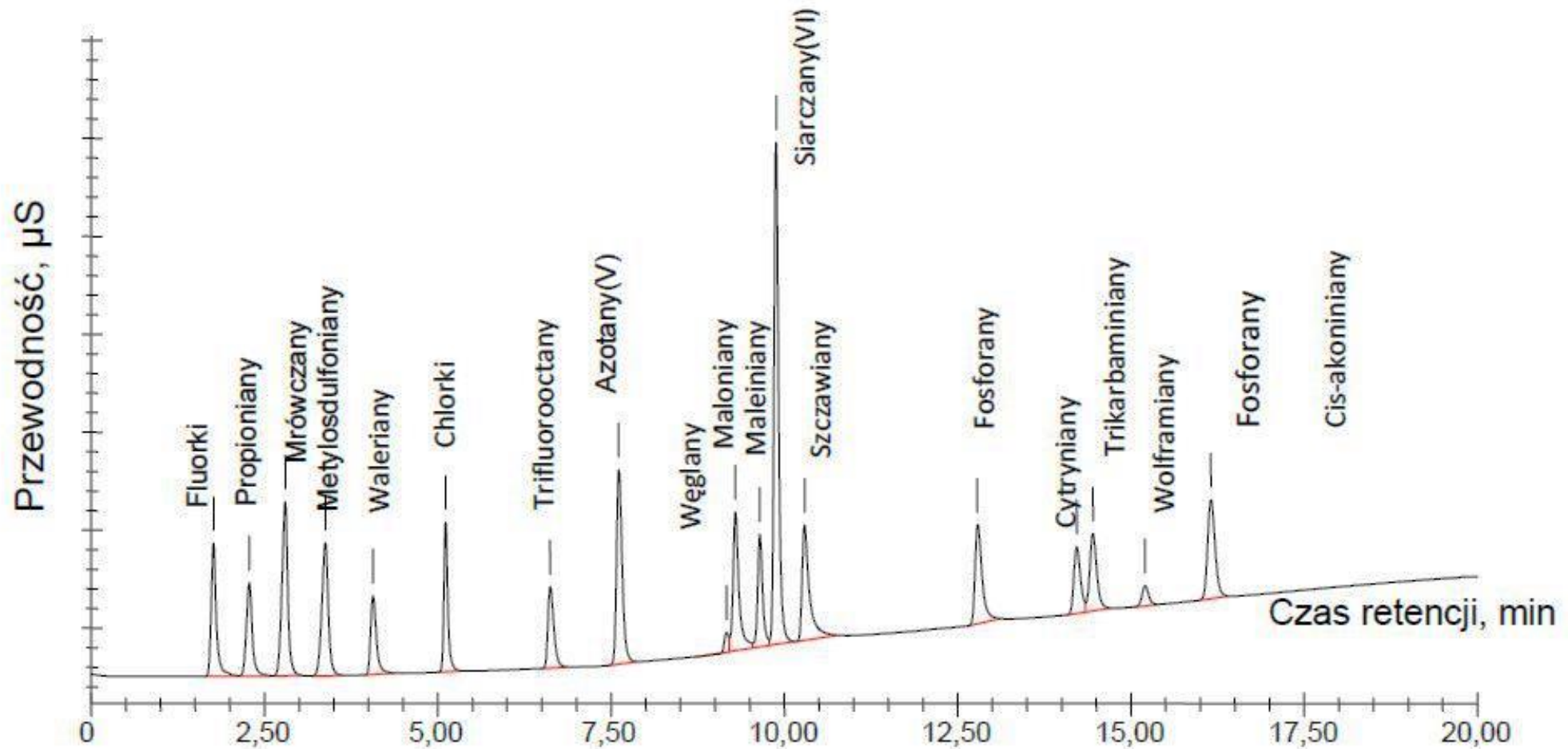
# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

Chromatogram próbki wzorcowej nieorganicznych kationów 1 i 2 grupy i jonu amonowego.



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ZALETY

- \* **Możliwość jednoczesnego oznaczania nawet kilkudziesięciu jonów w próbce**, kationów i anionów, jonów organicznych i nieorganicznych, także substancji niejonowych, tworzących formy jonowe w wyniku odpowiednich reakcji derywatywacji przed- lub za kolumnowych



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ZALETY

- \* **Stosunkowo krótki czas analizy** - W zależności od rodzaju kolumny analitycznej, rodzaju i stężenia eluentu, jego natężenia przepływu, oraz parametrów pracy supresora i detektora całkowity czas rozdzielania głównych nieorganicznych anionów lub kationów w próbce wynosi **od kilku do kilkunastu minut (np. 5-30 min)**.
- \* **Granice wykrywalności na poziomie mg/dm<sup>3</sup> (ppb)** dla detekcji konduktometrycznej, lub nawet jeszcze niższym przy wykorzystaniu wstępnego wzbogacania analitów lub specjalnych metod detekcji, np. ICP-OES, ICP-MS
- \* **Możliwość stosowania różnych detektorów chromatograficznych** - Pomiary przewodności elektrycznej właściwej są najczęściej stosowaną metodą detekcji w chromatografii jonowej, ponieważ jest ona wyjątkowo czuła dla wszystkich zdysocjowanych składników, a w zakresie niskich stężeń przewodnictwo to jest liniową funkcją stężenia jonów.

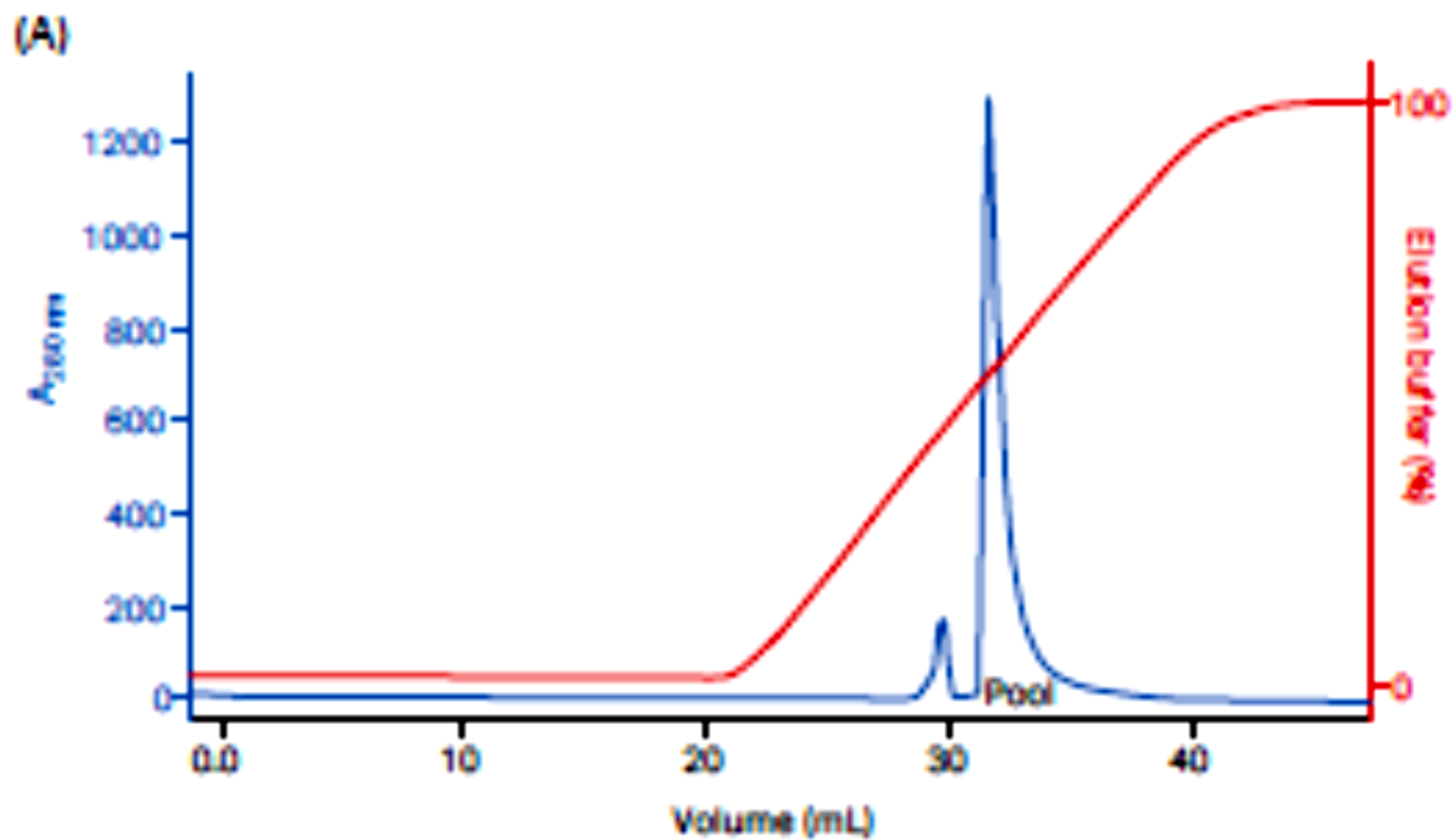
*Inne detektory:* UV/Vis, amperometryczne, potencjometryczne, fluorescencyjne, chemiluminescencyjne, ICP-MS, ICP-OES

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ZALETY

- \* **Niewielka ilość próbki potrzebna do wykonania analizy** - Objętość pętli nastrzykowych stosowanych w chromatografii jonowej wynosi zazwyczaj **od 10 do 500  $\mu\text{l}$** , a objętość próbki potrzebna do analizy wynosi **od około 0,5 do 2  $\text{cm}^3$**  (m.in. w zależności od zastosowanego automatycznego podajnika próbek).
- \* **Wysoka selektywność rozdzielania** - Maksymalne dopuszczalne stężenia poszczególnych jonów w analizowanej próbce nie powinny przekraczać kilkuset  $\text{mg}/\text{dm}^3$ , a suma ich stężeń uzależniona jest od pojemności jonowymiennej zastosowanej kolumny analitycznej.

Nowoczesne kolumny jonowymienne stosowane np. do oznaczania śladów bromianów(V) czy jonów amonowych w wodzie pozwalają oznaczać je nawet w próbkach, w których stosunek stężeń jonów  $\text{Cl}^-/\text{BrO}_3^-$  lub  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  wynosi 10000:1.

Przykład selektywności



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - zalety

\* Stosunkowo prosty sposób przygotowania próbek

Jony analitu	Zalecana czynność	Maksymalny czas przechowywania próbki [dni]
Azotany(III)	Schłodzenie do temp. 4°C	2
Azotany(V)	Schłodzenie do temp. 4°C	2
Bromiany(V)*	Dodanie 50 mg/dm <sup>3</sup> etylenodiaminy	28
Bromki	Nie jest wymagana	28
Chlorany(III)*	Dodanie 50 mg/dm <sup>3</sup> etylenodiaminy, schłodzenie do temp. 4°C	14
Chlorany(V)*	Dodanie 50 mg/dm <sup>3</sup> etylenodiaminy	28
Chlorki	Nie jest wymagana	28
Chromiany	Ustalenie wartości pH próbki do 9-9,5 za pomocą np. NH <sub>4</sub> OH	1
Cyjanki	Ustalenie wartości pH próbki powyżej 12 za pomocą NaOH, schłodzenie do temp. 4°C	14
Fluorki	Nie jest wymagana	28
Octany	Schłodzenie do temp. 4°C	2
Mrówczany	Schłodzenie do temp. 4°C	2
Fosforany(V)	Schłodzenie do temp. 4°C	2

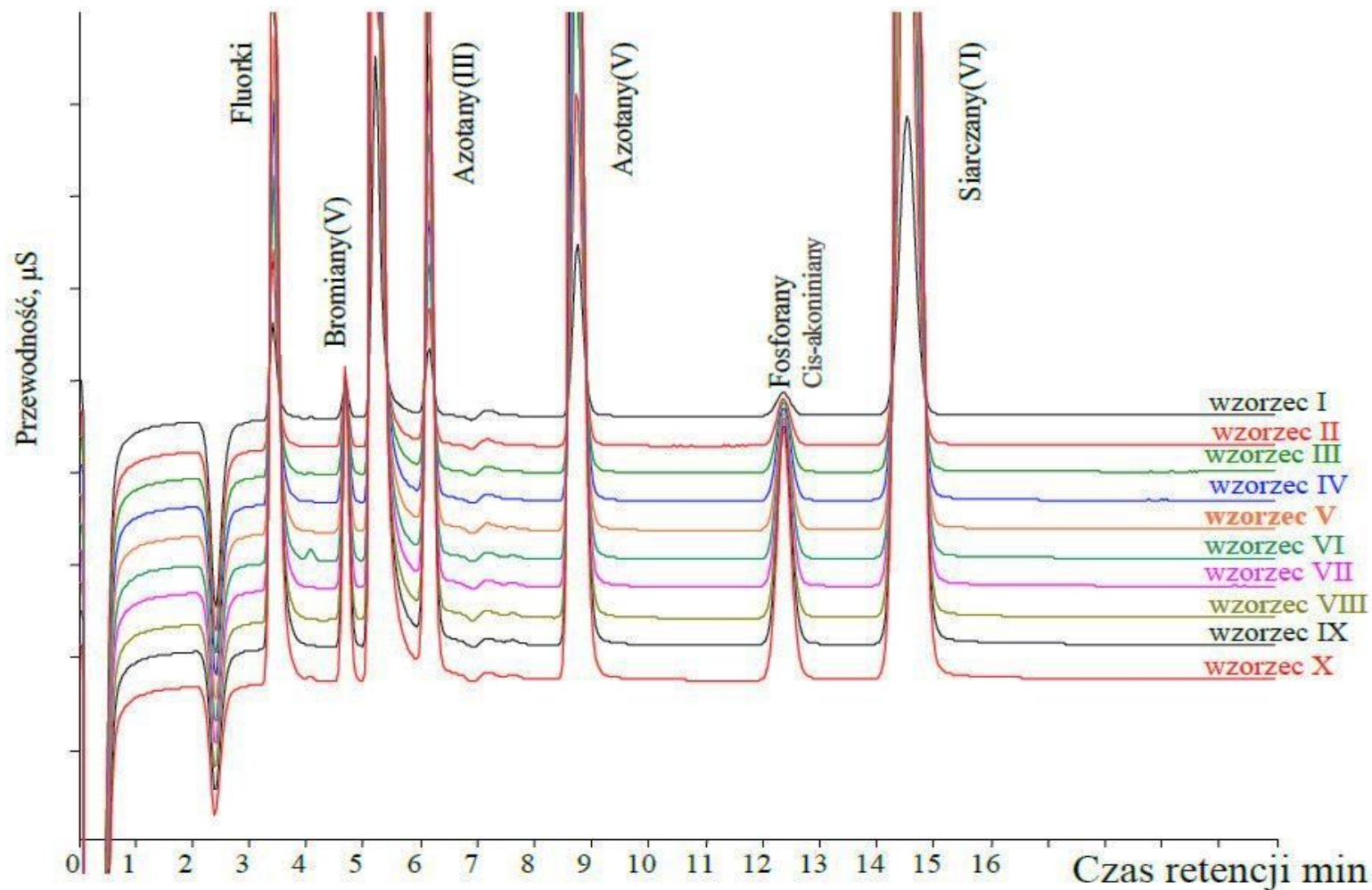
# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - zalety

- \* Stosunkowo prosty sposób przygotowania próbek

Jony amonowe	Filtracja, schłodzenie do temp. 4°C	7
Jony magnezowe	Filtracja	42
Jony metali (m.in. Co, Ni, Zn)	Zakwaszenie roztworu do wartości < 2 za pomocą np. st. HNO <sub>3</sub>	6 miesięcy
Jony potasowe	Filtracja	42
Jony sodowe	Filtracja	42
Jony wapniowe	Filtracja	42
Siarczany(VI)	Nie jest wymagana	28

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - zalety

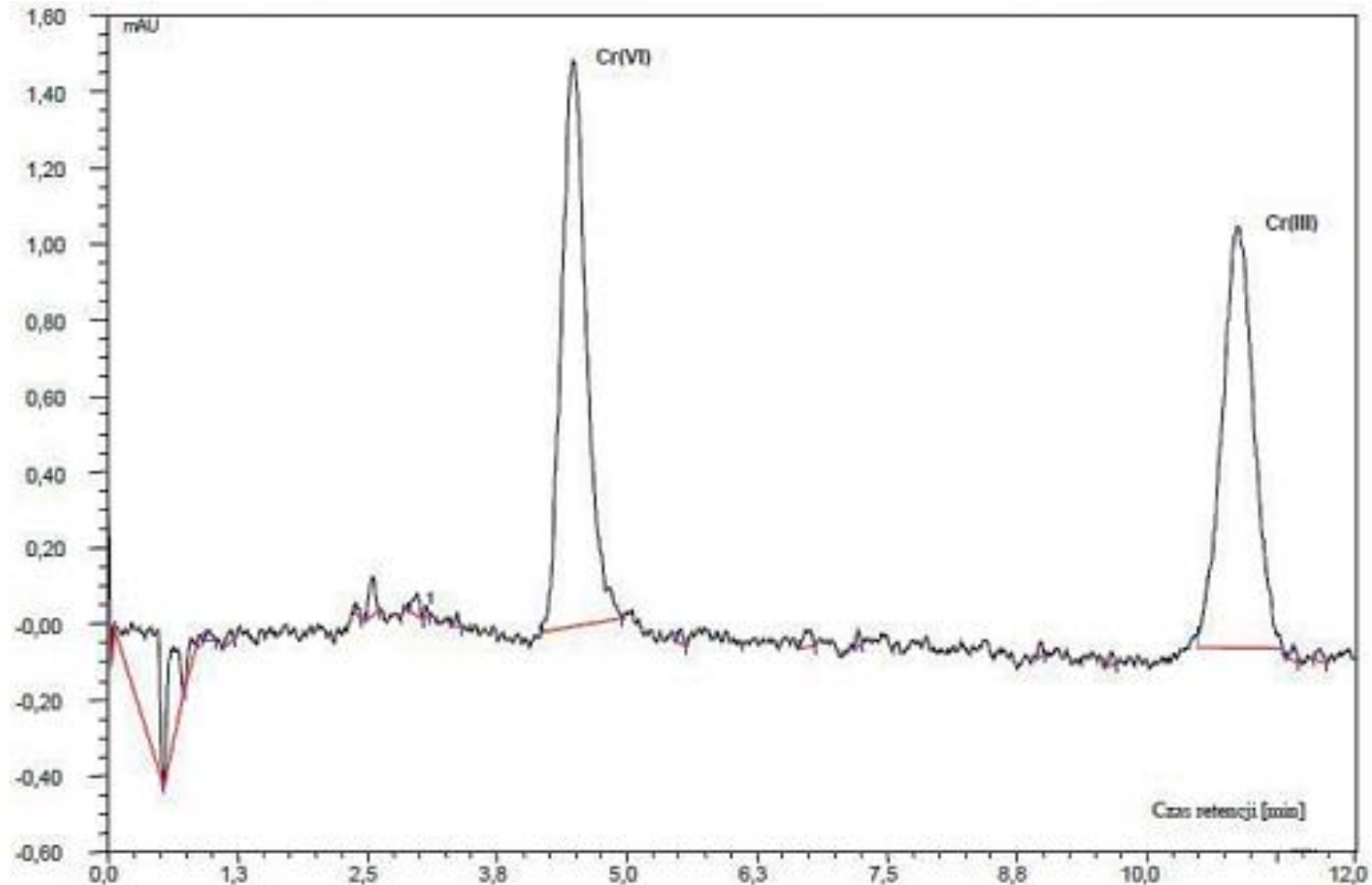
- \* **Powtarzalność uzyskiwanych wyników** - chromatografia jonowa jest metodą wydajniejszą, szybszą, bardziej czułą i dającą bardzo dobrą powtarzalność uzyskiwanych wyników.





# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - zalety

- \* Możliwość oznaczania jonów tego samego pierwiastka na różnych stopniach utlenienia (analiza specjacyjna) - Sprzężanie chromatografii jonowej z innymi detektorami ICP-MS i MS.



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

## CECHY CHARAKTERYSTYCZNE:

1. Eluenty o niskiej sile jonowej (0,1-100 mM)
2. Oznaczanie mieszanin wielu różnych jonów
3. Jonity o małej pojemności jonowej
4. Konieczne tłumienie przewodnictwa (**supresja**) jonów eluentu
5. Szybkie i precyzyjne oznaczanie jonów
6. Uniwersalna detekcja konduktometryczna po uprzedniej supresji jonów eluentu, lub UV po uprzedniej reakcji derywatywacji zakolumnowej
7. Próg detekcji ograniczony wartością przewodnictwa oznaczanych jonów, na poziomie  $\text{mg/dm}^3$

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

## WADY / MOŻLIWE BŁĘDY:

- niewłaściwe rozdzielanie jonów analitu
- wysokie tło eluentu
- nieregularna linia podstawowa
- skracania się czasów retencji analizowanych jonów
- zmiana charakterystyki kolumny analitycznej
- trudności w rozdzielaniu i oznaczaniu anionów i kationów w próbkach, w których występuje nadmiar jednego lub kilku jonów

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

## ZASTOSOWANIA:

1. Oznaczanie zawartości anionów albo/i kationów w wodach i ściekach (wody: pitna, mineralna, morska, powierzchniowa, przemysłowa, ścieki: surowe, oczyszczone, zanieczyszczone wody procesowe i technologiczne)
2. Oznaczanie zawartości anionów i kationów w płynach fizjologicznych, lekach, żywności, paszach, napojach
3. Oznaczanie zawartości aminokwasów, peptydów, białek (w tym enzymów i koenzymów), cukrów, nukleotydów, RNA, DNA w materiałach pochodzenia biologicznego albo syntetycznego
4. Oznaczanie zawartości pierwiastków możliwych do przeprowadzenia do postaci jonowej w rudach, glebach, materiałach rozszczepialnych

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

**ZASTOSOWANIA** - Polski Komitet Normalizacyjny oferuje kilka polskojęzycznych wersji norm wykorzystujących metodę chromatografii jonowej do oznaczania jonów w wodach i ściekach.

1. **PN-ISO 10304-1: (1998)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych jonów fluorkowych, chlorkowych, azotynowych, ortofosforanowych, bromkowych, azotanowych i siarczanowych za pomocą chromatografii jonowej, - Część 1: Metoda dla wód mało zanieczyszczonych.
2. **PN-ISO 10304-2: (1998)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych anionów za pomocą chromatografii jonowej. Część 2: Oznaczanie bromków, chlorków, azotanów, azotynów, ortofosforanów i siarczanów w ściekach.
3. **PN-ISO 10304-3 (2000)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych anionów za pomocą cieczonej chromatografii jonowej - Część 3: Oznaczanie chromianów, jodków, siarczynów, tiocyjanków i tiosiarczanów.
4. **PN-ISO 10304-4 (2000)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych anionów za pomocą chromatografii jonowej - Część 4: Oznaczanie chloranów, chlorków i chlorynów w wodach mało zanieczyszczonych.
5. **PN-ISO 15061 (2002)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych bromianów - metodą chromatografii cieczonej.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

6. **PN-ISO 14911 (2001)**. Jakość wody – Oznaczanie jonów  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$  techniką chromatografii jonowej - Metoda dla wód i ścieków.
7. **PN-EN ISO 10304-1 (2009)**. Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych anionów za pomocą chromatografii jonowej - Część 1: Oznaczanie bromków, chlorków, fluorków, azotanów, azotynów, fosforanów i siarczanów.

## INNE

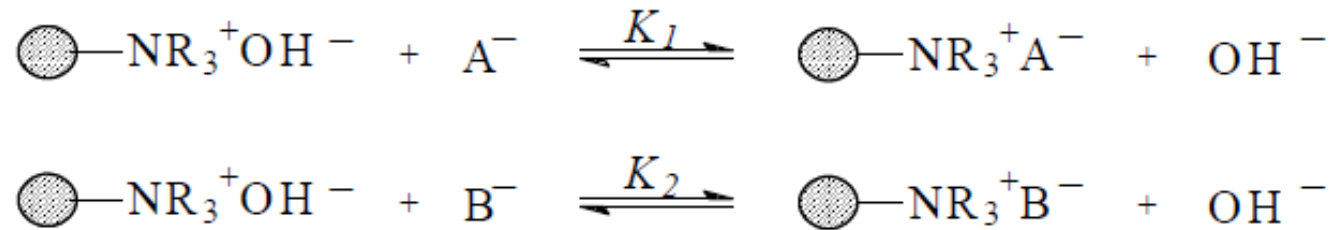
- 1a. **PN-ISO 1911-1: (2001)**. Emisja ze źródeł stacjonarnych. Manualna metoda oznaczania HCl. Część 1: Pobieranie próbek gazów.
- 1b. **PN-ISO 1911-2: (2001)**. Emisja ze źródeł stacjonarnych. Manualna metoda oznaczania HCl. Część 2: Absorpcja związków gazowych.
- 1c. **PN-ISO 1911-3: (2001)**. Emisja ze źródeł stacjonarnych. Manualna metoda oznaczania HCl. Część 3: Analiza roztworów absorpcyjnych i obliczanie.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

2. **PN-EN 15191 (2006)**. Charakteryzowanie odpadów i gleby - oznaczanie chromu w materiale stałym metodą alkalicznego roztwarzania i chromatografii jonowej z detekcją spektrofotometryczną.
3. **PN-EN 15492 (2008)**. Etanol jako komponent benzyn. Oznaczanie chlorku nieorganicznego i sulfonianu metodą chromatografii jonowej.
4. **PN-EN 13368-1 (2004)**. Nawozy. Oznaczanie czynników chelatujących metodą chromatografii jonowej. Część 1: EDTA, HEDTA i DTPA.
5. **PN-EN 13368-2 (2004)**. Nawozy. Oznaczanie czynników chelatujących metodą chromatografii jonowej. Część 2: EDDHA i EDDHMA.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ilościowo

Jeśli przez kolumnę, wypełnioną 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:



Ilościową miarą tego równowagowego procesu jest **współczynnik selektywności**,  $k_{X/OH^-}$  zdefiniowany w następujący sposób:

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

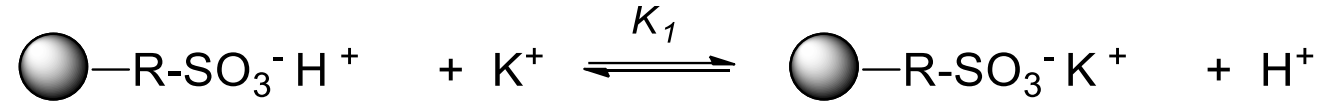
$S$  - w fazie stacjonarnej  
 $M$  - w fazie mobilnej

Jony o **dużym współczynniku selektywności** są lepsze jako eluenty, dlatego że wykazują one dużą siłę elucji nawet w roztworach rozcieńczonych.



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ilościowo

Dla kationitu:



$$K = \frac{[\text{żywica} - \text{SO}_3^- \text{K}^+] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{żywica} - \text{SO}_3^- \text{H}^+] \cdot [\text{K}^+]}$$

$K$  jest miarą selektywności żywicy obsadzonej jednym jonem względem obsadzenia jej innym jonem.

Im jest on wyższy, tym dłużej jon będzie pozostawał przyłączony do grupy jonowymiennej i później będzie eluowany z kolumny.

Wybierając eluent należy 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.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - ilościowo

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

$$\lambda = \frac{[X^-]_s}{[X^-]_M}$$

W większości przypadków, zamiast wagowego współczynnika podziału, stosuje się **stosunek podziału składnika między fazę stacjonarną i ruchomą  $k'$**

$$k' = \lambda \times \frac{m_R}{V_S}$$

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

# Wysokosprawną Chromatografia Jonowa

Dobór eluentu w HPIC zależy głównie od używanej metody detekcji.

Ponieważ w większości detekcja anionów i kationów odbywa się za pomocą detektorów konduktometrycznych, najczęściej stosowane eluenty można podzielić na dwie grupy:

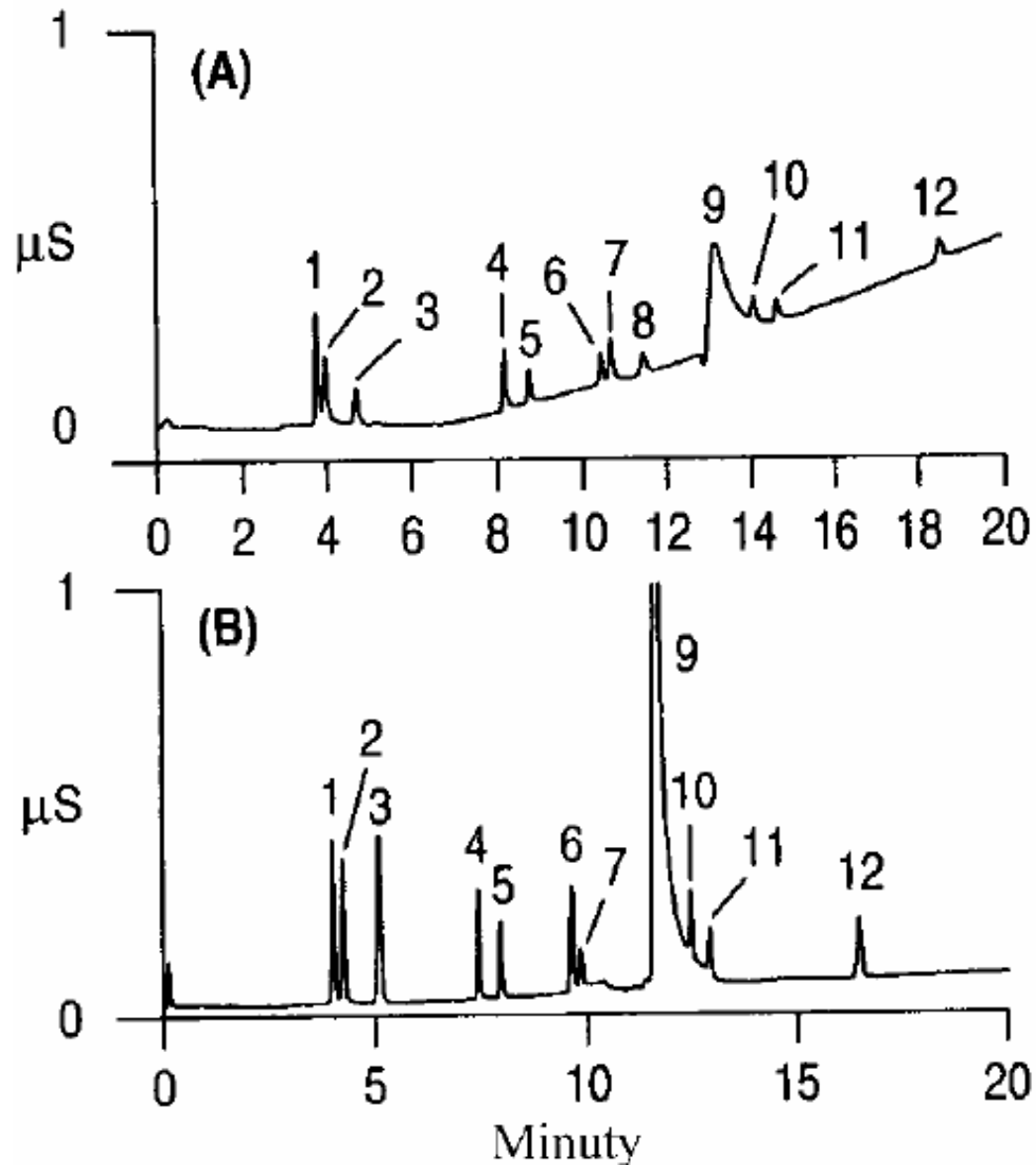
- (i) eluenty stosowane z detekcją konduktometryczną i *chemicznym tłumieniem (supresją)* przewodnictwa eluentu („chromatografia dwukolumnowa”)
- (ii) eluenty stosowane z detekcją konduktometryczną i *elektroniczną kompensacją* przewodnictwa eluentu („chromatografia jednokolumnowa”)

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

## SUPRESJA

= obniżenie przewodnictwa eluentu na tle przewodnictwa jonów analitów - w konsekwencji – lepsza czułość i niższe granice wykrywalności

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa



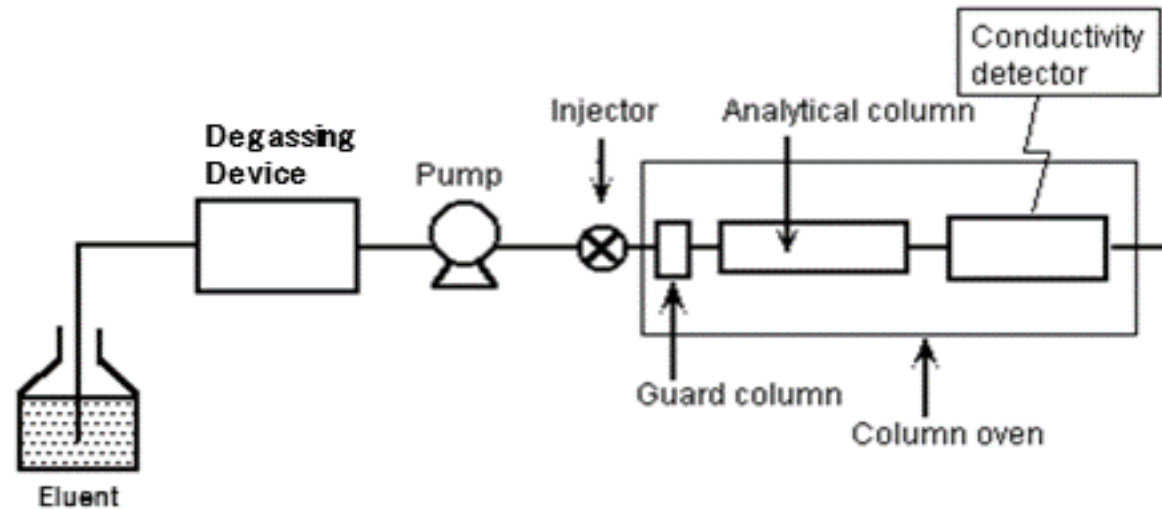
- Chromatogram bez supresji –  
sygnał zaburzany silnym przewodnictwem eluenta.

- Chromatogram z supresją - zmniejszony sygnał  
przewodności wynikający z przewodnictwa eluenta.  
Rolę taką może pełnić każdy proces chemiczny, w  
wyniku którego składniki eluenta są zamieniane w  
mniej przewodzące związki np. reakcje wymiany  
jonowej, kompleksowania itp

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

## Chromatografia jonowa bez supresji

= jednokolumnowa chromatografia lub chromatografia bez *tłumienia przewodnictwa* (single column IC, non-suppressed IC)



Eluenty stosowane z detekcją konduktometryczną i **elektroniczną kompensacją przewodnictwa** (bez supresji!) to te, w których skład wchodzi jony organiczne o względnie dużych cząsteczkach (o małej ruchliwości).

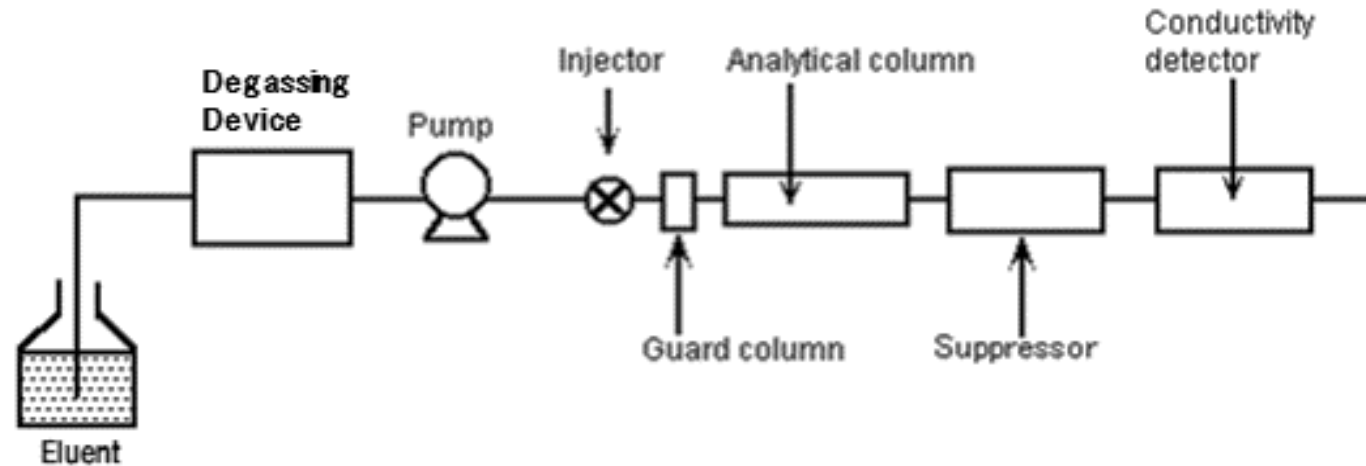
Najczęściej stosowane w analizie anionów są rozcieńczone ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$ M) roztwory soli kwasów benzoowego, ftalowego i *o*-sulfobenzoowego.

Łączą one w sobie znaczące powinowactwo do anionitów pokrytych grupami amoniowymi z względnie niską przewodnością molową.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

## Chromatografia jonowa z supresją

= dwukolumnowa chromatografia jonowa lub chromatografia jonowa z *tłumieniem przewodnictwa* (dual-column IC, suppressed IC)



Problem przewodnictwa od eluenta rozwiązano poprzez zastosowanie drugiej specjalnej kolumny (*supresora*) umieszczonej po kolumnie analitycznej. Składniki eluentu opuszczają kolumnę tłumienia w postaci słabo zdysocjowanej.

Np., 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 detektora konduktometrycznego w postaci zdysocjowanej, gdzie są wykrywane.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa

Najczęściej stosowane eluenty w HPIC anionów z detekcją konduktometryczną i *chemicznym tłumieniem przewodnictwa eluentu*:

Eluent	Jon eluentu	Produkt supresji	Siła elucji
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	[CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O]	silny
RNHCH(R')SO <sub>3</sub> H/NaOH	RNHCH(R')SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	RNH <sub>2</sub> <sup>+</sup> CH(R')SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	dość silny
H <sub>2</sub> NCH(R)CO <sub>2</sub> H/NaOH	H <sub>2</sub> NCH(R)CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH(R)CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	dość silny
NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	[CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O]	dość silny
NaHCO <sub>3</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O]	słaby
NaOH	OH <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	słaby
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	bardzo słaby

Zastosowanie supresji pozwala na uzyskanie czułości co najmniej o rząd wielkości wyższej niż z kompensacją elektroniczną.

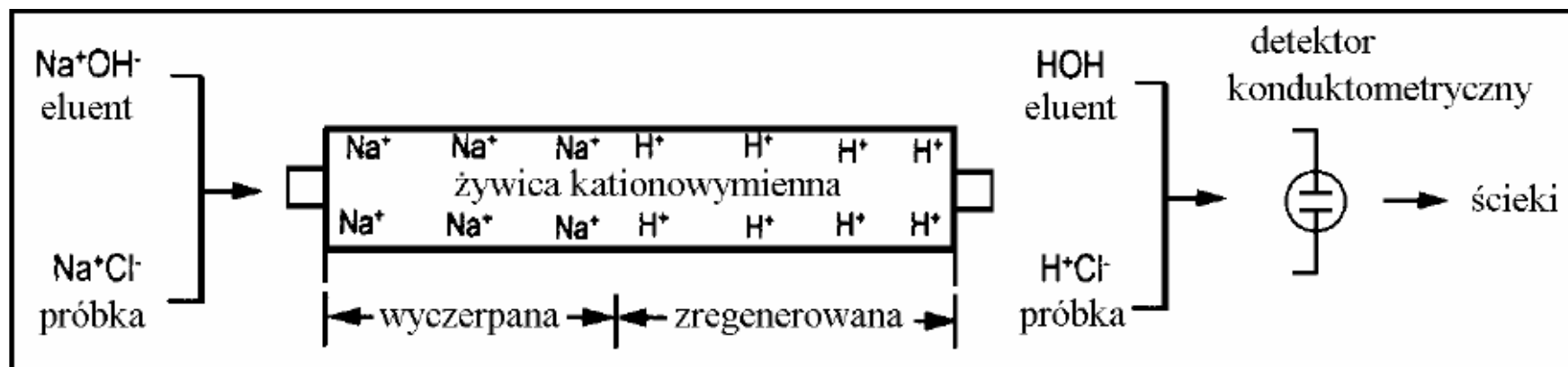
Dobierając stężenie składników eluentu oprócz wymaganej siły elucji należy brać pod uwagę pH jakie otrzymamy, które należy dobrać, tak aby wszystkie oznaczane substancje były zdysocjowane tj.:  $\text{pH}(\text{eluentu}) > \text{pKa}(\text{najsłabiej dysocjującego składnika próbki})$

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - supresja

**Supresja** - tłumienie przewodności eluentu bez naruszania badanych składników próbki. Funkcję taką może pełnić każdy proces chemiczny, w wyniku którego składniki eluentu są zamieniane w mniej przewodzące związki np. reakcje wymiany jonowej, kompleksowania itp.

*Supresor to kolumna tłumienia (wypełniona silnie kwasową żywicą kationowymienną), umieszczona po kolumnie analitycznej. Następuje w niej wymiana kationu eluentu na jon wodorowy.*

Składniki eluentu opuszczają supresor w postaci słabo zdysocjowanej.

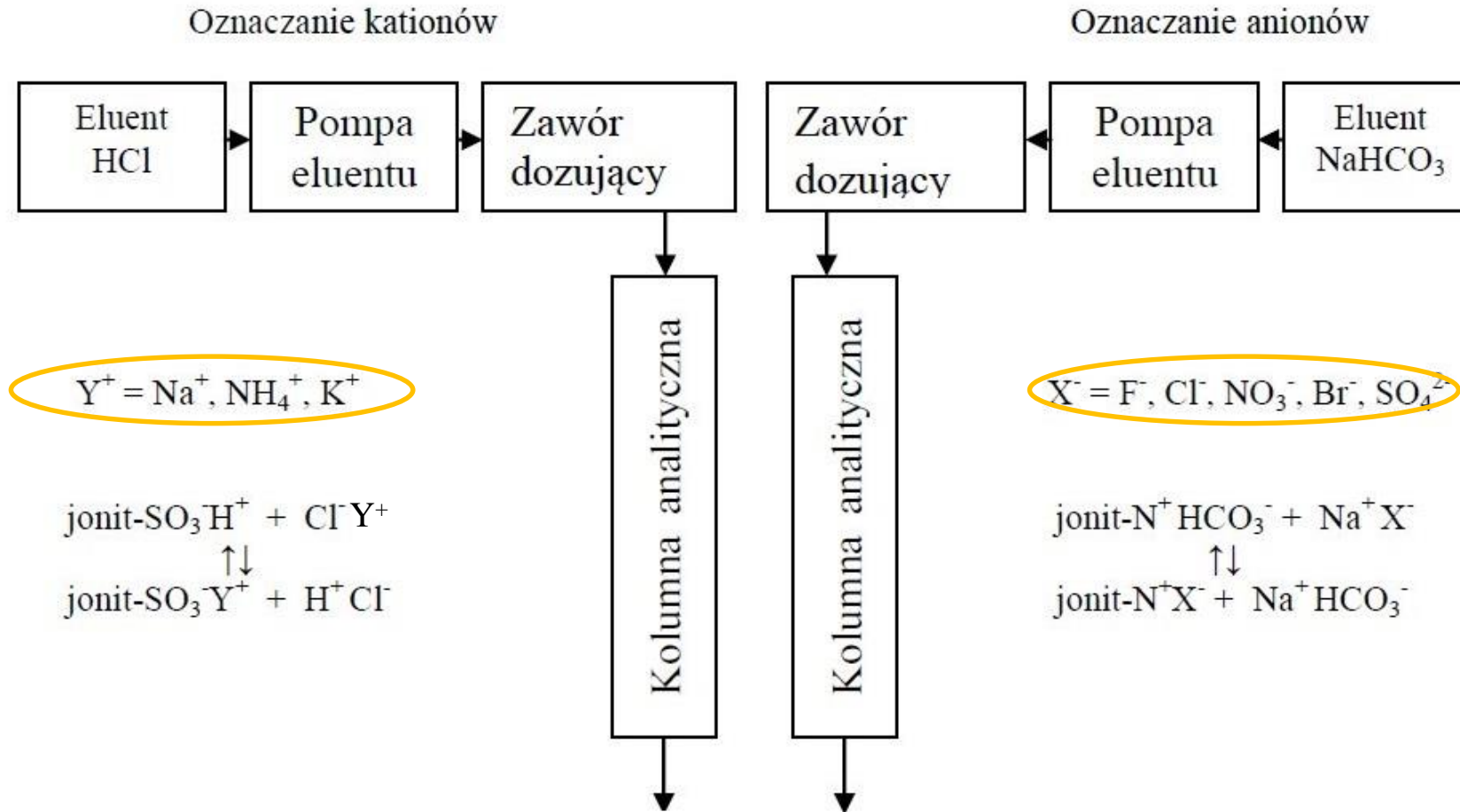


Gdy w chromatografii anionów eluentem jest roztwór wodorotlenku, po procesie supresji kolumnę tłumienia opuszczają elektrycznie obojętne cząsteczki wody. Natomiast aniony próbki, które z jonami wodorowymi tworzą mocniejsze kwasy, docierają do naczynka konduktometrycznego w postaci zdysocjowanej, gdzie są wykrywane.



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - supresja

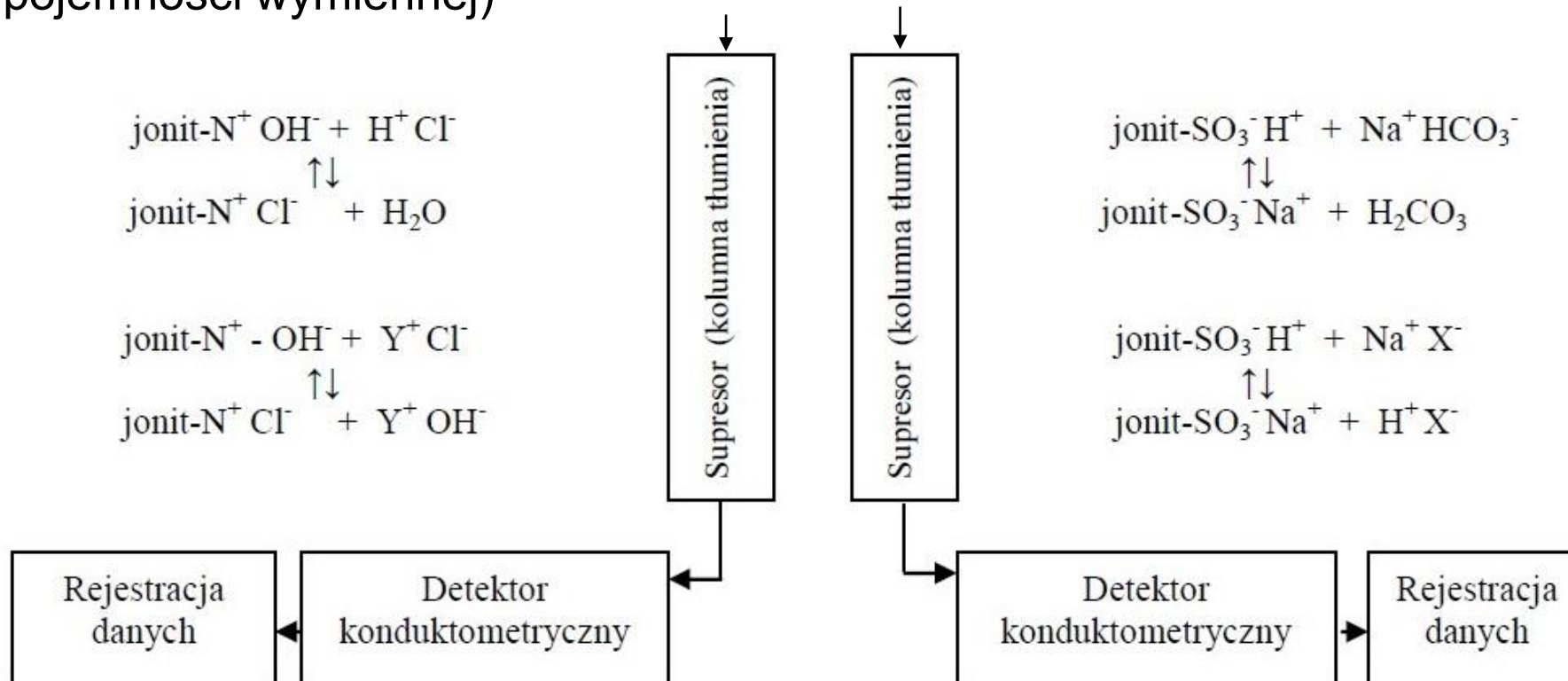
ZASADA DZIAŁANIA – Reakcje wymiany jonowej zachodzące w kolumnie analitycznej



- ◇ ze zbiornika eluentu, do kolumny analitycznej, wypełnionej odpowiednim wypełnieniem (jonitem) tłoczony jest eluent
- ◇ za pomocą dozownika, do strumienia eluentu wprowadzana jest próbka, której jony są rozdzielane w kolumnie analitycznej

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - supresja

**ZASADA DZIAŁANIA** – Reakcje wymiany jonowej zachodzące w kolumnie tłumienia (jonit o dużej pojemności wymiennej)



♦ w chromatografii jonowej z tłumieniem przewodnictwa eluent z kolumny analitycznej kierowany jest do supresora, w którym jony eluentu tworzą w wyniku zachodzących reakcji słabo zdysocjowany kwas lub wodę, a jony analitu w postaci dobrze zdysocjowanych soli lub wodorotlenków trafiają do detektora konduktometrycznego

♦ w chromatografii jonowej bez tłumienia przewodnictwa eluent z kolumny analitycznej kierowany jest bezpośrednio do detektora konduktometrycznego

♦ sygnał z detektora jest rejestrowany w postaci piku chromatograficznego

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - supresja

## SUPRESOR MEMBRANOWY

= do tłumienia przewodnictwa eluentu wykorzystuje się zjawisko dializy, osmozy, albo elektroosmozy - "jednokolumnowa chromatografia jonowa z membranowym supresorem"

**SUPRESOR KAPILARNY** = SUPRESOR o działaniu ciągłym wykorzystujący wymianę jonową zachodzącą w membranie jonowymiennej (dializa)

**AUTOSUPRESOR** = SUPRESOR o działaniu ciągłym, w którym do wytwarzania jonów  $H^+$  lub  $OH^-$  wykorzystuje się procesy elektrodowe

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

Grupy aktywne na jonitach mogą być silnie lub słabo zasadowe lub kwasowe a także mieszane.

*-anionity* - zdolne do wymiany anionów,

*-kationity* - zdolne do wymiany kationów

*-jonity amfoteryczne* - zdolne do wymiany zarówno anionów jak i kationów.

Większość jonitów to **jonity organiczne** o szkielecie z **kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu (PS/DVB)**, który pełni rolę środka sieciującego łańcuchy polistyrenu.

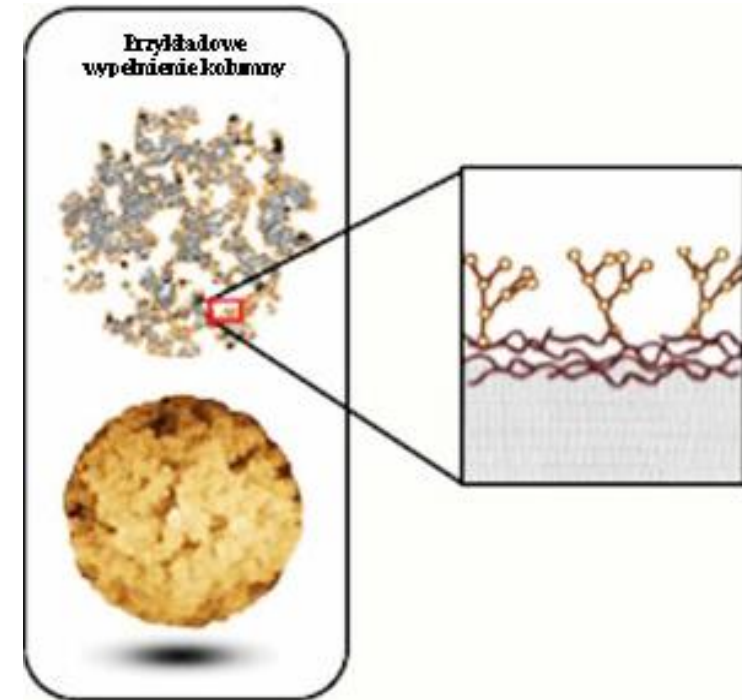
Są one bardzo szeroko stosowane, gdyż wykazują bardzo dobrą stabilność w zakresie  $\text{pH} = 0 - 14$ . Umożliwia to użycie eluentów o bardzo wysokim  $\text{pH}$ , pozwalającym na jonizację substancji, które w  $\text{pH}$  obojętnym są niezjonizowane (np. cukry czy słabe kwasy)

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

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

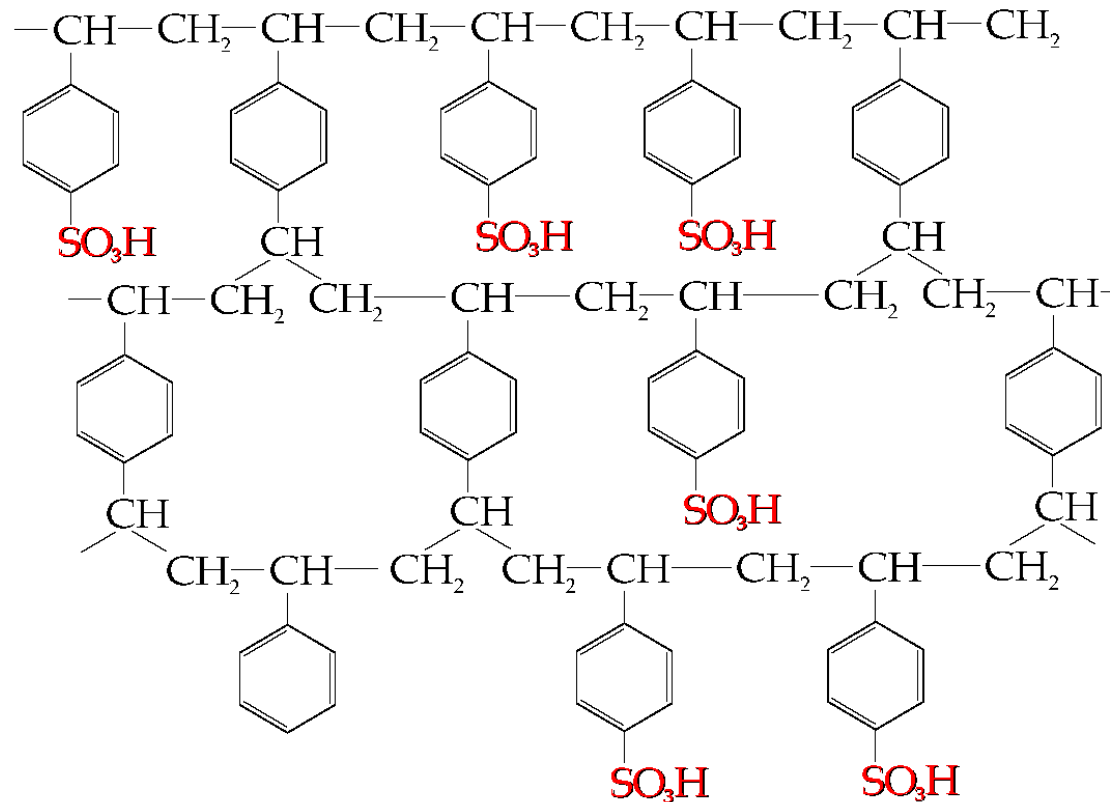
O charakterystyce kolumny wypełnionej żywicą jonowymienną decydują takie parametry jak:

1. rodzaj żywicy,
2. stopień usieciowania,
3. wielkość porów,
4. rodzaj i ilość grup wymiennych
5. rozkład wielkości ziaren i jakość upakowania kolumny



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

Polimeryzacja i usieciowanie:




Sulfonowanie kopolimeru polistyrenu i diwinylobenzenu ( $-\text{SO}_3^-$ )

Kopolimeryzacja kwasu akrylowego i diwinylobenzenu ( $-\text{COO}^-$ )

Aminowanie kopolimeru polistyrenu i diwinylobenzenu ( $-\text{NR}_4^+$ )

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

 **Usieciowanie** wpływa na proces wymiany jonowej.  
Jony o dużym promieniu jonowym wskutek hydratacji mogą być eluowane szybciej z jonitu o niższym usieciowaniu, niż z jonitu o wysokim stopniu usieciowania.

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

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny



Na charakterystykę rozdzielczą jonitu wpływa **liczba i rodzaj grup jonowymiennych**. Silnie kwasowe lub silnie zasadowe grupy są znacznie lepiej zdysocjowane niż słabe.

Liczba grup jonowymiennych również wpływa **na proces wymiany jonowej**, ponieważ zwiększenie liczby miejsc aktywnych w jednostce objętości powoduje dłuższe zatrzymywanie jonów próbki w kolumnie wypełnionej jonitem.

**Im silniej wiązany jest jon przez grupę jonowymienną, tym wyższy będzie współczynnik selektywności ( $k$ ).**

- ❖ *iony trójwartościowe są wiązane silniej niż jony dwu i jednowartościowe, tzn., że do wymycia jonów trójwartościowych należy używać silniejszych eluentów niż dla jonów dwuwartościowych.*
- ❖ *jony o tej samej wartościowości a o większym promieniu jonowym są silniej zatrzymywane przez żywicę niż jony o małym promieniu.*



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

Współczynnik selektywności, a w konsekwencji i czas retencji anionów rozdzielanych na typowych **silnie zasadowych żywicach anionowymiennych** można uszeregować w następującej kolejności

## SZEREG SELEKTYWNOŚCI:

$\text{OH}^- < \text{F}^- < \text{ClO}_3^- < \text{BrO}_3^- < \text{HCOO}^- < \text{IO}_3^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{H}_2\text{PO}_4^- < \text{HCO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{CN}^- < \text{NO}_2^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{HPO}_4^{2-} < \text{SO}_3^{2-} < \text{SO}_4^{2-} < \text{C}_2\text{O}_4^{2-} < \text{CrO}_4^{2-} < \text{MoO}_4^{2-} < \text{WO}_4^{2-} < \text{S}_2\text{O}_3^{2-} < \text{I}^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{salicylan} < \text{cytrynian}$

Współczynnik selektywności, a w konsekwencji i czas retencji kationów rozdzielanych na typowych **silnie kwasowych żywicach kationowymiennych** można uszeregować w następującej kolejności

## SZEREG SELEKTYWNOŚCI:

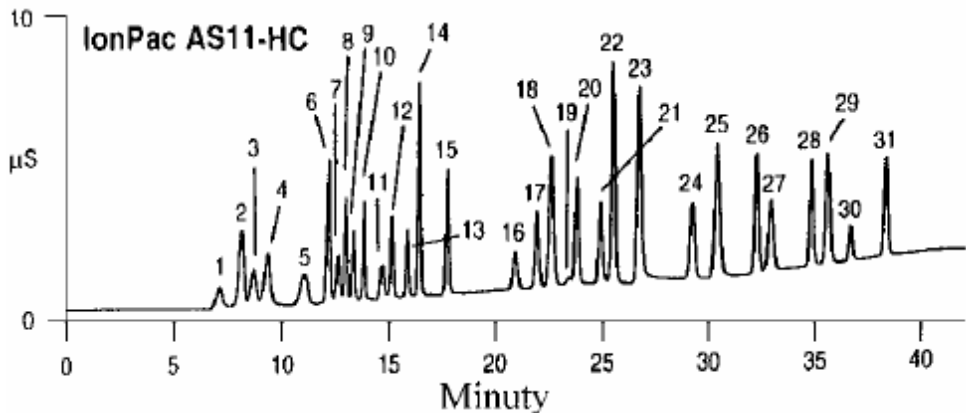
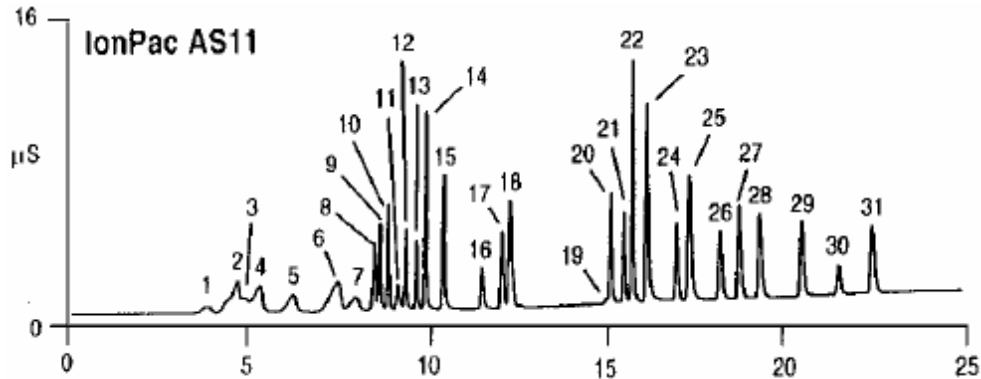
$\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Ag}^+ < \text{Tl}^+ \ll \text{UO}_2^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ba}^{2+} \ll \text{Al}^{3+} < \text{Sc}^{3+} < \text{Y}^{3+} < \text{Eu}^{3+} < \text{Pr}^{3+} < \text{Ce}^{3+} < \text{La}^{3+} \ll \text{Pu}^{4+}$

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny



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.

Rozwinięcie powierzchni wymiany jonowej jest osiągnięte zwykle przez wytworzenie **makro** i **mikro porów** w ziarnach żywicy.



Różnice pomiędzy kolumnami z wypełnieniem **mikroporowatym** z powierzchniowo osadzonymi grupami funkcyjnymi i **makroporowatym** można przedstawić porównując odpowiednie chromatogramy.

Rozdział anionów na kolumnie o niskiej pojemności dokonuje się w czasie, prawie o połowę krótszym niż na kolumnie makroporowatej.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

**Efektywność kolumny** przejawia się w zdolności do elucji wąskich, symetrycznych pików ze złoża upakowanego. Jedną z głównych przyczyn rozszerzania się stref jest podłużna dyfuzja cząsteczek substancji rozpuszczonej, czyli np. białek, peptydów czy oligonukleotydów.

- ❖ Dobre wypełnienie (upakowanie) kolumny znacząco przyczyni się do zwiększenia rozdzielczości. Kolumny, które są upakowane nierównomiernie, zbyt ciasno, zbyt luźno lub zawierają pęcherzyki powietrza, doprowadzą do powstania kanałów (nierównomiernego przejścia buforu przez kolumnę), poszerzenia strefy, a tym samym utraty rozdzielczości.
- ❖ Również rozmiar cząstek jest istotnym czynnikiem wpływającym na rozdzielczość i generalnie najmniejsze cząstki będą generować najwęższe piki w odpowiednich warunkach elucji i w dobrze wypełnionej kolumnie

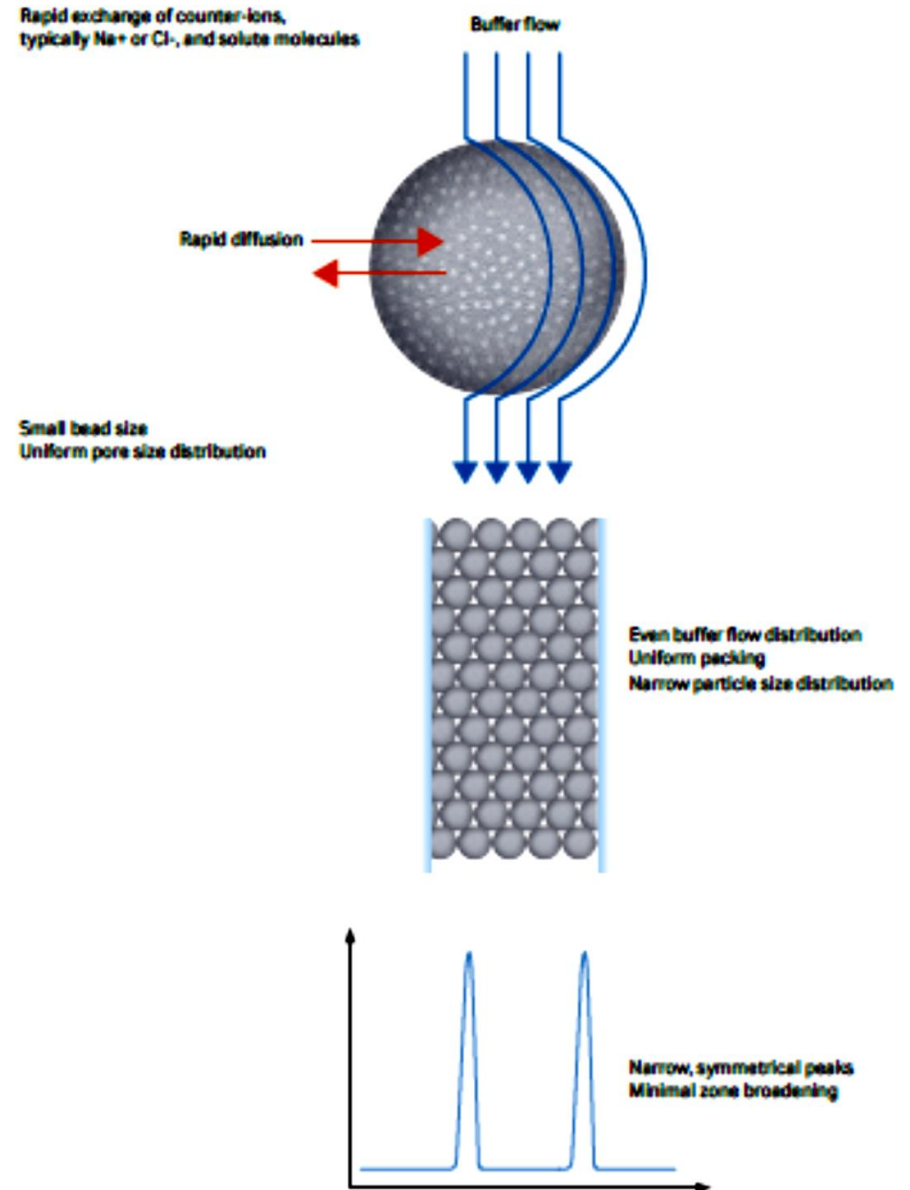


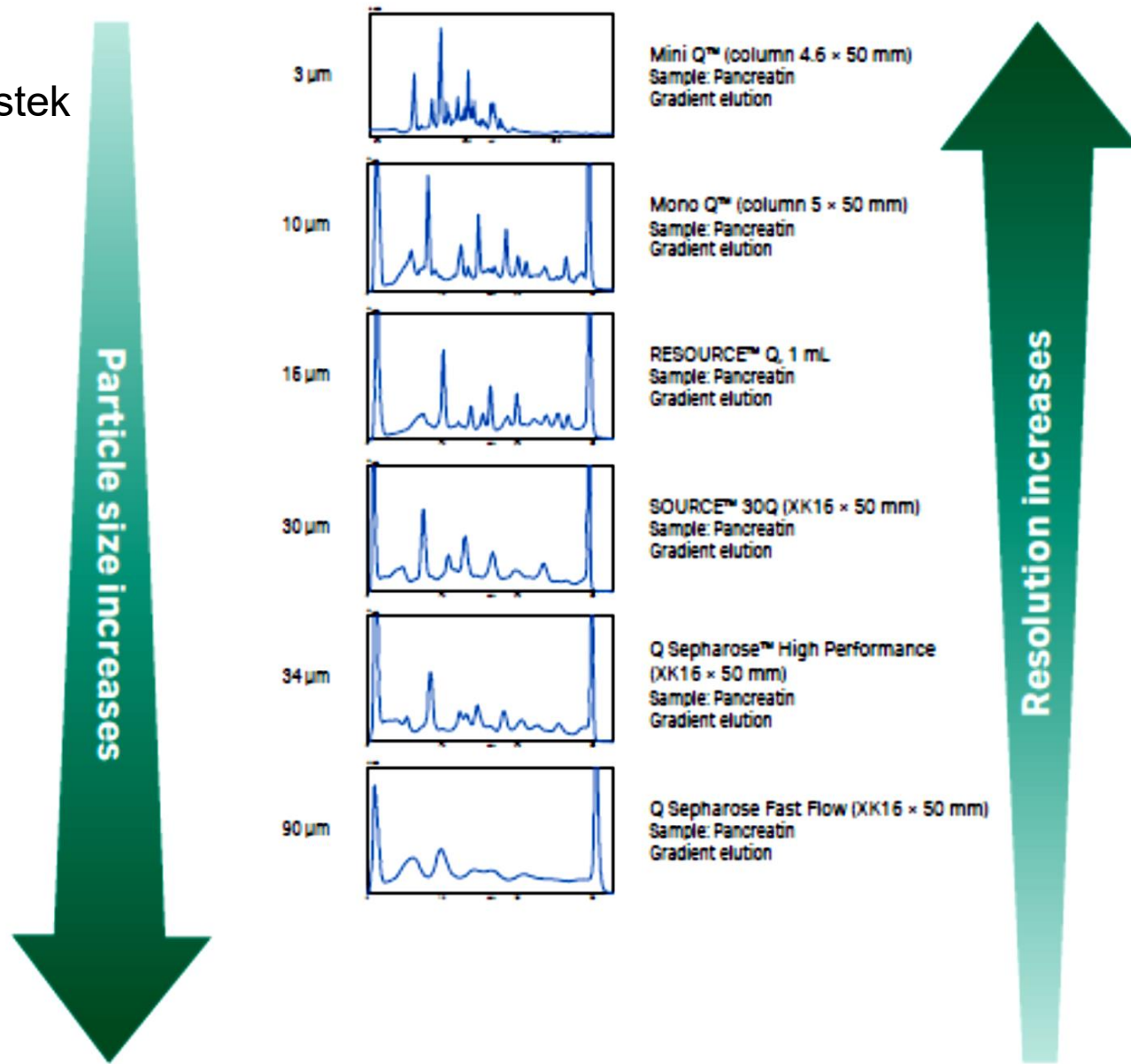
Fig 1.5. Factors that affect column efficiency.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - kolumny

Rozdzielczość pod względem wydajności można poprawić, zmniejszając rozmiar cząstek złoża, ale...

➔ zmniejszając rozmiar cząstek matrycy, użycie mniejszego rozmiaru cząstek często powoduje wzrost przeciwności, co powoduje konieczność zmniejszenia prędkości przepływu, co wydłuża czas pracy. Stąd potrzeba dopasowania medium do wymagań dotyczących oczyszczania.

➔ lepkość silnie stężonych próbek może zmniejszyć rozdzielczość, jeśli duże objętości próbek zostaną załadowane na kolumny wypełnione małymi cząstkami. Probki można rozcieńczyć lub alternatywnie należy użyć cząstek o większym rozmiarze.



Przykłady wpływu wielkości ziaren na ostateczną rozdzielczość.

# Wysokosprawną Chromatografia Jonowa - detektory

**DETEKTORY** są urządzeniami określającymi zmiany w składzie eluentu, na podstawie różnic pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi eluentu i substancji oznaczanej (*analitu*). W większości przypadków o wyborze detektora decyduje rodzaj metody oddzielania i skład zastosowanego eluentu.

Detektory mogą działać w sposób bezpośredni, gdy oznaczany jon posiada własności fizykochemiczne (np. absorpcja UV przy wybranej długości fali), różniące się diametralnie od własności będących w dużym nadmiarze jonów eluentu.

Częściej jednak mamy do czynienia z metodami wykorzystującymi zmianę cechy eluentu jonowego (np. przewodnictwa elektrycznego) jaka zachodzi na skutek obecności jonów analitu.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

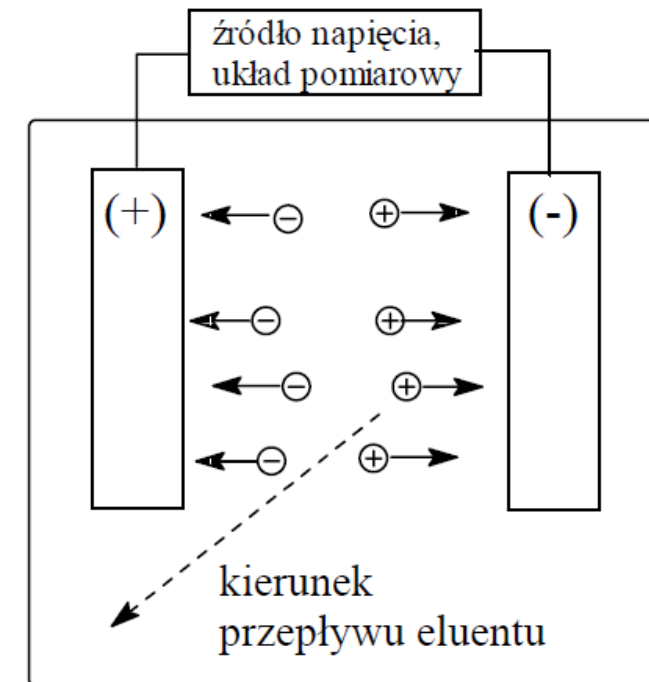
- **Detekcja Konduktometryczna** - jest najbardziej uniwersalną metodą stosowaną w chromatografii jonowej. Można oznaczać anality, które po przejściu przez kolumnę są w stanie dotrzeć do detektora w postaci jonowej, np.: jony mocnych kwasów i zasad, takich jak chlorki, siarczany, potas, sól itp.

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.

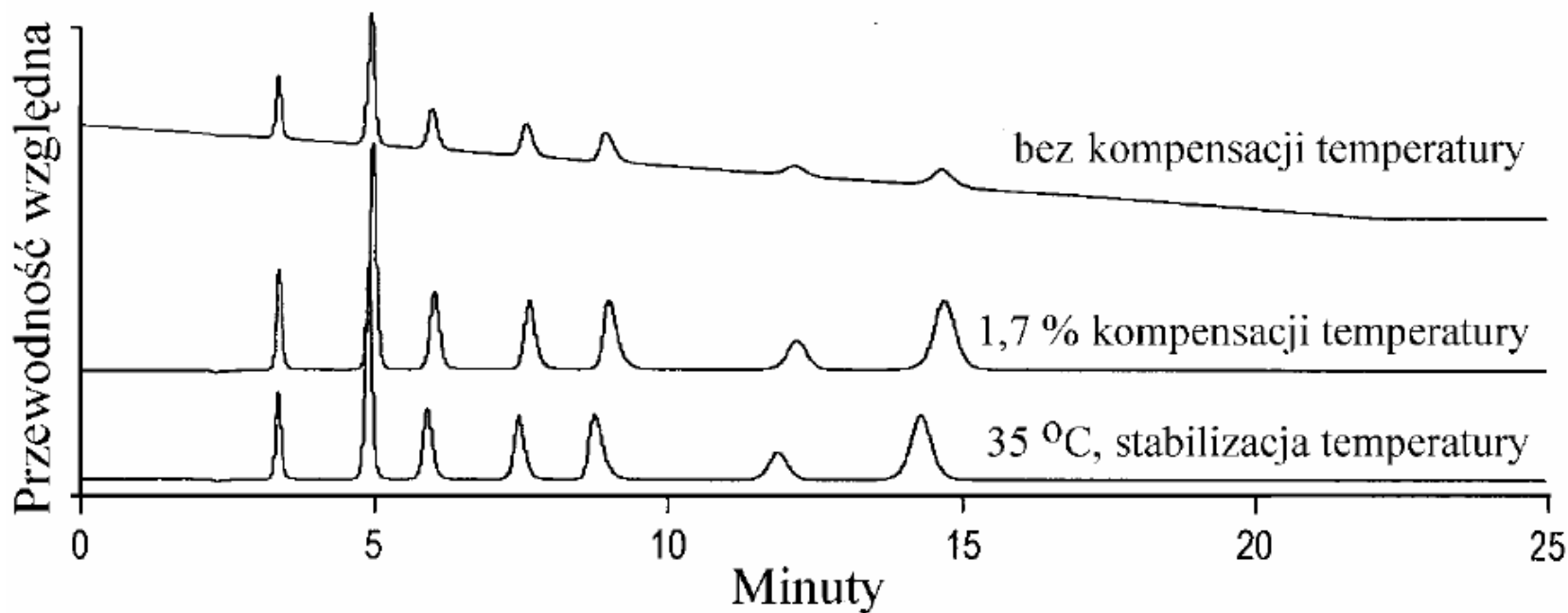
W detektorze konduktometrycznym wykorzystuje się zdolność roztworów elektrolitów umieszczonych w polu elektrycznym powstającym pomiędzy dwoma elektrodami przepływowego naczynka konduktometrycznego *do przewodzenia* prądu na skutek transportu jonów.

Ponieważ skład elektrolitu ma istotny wpływ na przewodność molową jonów, wymaga szczególnej dbałości o **stabilność składu eluentu**.



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

Duża wrażliwość przewodności molowej jonów na zmiany temperatury, wymaga [stabilizacji temperatury detektora](#) lub elektronicznej [kompensacji efektów temperaturowych](#). Stabilizacja temperatury detektora jest szczególnie istotna w *chromatografii jednokolumnowej*, w której przewodność eluentu jest wysoka.

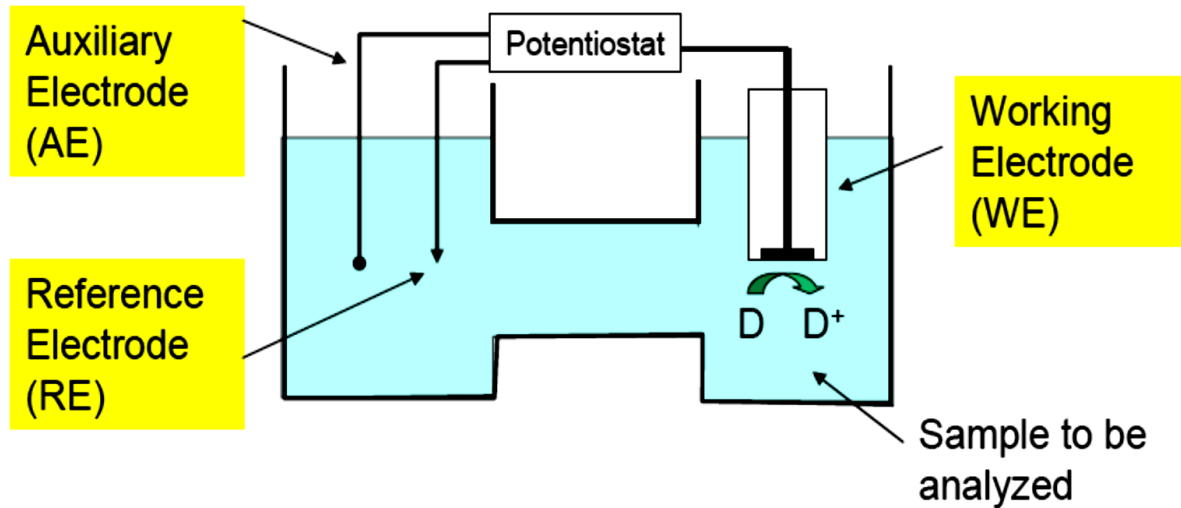


Wahania linii podstawowej mogą uniemożliwić oznaczenie wielu jonów występujących w małych stężeniach. Ma to mniejsze znaczenie w przypadku *chromatografii dwukolumnowej*, gdzie w rezultacie supresji, przewodność linii podstawowej jest zredukowana

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

Jeśli ze względu na ich niski stopień dysocjacji jonów, są one trudno oznaczalne lub nieoznaczalne metodą konduktometryczną stosuje się metody **detekcji elektrochemicznej** - pomiar prądu lub ładunku powstającego podczas elektrochemicznego utleniania-redukcji analitu na powierzchni elektrody roboczej.

- **Detekcja amperometryczna** (*DC amperometria*) polega na pomiarze prądu przy stałym potencjale elektrody roboczej, wykonanej z metalu szlachetnego (*Ag, Pt*).



Potencjał elektrody roboczej (**WE**) jest utrzymywany względem elektrody odniesienia (*Ag/AgCl*) (**RE**), o stałym, niezależnym od składu eluentu potencjale. Trzecią elektrodę (pomocniczą) stanowi elektroda węglowa albo przewodząca obudowa naczynka amperometrycznego (**AE**).



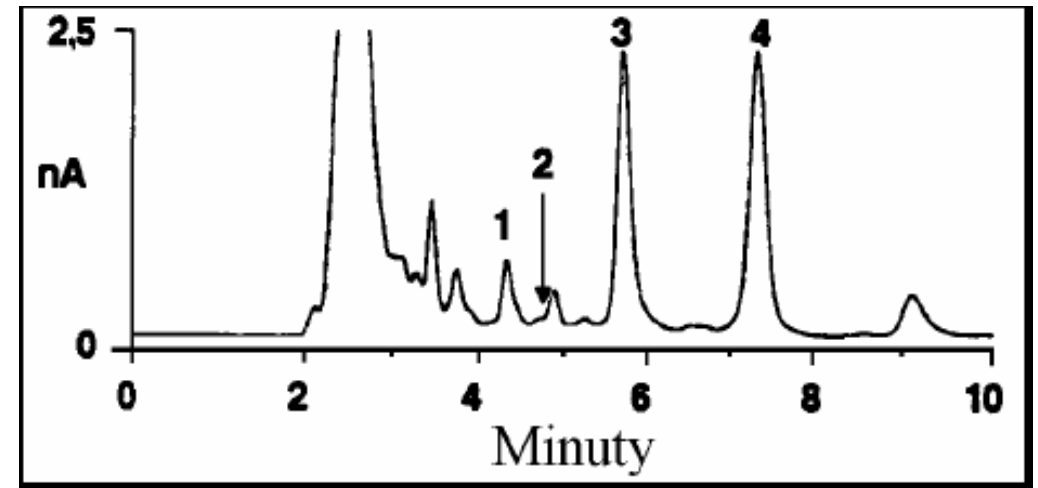
# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

Kiedy elektroaktywna substancja przepływa przez naczynko amperometryczne częściowo się utlenia (lub redukuje). Reakcja ta prowadzi do powstania pomiędzy elektrodą roboczą, a elektrodą pomocniczą prądu proporcjonalnego do stężenia analitu.

Natężenie prądu jest rejestrowane w postaci chromatogramu.

Użycie naczynka o większej powierzchni elektrody roboczej pozwala na pełną konwersję analitu (**kulometria**).

*Detekcję amperometryczną stosuje się głównie do oznaczania związków organicznych o znaczeniu biologicznym, posiadających w swym składzie grupy fenolowe i katecholowe, np. : adrenalina, dopamina i inne neurotransmitery, których detekcja wykracza poza możliwości metody konduktometrycznej*

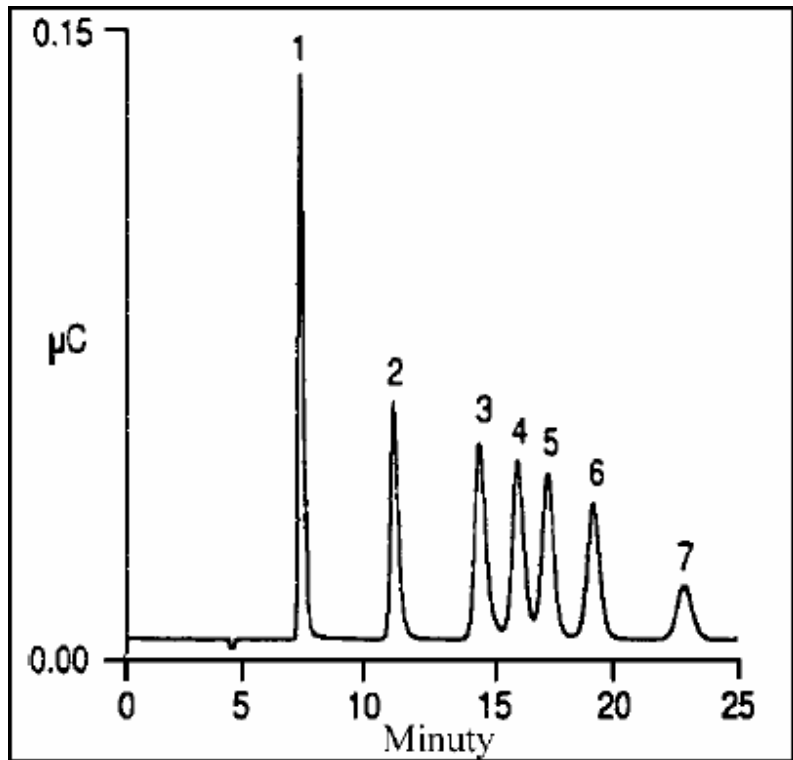


*Katecholoaminy w moczu, kolumna separacyjna: Zorbax C-18, eluent: bufor cytrynianowo/octanowy, 20% metanol, 1% OSA, 10 $\mu$ M EDTA, przepływ 1 ml/min, próbka: 20  $\mu$ l; (1) noradrenalina (2) adrenalina, (3) DHBA (wzorzec wewnętrzny), (4) dopamina, detekcja amperometryczna*

# Wysokosprawną Chromatografia Jonowa - detektory

Wada klasycznej amperometrii - problemy związane ze stopniowym zmniejszaniem się czułości metody. Wiąże się to z osadzaniem na powierzchni elektrody roboczej trwałych produktów reakcji elektrochemicznej.

Rozwiązaniem tego jest zastosowanie zamiast stałego potencjału sekwencji krótkich impulsów potencjału - **amperometrii impulsowej (PAD)** detektor mierzy prąd tylko podczas krótkich przedziałów czasu, w których prawdopodobieństwo wadliwego działania elektrody jest znikome.



Główny obszar zastosowań *amperometrii impulsowej* to analiza cukrów prostych, dwucukrów, polocukrów, glikoprotein, alkoholi, aldehydów, amin, aminokwasów, tioli i tioeterów.

*Rozdział oligo- i monocukrów, kolumna separacyjna: CarboPac MA1 250x4-mm, eluent: 0,6 M NaOH, przepływ 0,4 ml/min, Próbkę:, detekcja amperometria impulsowa*

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

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

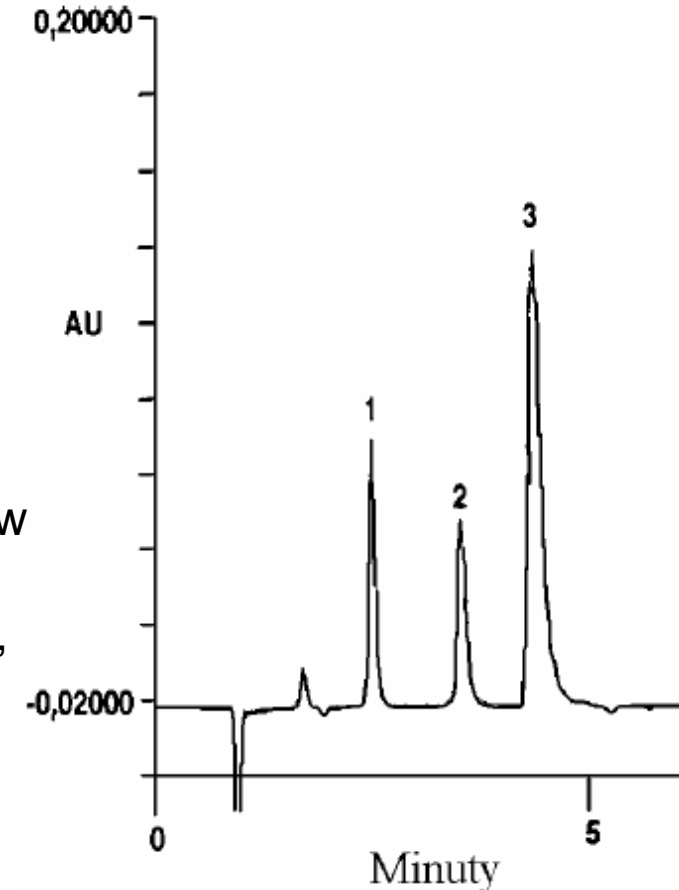
$$\Delta A = (\epsilon_S^x - \frac{x}{y} \epsilon_E^y) \times C_S \times l$$

Bezpośrednia *detekcja absorpcyjna* jonów nieorganicznych jest utrudniona ponieważ nie zawierają one odpowiednich chromoforów. Jony nieorganiczne absorbują zwykle poniżej 220 nm.

Większe możliwości daje technika **derywatywacji 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.

Główne zastosowanie - w oznaczaniu azotanów i azotynów oraz bromków i jodków w wodzie pitnej.

Jest to metoda szczególnie użyteczna gdy oznaczenie prowadzi się w obecności dużych stężeń chlorków i siarczanów.



Rozdział azotanów i azotynów  
HPIC, kolumny: separacyjna. IonPac AS9, ochronna IonPac AG9, eluent:  
1,7 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowa - detektory

- **Detekcja fluorescencyjna** – mierzy intensywność 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.

Poszczególne związki mogą być wzbudzane 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.

Tylko nieliczne jony (np.  $\text{UO}_2^{2+}$ , czy jony obojętne aminokwasu tryptofanu), posiadają naturalną zdolność do fluorescencji, więc wykorzystuje się metodę derywatywacji przed- lub po- kolumnowej w celu uzyskania fluoryzującego analitu.

Dobre wyniki osiągnięto dla oznaczeń polifosforanów, jodków, azotynów, tiosiarczanów, amoniaku, rubidu, cezu, potasu, a także aminokwasów w hydrolizacie białkowym.

- Inne Metody Detekcji:**
- metoda refraktometryczna (pomiaru wsp. załamania światła)
  - absorpcji atomowej i cząsteczkowej
  - detekcja radiometryczna



# Wysokosprawna Chromatografia Jonowykluczająca

Chromatografia wykluczania jest techniką rozdzielania substancji w której wykorzystuje się niejonowy mechanizm sita molekularnego, nazwany też mechanizmem wykluczania molekularnego.

Wykorzystuje się różnicowanie dostępności molekuł do porów o zróżnicowanych średnicach, a w konsekwencji - drogi i czasu dyfuzji cząsteczek o zróżnicowanej wielkości i masie cząsteczkowej, w przestrzeni porów wewnątrz ziaren wypełnienia kolumny.

W odróżnieniu od innych rodzajów chromatografii, w chromatografii żelowej rozdziela się substancje prawie wyłącznie wg rozmiarów ich cząsteczek w roztworze.

Praktyczny zakres stosowania chromatografii wykluczania obejmuje przede wszystkim :

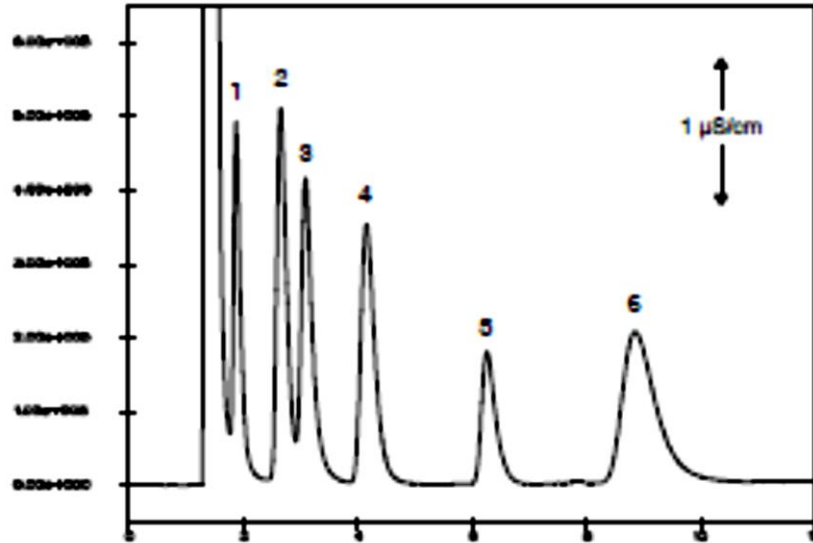
❖ Rozdzielanie względem masy cząsteczkowej mieszanin:

- kopolimerów,
- gumy naturalnej i syntetycznej,
- poliamidów, poliestrów i fluoropolimerów
- asfaltów
- homopolimerów i kopolimerów akrylamidu
- alkoholu i octanu poliwinylowego
- homopolimerów i kopolimerów vinylopirolidonu
- celulozy i jej pochodnych
- białek
- kwasów nukleinowych i innych polimerów

❖ Oznaczanie obecności i zawartości produktów polimeryzacji oraz frakcji wysokomolekularnej (wykluczanej w układzie zastosowanych kolumn) w materiałach niskocząsteczkowych - np. paliwach silnikowych.

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowykluczająca

Flow: 1.0 mL/min  
Injection volume: 100  $\mu$ L  
Full Scale: 5  $\mu$ S/cm  
Polarity: +



Peak	Component	Conc. [mg/L]	t <sub>r</sub> [min]
1	Tartrate	4	1.8
2	Malate	7.5	2.6
3	Citrate	7.5	3.1
4	Lactate	10	4.2
5	Acetate	25	6.3
6	Succinate	40	8.8

## HClO<sub>4</sub> eluent

- **Composition** 1.5 mmol/L perchloric acid; conductivity approx. 300  $\mu$ S/cm
- **Preparation**  
*Concentrate solution*  
0.1 mol/L perchloric acid (ready-to-use solution, available on the market).  
*Ready-to-use eluent*  
Add 15 mL concentrate to 900 mL high purity water and fill up to 1 L with high purity water.
- **Remarks**  
UV detection at 190 nm can also be carried out with this eluent; this has advantages in the determination of tartrate compared with conductivity detection.

## Uwagi ogólne:

- Kolumnę można stosować tylko w systemach bez supresji
- Roztwory próbek muszą być zawsze filtrowane przez filtr membranowy 0,45 mm.
- Ponieważ kationy jednowartościowe są eluowane bardzo późno, a kationy dwuwartościowe nie są eluowane wcale, należy je usunąć za pomocą wymiennicza kationowego przed wstrzyknięciem.
- Do konserwacji kolumny zaleca się użycie prekolumny i tłumika pulsacji

# Wysokosprawna Chromatografia Jonowymienna

## HPICE - *jonowykluczająca*

**KOLUMNY** - Wybór faz stacjonarnych w chromatografii jonowykluczającej jest dość ograniczony i sprowadza się do w pełni sulfonowanych kationitów na bazie kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu.

Służy do rozdzielania szerokiego zakresu małych, obojętnych lub częściowo zjonizowanych cząsteczek, takich jak kwasy karboksylowe, nieorganiczne aniony słabych kwasów, słabe zasady organiczne i woda. Rozdział słabych zasad techniką HPICE nie ma jak dotąd szerszego zastosowania.

**ELUENTY** - Najprostszym eluentem stosowanym w HPICE jest czysta, dejonizowana woda. Woda woda jako eluentu - w pH bliskim obojętnego spora część słabych kwasów i zasad jest całkiem dobrze zdysocjowana. Woda w pH zbliżonym do obojętnego obecnie jest stosowana głównie w oznaczaniu węglanów.

Do rozdziału kwasów organicznych stosuje się rozcieńczone roztwory kwasów mineralnych solnego, siarkowego, a także perfluoroheptanowego i oktanosulfonowego, w zależności od metody detekcji i używanego rodzaju supresora.



# Chromatografia Par Jonowych MPIC

Zgodnie z modelem *tworzenia par jonowych*, jony substancji oznaczanej X oddziałują z lipofilowymi jonami L (stanowiącymi składnik eluentu) tworząc kompleks XL – obojętny.

**KOLUMNY** - standardowe kolumny z odwróconą fazą. Zbudowane z neutralnych, hydrofobowych kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu oraz tzw. *faz związanych* oktadecylosilanowych, opartych na matrycy krzemionkowej.

Wybrana faza stacjonarna w zależności od używanej fazy ciekłej może być wykorzystana zarówno do rozdzielania anionów jak i kationów.

**ELUENTY** - dwa główne składniki to *bufor* i *rozpuszczalnik organiczny* oraz dodawany *reagent* dzięki któremu powstają pary jonowe.

Dla uzyskania odpowiedniego rozdzielania zmienia się rodzaj i stężenie każdego z tych składników.

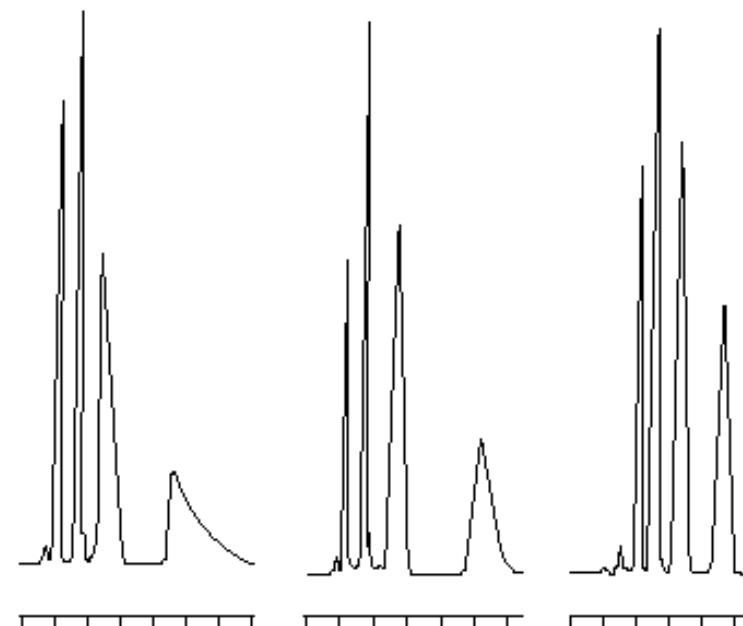
# Chromatografia Par Jonowych MPIC

W chromatografii z odwróconymi fazami związki jonowe zwykle nie są zatrzymywane przez hydrofobową fazę stacjonarną.

Dodając odczynnik **L** w postaci pary jonowej z końcem jonowym i hydrofobowym ogonem do fazy ruchomej, hydrofobowy ogon odczynnika zostaje zatrzymany przez fazę stacjonarną.

W ten sposób na powierzchni fazy stacjonarnej tworzy się grupa jonowymienna.

Próbki wymieniają jony z przeciwnym pary jonowej reagenta zatrzymywanej przez fazę stacjonarną, co skutkuje większą retencją próbki.



*Efekt hydrofobowości reagentów  
i stężenia modyfikatora organicznego  
w rozdziale alkilosulfonianów MPIC*

Jony hydrofilowe są najlepiej rozdzielane z użyciem reagentów hydrofobowych, a anality hydrofobowe z użyciem reagentów hydrofilowych.

O selektywności rozdziału chromatograficznego decyduje przede wszystkim faza ruchoma.

# Chromatografia Jonowa - chromatogram

**Chromatogram** - graficzna reprezentacja sygnału chromatograficznego.

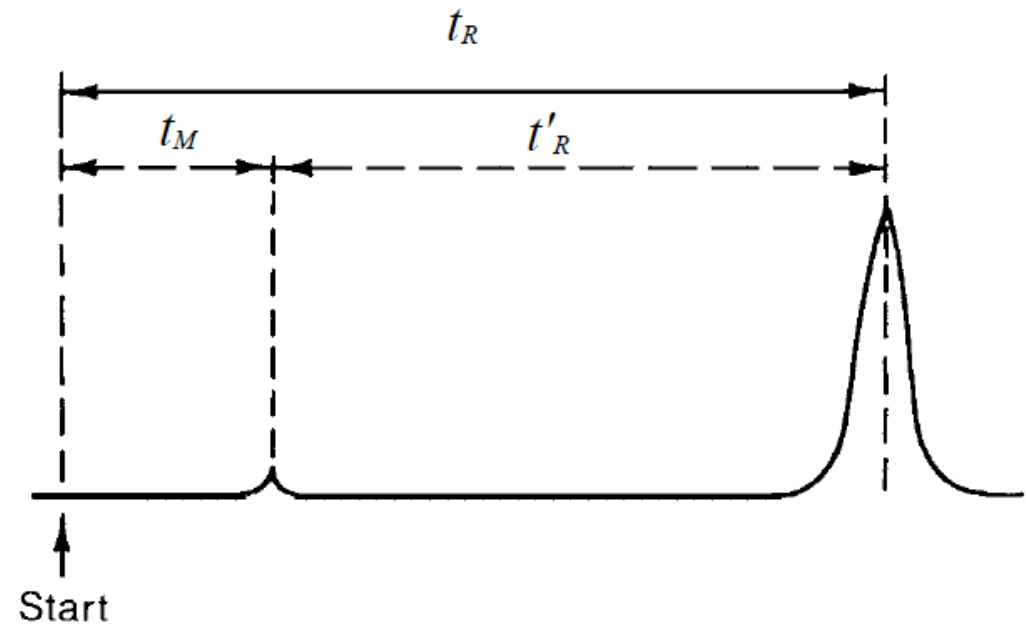
Składniki mieszaniny chromatografowanej, opuszczając kolumnę, są kolejno wykrywane przez detektor, a odpowiadające im pliki są rejestrowane w postaci chromatogramu.

Substancje są rozdzielane na kolumnie chromatograficznej jeśli różnią się między sobą czasem przebywania w kolumnie.

**Całkowity czas retencji  $t_R$**  - czas upływający od zadozowania, po którym pojawia się maksimum piku składnika

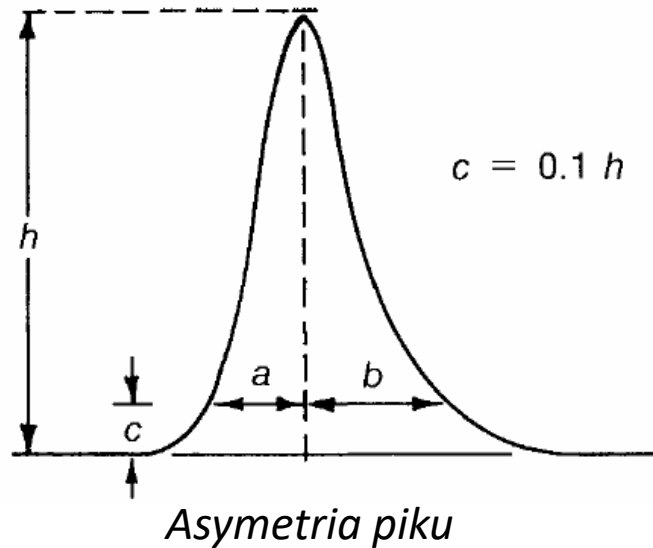
**czasem martwym retencji  $t_M$**  - czas retencji substancji niezatrzymywanej przez kolumnę,

**zredukowany czas retencji  $t'_R$**  - różnica pomiędzy całkowitym czasem retencji a czasem martwym retencji.



*Parametry retencji*

# Chromatografia Jonowa - chromatogram



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

$$A_S = b/a$$

Za *ogonowanie* odpowiadają głównie procesy adsorpcyjne.

Gdy  $A_S$  jest mniejsze od jednościci nazywany **jest rozmyciem przedniej części piku** (*fronting*) - faza stacjonarna nie zawiera dostatecznej ilości centrów adsorpcyjnych, stąd część jonów próbki pomija centrum piku.

Wymagane aby **A wynosiło od 0,9 do 1,2.**

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.

# Chromatografia Jonowa - chromatogram

**Parametry Jakości Rozdziału Chromatograficznego** – odpowiedniej rozdzielczości to jest zdolności do oddzielenia składnika A od składnika B w procesie analizy.

**Stosunek podziału składnika** chromatografowanego między fazę stacjonarną i ruchomą  $k'$ .

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

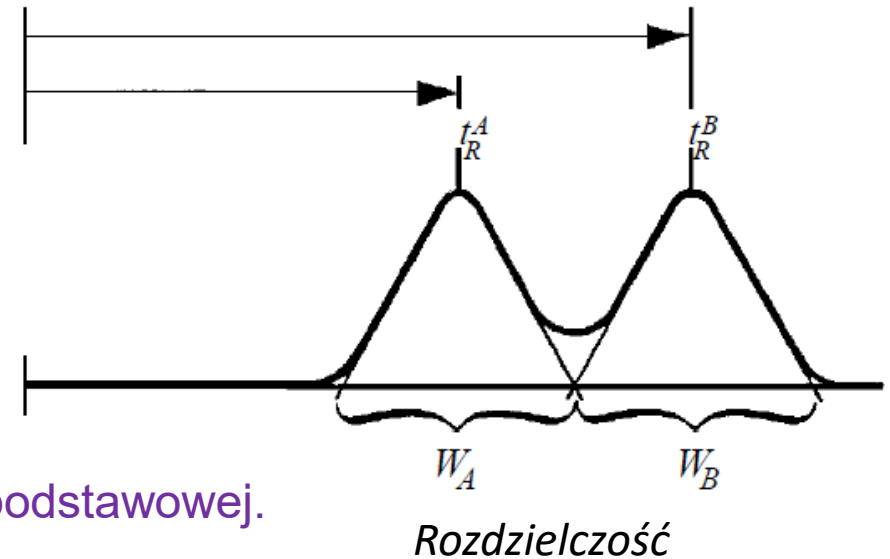
Wielkością, którą można bardzo łatwo wyznaczyć, a która zależy między innymi od rodzaju rozdzielanych substancji i od rodzaju fazy stacjonarnej, jest **retencja względna  $\alpha$  (selektywność)** = stosunek retencji dwu, zwykle trudno rozdzielających się substancji. Im bardziej  $\alpha$  jest różne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

**Rozdzielczość  $R$**  - jest zwykle definiowana jako *odległość pomiędzy maksymami pików* podzielona przez średnią szerokość podstawy tych pików.

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

Piki są lepiej rozdzielone im większa jest wartość  $R$ .

Gdy  $R$  jest równa lub większa od 1,5, piki są rozdzielone do linii podstawowej.



# Chromatografia Jonowa - chromatogram

## Analiza jakościowa

Parametry retencji (*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.

## Analiza ilościowa

Zawartość składnika w próbce oblicza się wykorzystując to, że ilość tego składnika jest proporcjonalna do powierzchni lub wysokości jego pików (piki symetryczne!!).

W celu analizy ilościowej wyników **metodą wzorca zewnętrznego** (tzw. kalibracji bezwzględnej), dozuje się ściśle określone ilości analitu (przy stałej objętości pętli dozowniczej są to próbki o ściśle określonym stężeniu).

Zmierzone wartości pola pików substancji wykreśla się w funkcji stężenia zadozowanej substancji.

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.

# Chromatografia Jonowa - chromatogram

*Substancja wzorcowa* powinna spełniać następujące warunki:

1. być czysta i chemicznie stabilna w danych warunkach pomiarowych,
2. eluować w pobliżu substancji oznaczanej,
3. jej pik powinien rozdzielać się aż do linii bazowej od pików sąsiednich,
4. mieć podobny stosunek odpowiedzi detektora do stężenia jak substancja oznaczana.

**Metodę dodatku substancji oznaczanej** stosuje się gdy występują problemy z rozdzieleniem sygnału badanego od sygnałów wnoszonych przez inne składniki mieszaniny.

Wykonanie oznaczenia polega na chromatografowaniu próbki badanej i próbki z dodaną dokładnie znaną ilością danego związku, w takich samych warunkach pomiarowych. Na chromatogramie mierzy się przyrost pola powierzchni piku odpowiadający dodanej ilości związku.



Dziękuję za uwagę



Zasada działania:

<https://www.youtube.com/watch?v=lp40a7mtc4E>

HPIEC:

<https://www.youtube.com/watch?v=FJ0wQyrd6Yk>