

Chromatografia jonowa (materiały do ćwiczeń)



autor: mgr inż. Aleksander Astel

Gdańsk, październik 2002

Składam Prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi serdeczne podziękowania za cenne uwagi oraz czas poświęcony na niezbędne konsultacje na etapie przygotowania niniejszego opracowania.

1. Wprowadzenie

Techniki chromatograficzne są powszechnie wykorzystywane w badaniach środowiskowych. Związane to jest z koniecznością rozdzielania skomplikowanych mieszanin na poszczególne składniki i ich ilościowego oznaczania z wykorzystaniem odpowiedniego detektora (uniwersalnego lub też specyficznego). Istnieje bardzo duże zróżnicowanie technik chromatograficznych. Najbardziej ogólny podział wygląda następująco:

- chromatografia gazowa
- chromatografia cieczowa
- chromatografia planarna
- chromatografia jonowa
- chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym.

Należy podkreślić, że w ciągu ostatnich lat wzrasta zainteresowanie techniką chromatografii jonowej. Jest ona szeroko stosowana do oznaczania zawartości związków nieorganicznych w różnych matrycach do których zaliczyć można:

- wody (opadowe, rzeczne, gruntowe, deszczowe, morskie, poreaktorowe, odpadowe, pitne itp.);
- wina, napoje chłodzące, piwa, żywność;
- próbki powietrza;
- roztwory wodne kwasów, ług sodowy oraz roztwory soli.

Stosując technikę chromatografii jonowej można także oznaczać liczne związki organiczne (kwasy tłuszczowe, cukry proste i dwucukry, kwasy organiczne, cholina, acetylocholina) w płynach ustrojowych, sokach, melasie, roztworach farmaceutyków.

Chromatografia jonowa jest techniką analityczną opartą na wykorzystaniu różnych procesów na etapie rozdzielania mieszaniny oraz detekcji w celu oznaczenia indywidualów jonowych w zakresie stężeń od $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ do mg/dm^3 .

We wszystkich przypadkach rozdzielanie w chromatografii jonowej odbywa się z wykorzystaniem różnic w położeniu równowagi podziału składników próbki pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną.

Technikę chromatografii jonowej można klasyfikować według następujących kryteriów:

- sposób separacji składnika oznaczanego;
- rodzaj materiału wypełnienia kolumny;
- zdolność wymienną kolumny;
- mechanizm wymiany.

Zastosowanie określonego mechanizmu wymiany wymusza wyodrębnienie w zakresie chromatografii jonowej trzech modyfikacji:

- **Wysokosprawna Chromatografia Jonowa (lub Jonowymienna) (High Performance Ion Chromatography – HPIC);**
- **Wysokosprawna Chromatografia Jonowykluczająca (High Performance Ion Chromatography Exclusion - HPICE)**
- **Chromatografia Par Jonowych (Ion Par Chromatography,)**

Chromatografia jonowa jest typem chromatografii, w której stosuje się wysokosprawne kolumny chromatograficzne wypełnione jednorodnymi żywicami o małych cząsteczkach. Na etapie detekcji najczęściej wykorzystuje się technikę konduktometryczną. **Według terminologii IUPAC nie istnieje podział na chromatografię jonową i jonowymienną**

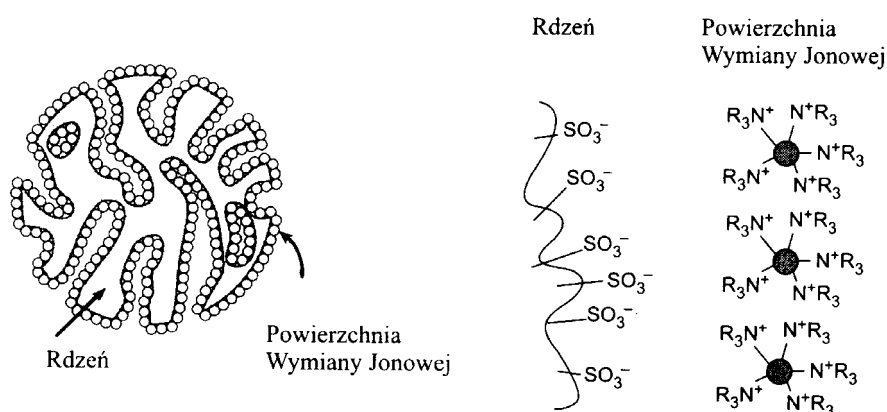
(w podręcznikach starszej generacji często spotyka się podział tej techniki na chromatografię jonowymienną oraz jonową oraz różnice pomiędzy tymi modyfikacjami).

Tabela 1. Podstawowe cechy chromatografii jonowej!

1.	Możliwość stosowania eluentów o niskich stężeniach (0,1-10 mM)
2.	Możliwość jednoczesnego oznaczania mieszaniny różnych jonów (kationów lub anionów)
4.	Konieczność stosowania kolumny tłumienia
5.	Możliwość wykonywania szybkich i precyzyjnych oznaczeń
6.	Możliwość stosowania uniwersalnego detektora konduktometrycznego
7.	Ograniczenia działania detektora związane z przewodnictwem jonów

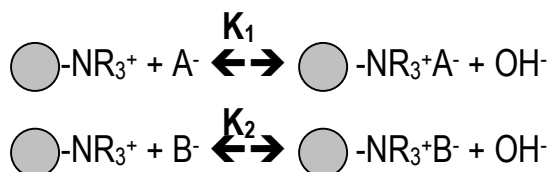
Podstawy teoretyczne chromatografii jonowej

We współczesnej chromatografii jonowej (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. Zasada rozdzielania opiera się na oddziaływaniach pomiędzy przeciwjonami a powierzchnią wymiany jonowej. Gdy przeciwjon na powierzchni wymiany zostanie zastąpiony przez jon substancji zdysocjowanej w roztworze, ten ostatni jest czasowo zatrzymywany przez jony związane. Rozdzielane jony różnią się między sobą czasem przebywania wewnątrz kolumny, wynikającym z różnego stopnia powinowactwa jonu do fazy stacjonarnej, co jest bezpośrednią przyczyną rozdzielania.



Rys. 1 Przykład wypełnienia kolumny do HPIC anionów.

Na przykład jeśli przez kolumnę wypełnioną wymiennicem 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:



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

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

gdzie:

$[X^-]_{M,S}$ oznacza stężenie jonu próbki odpowiednio w fazie ruchomej (M – mobility) i stacjonarnej (S – stationary)

$[OH^-]_{M,S}$ – stężenie jonu hydroksylowego odpowiednio w fazie ruchomej (M) i stacjonarnej (S).

Współczynniki selektywności (i czasy retencji) dla anionów rozdzielanych na najczęściej stosowanym, silnie zasadowym anionicie można uszeregować w następującym porządku rosnącym: $OH^- < F^- < ClO_3^- < BrO_3^- < HCOO^- < IO_3^- < CH_3COO^- < H_2PO_4^- < HCO_3^- < Cl^- < CN^- < NO_2^- < Br^- < NO_3^- < HPO_4^{2-} < SO_3^{2-} < SO_4^{2-} < C_2O_4^{2-} < CrO_4^{2-} < MoO_4^{2-} < WO_4^{2-} < S_2O_3^{2-} < I^- < SCN^- < ClO_4^- < \text{salicynian} < \text{cytrynian}$.

Dla kationów rozdzielanych na silnie kwasowym kationicie porządek ten przedstawia się następująco:

$Li^+ < H^+ < Na^+ < NH_4^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Ag^+ < Tl^+ < UO_2^{2+} < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Ni^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Pb^{2+} < Ba^{2+} < Al^{3+} < Sc^{3+} < Y^{3+} < Eu^{3+} < Pr^{3+} < Ce^{3+} < La^{3+} < Pu^{4+}$.

W oparciu o współczynnik selektywności można oszacować efektywność jonu jako eluentu. Jako elenty najczęściej stosuje się roztwory substancji, których jony charakteryzuje duży współczynnik selektywności, gdyż nawet w formie roztworów rozcieńczonych wykazują dużą siłę elucji. Wybierając eluent należy generalnie kierować się zasadą, że współczynniki selektywności jonu eluentu i jonu próbki powinny mieć porównywalne wielkości. Gdy jony z 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:

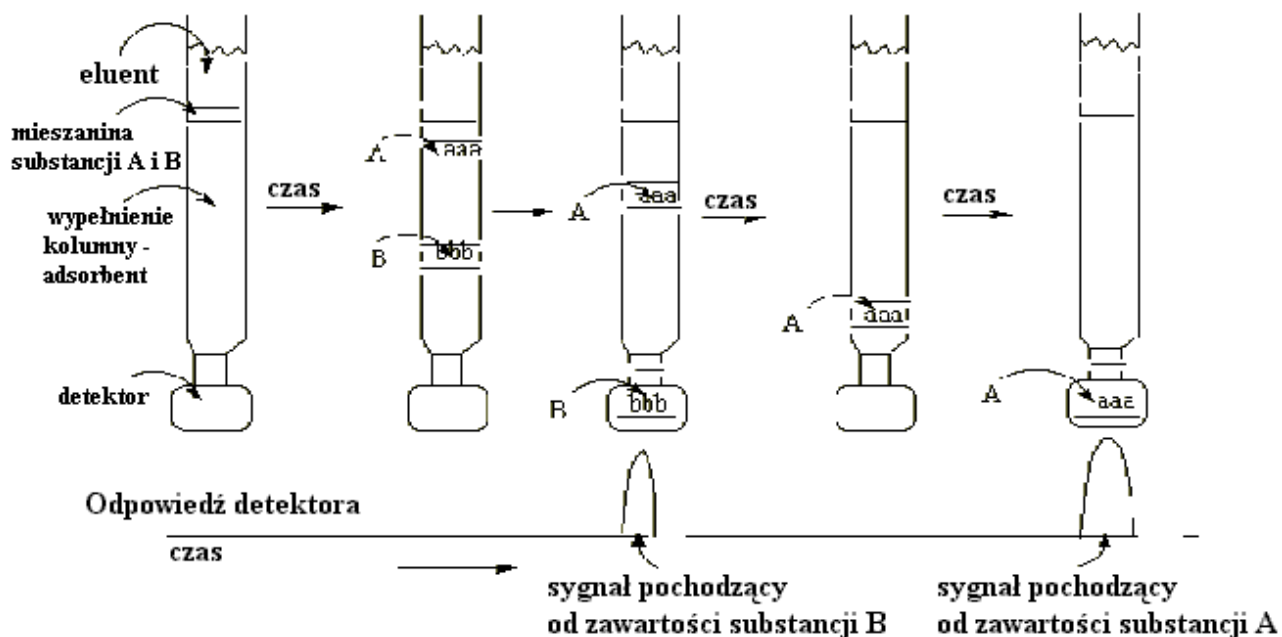
$$\lambda = \frac{[X^-]_S}{[X^-]_M}$$

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

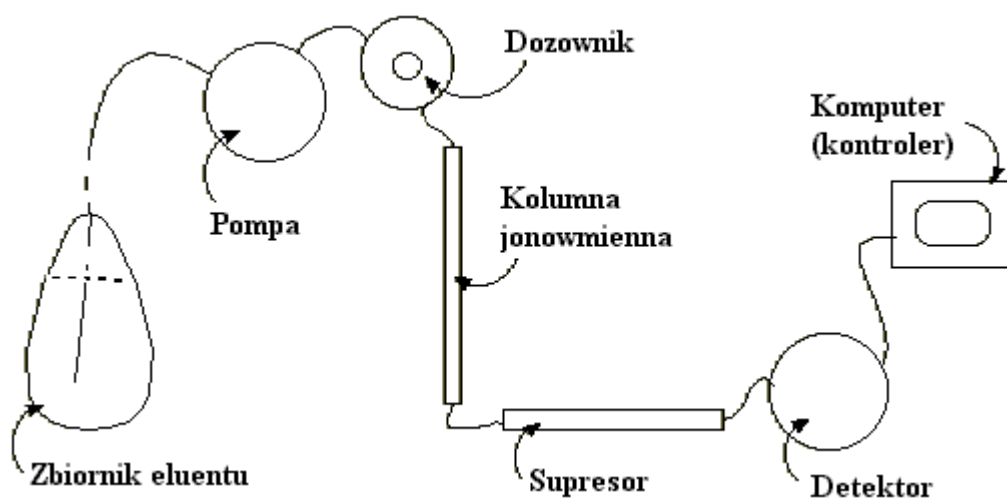
$$k' = \lambda * \frac{m_R}{V_S}$$

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

Na rys. 2 przedstawiono schematycznie proces rozdzielania chromatograficznego mieszaniny dwóch analitów.



Komercyjne układy chromatografii jonowej są dostępne na rynku od kilkunastu lat. Przykładowy układ chromatograficzny przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Schemat blokowy zestawu do chromatografii jonowej.

Kolumny używane w chromatografii jonowej

Stosowane w chromatografii jonowej (HPIC) fazy stałe (jonity) to prawie wyłącznie żywice syntetyczne. Są to stosunkowo obojętne, porowate materiały polimerowe stanowiące rdzeń (szkielet, osnowę), do którego przyłączone są aktywne grupy jonowymienne. Grupy te mogą być silnie lub słabo zasadowe lub kwasowe a także mieszane.

Tabela 2. Rodzaje jonitów

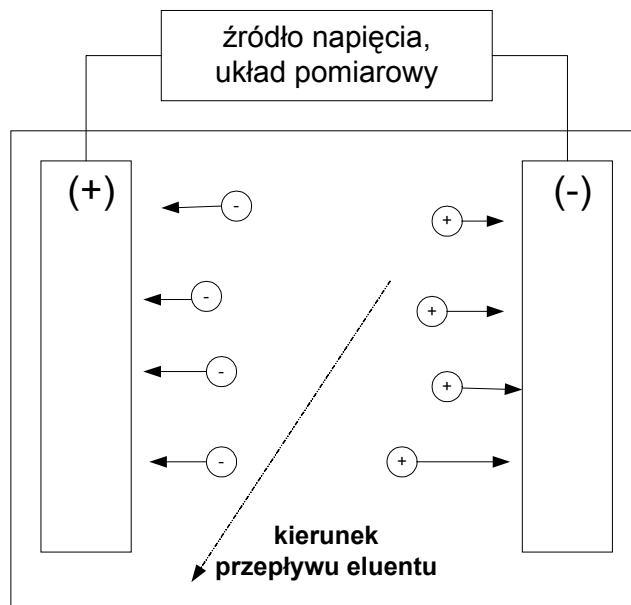
Jonit	Grupa jonowymienna
<u>Anionity</u> <ul style="list-style-type: none"> - silnie zasadowe - średnio i słabo zasadowe 	$-N^+(CH_3)_3$ $-N^+(CH_3)C_2H_4OH$ $-NH_2, =NH, -N, -N^+R_3$
<u>Kationity</u> <ul style="list-style-type: none"> - silnie kwasowe - średnio kwasowe - słabo kwasowe - bardzo słabo kwasowe 	$-SO_3^-$ $-PO_3^{2-}$ $-COO^-$ $-CH_2N(CH_2COO^-)$ $-OH$
<u>Amfoteryczne</u>	$-COO^-$ i $-N^+(CH_3)_3$

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 μ l. W większości przypadków o wyborze detektora decyduje rodzaj metody rozdzielania 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 od właściwości będących w dużym nadmiarze jonów eluentu. Jeśli ten warunek jest spełniony można niekiedy mówić o selektywności a nawet specyficzności detektora. Znacznie częściej jednak mamy do czynienia z technikami 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*.

❖ Detekcja konduktometryczna

Detekcja konduktometryczna (przewodnictwa jonowego) jest najbardziej uniwersalną metodą stosowaną w 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 detektorze konduktometrycznym wykorzystuje się zdolność roztworów elektrolitów umieszczonych w polu elektrycznym powstającym pomiędzy dwoma elektrodami przepływowego naczynka konduktometrycznego (schematycznie przedstawiona na rys. 4) do przewodzenia prądu na skutek transportu jonów.



Rys. 4. Schemat ideowy przepływowego naczynka konduktometrycznego.

Natężenie prądu płynącego przez zawarty między elektrodami słup elektrolitu opisuje, zgodnie z prawem Ohma równanie:

$$i = \frac{U}{R}$$

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

- ❑ Detekcja elektrochemiczna
- ❑ Detekcja absorpcyjna
- ❑ Detekcja fluorescencyjna
- ❑ Detekcja refraktometryczna

Eluenty stosowane w chromatografii jonowej

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

- ❑ stosowane w technice z detekcją konduktometryczną i *chemicznym* tłumieniem przewodnictwa eluentu; (supresją) przewodnictwa eluentu;
- ❑ stosowane w technice z detekcją konduktometryczną i *elektryczną* kompensacją przewodnictwa eluentu.

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

W procesie rozdzielania anionów metodą wysokosprawnej chromatografii jonowej z wykorzystaniem detektora konduktometrycznego z *chemicznym* tłumieniem przewodnictwa najczęściej jako eluenty stosuje się sole słabych kwasów (w tym aminokwasów). Jony

eluentu są wówczas protonowane podczas supresji. Powstające w tym procesie 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 ($\text{pH}(\text{eluntu}) > \text{pK}_a(\text{najsłabiej dysocjującego składnika próbki})$).

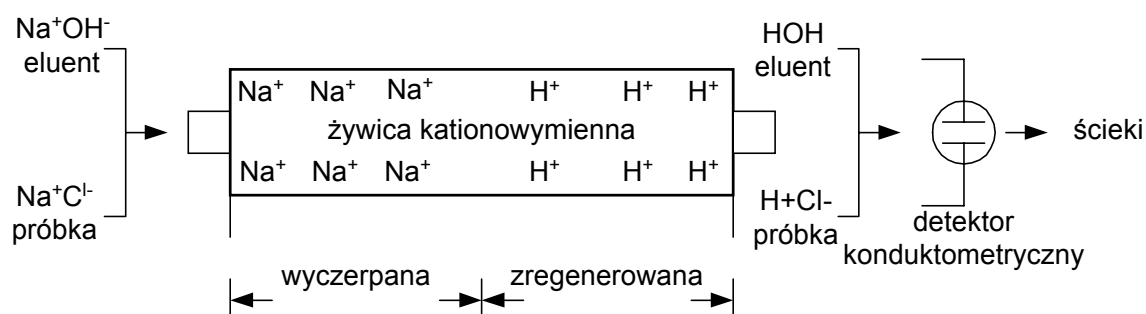
Tabela 3. Przykłady eluentów stosowanych w procesie rozdzielania anionów przy użyciu techniki chromatografii jonowej z detekcją konduktometryczną i chemicznym tłumieniem przewodnictwa eluentu .

Eluent	Jon eluentu	Produkt supresji	Siła elucji
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	$[\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$	Silny
$\text{RNHCH(R')SO}_3\text{H/NaOH}$	$\text{RNHCH(R')SO}_3^{2-}$	$\text{RNH}_2^+ \text{CH(R')SO}_3^{2-}$	Dość silny
$\text{H}_2\text{NCH(R)CO}_2\text{H/NaOH}$	$\text{H}_2\text{NCH(R)CO}_2^-$	$\text{H}_3\text{N}^+ \text{CH(R)CO}_2^-$	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
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	B_4O_7^-	H_3BO_3	Bardzo słaby

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).

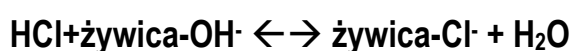
Problem ten rozwiązano poprzez zastosowanie drugiej, specjalnej kolumny (*kolumny tłumienia*) umieszczonej po kolumnie analitycznej. W kolumnie tej, wypełnionej silnie kwasową żywicą kationowymienną, następuje wymiana kationu eluentu na jon wodorowy. Składniki eluentu opuszczają kolumnę tłumienia w postaci 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. Proces schematycznie przedstawiono na rys. 5.



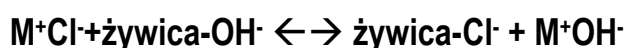
Przykład reakcji tłumienia w przypadku oznaczania jonów Na⁺, NH₄⁺ i K⁺.

Eluent (rozcieńczony roztwór HCl) przepompowuje się przez kolumnę analityczną. Kolumna jest wypełniona sulfonowaną żywicą kationową, której przeciwjon jest wymieniany na jony Na⁺, NH₄⁺ i K⁺. Próbkę zawierającą w/w trzy rodzaje jonów jest wstrzykiwana na szczyt kolumny. Po rozdzieleniu na żywicy jonowymiennej jony osiągają wylot kolumny w różnych czasach retencji na tle HCl. Gdy analizowana mieszanina osiągnie drugą kolumnę (tłumienia), która zawiera silnie zasadową żywicę jonowymienną z grupami OH⁻, zachodzą dwie reakcje opisane równaniami:

HCl reaguje z żywicą:

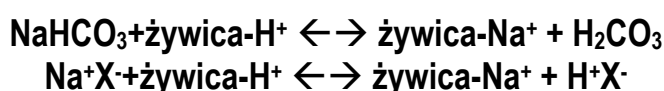


sole metali alkalicznych reagują do odpowiednich wodorotlenków:



A zatem jony, które dochodzą do celki konduktometrycznej pochodzą od całkowicie zdysocjowanych wodorotlenków na tle zdemineralizowanej wody.

Do analizy anionów z eluentem w postaci NaHCO₃ stosuje się silnie zasadowe żywice jonowymienne w formie HCO₃⁻ umieszczone w kolumnie analitycznej oraz silnie kwasowe żywice w formie H⁺ w kolumnie tłumienia. W tym przypadku jony sodowe eluentu są wymieniane z jonami H⁺ w kolumnie tłumienia tak, że przechodzi przez celkę konduktometryczną jako H₂CO₃ – słabo zdysocjowany kwas o niskim przewodnictwie właściwym. Natomiast aniony próbki są obecne w postaci silnie zdysocjowanych kwasów mineralnych. Reakcje te przebiegają następująco:



Ponieważ kolumna tłumienia zatrzymuje jony eluentu musi być okresowo regenerowana.

Zalety chromatografii jonowej

Do podstawowych zalet chromatografii jonowej zaliczyć można:

- możliwość oznaczania kilkunastu anionów w próbce;
- stosunkowo krótki czas analizy;
- wykrywalność na poziomie ppb lub niższym;
- niewielka ilość próbki potrzebna do analizy;
- możliwość stosowania różnych detektorów;
- prosty sposób przygotowania próbki;
- możliwość jednoczesnego oznaczania kationów i anionów lub jonów nieorganicznych i organicznych;
- wysoka selektywność oznaczanych substancji w próbkach o złożonej matrycy.

Plan zajęć:

- 1) wykonanie roztworów wzorcowych wybranych anionów
- 2) wykonanie nastrzyku mieszaniny wzorcowej
- 3) wykonanie identyfikacji pików uzyskanych w procesie rozdzielania chromatograficznego
- 4) wykonanie analizy wody opadowej na obecność wybranych anionów
- 5) wykonanie identyfikacji pików uzyskanych w procesie rozdzielania chromatograficznego próbki wody opadowej
- 6) wyznaczenie ilościowe analitów zawartych w próbkach wody opadowej na podstawie znanej zawartości analitów w roztworze wzorcowym

Raport

- tytuł kursu i ćwiczenia
- data wykonania ćwiczenia
- autorzy
- cel doświadczenia
- opis procedury analitycznej
- opis aparatury
- opis sposobu wyznaczenia stężeń analitów w próbce rzeczywistej /procedura obliczeń/
- oszacowanie niepewności wyników
- wnioski /wraz z opisem źródeł ewentualnych błędów/

Raport należy złożyć *najdalej w okresie 7 dni od wykonania ćwiczenia.*

Ocena końcowa – zaliczenie wykonania ćwiczenia

50% - sprawdzian

25% - sprawozdanie

25% - aktywność na zajęciach

Literatura:

- 1) D.Pogocki, Wstęp do chromatografii jonowej, Materiały szkoleniowe A.G.A. Analytical http://www.ichtj.waw.pl/ichtj/dep_07/pulse.lab/pogo/personal/pogocki.htm
- 2) J.Siepak, Zastosowania chromatografii jonowej w analizie wody, Wydawnictwo Uniwersytetu im. A.Mickiewicza, Poznań, 1999
- 3) C.F.Poole, Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991
- 4) S.Takayuki, Chromatographic analysis of environmental and food toxicants, Marcel Dekker, New York, 1998
- 5) R.Kuldree, Computerized sampling in ion chromatography and in capillary electrophoresis, TTU Press, Tallinn, 1999
- 6) B.K.Głód, Chromatografia jonowo-wykluczająca: teoria procesu, wpływ parametrów fizykochemicznych i aplikacje, Wydawnictwo Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, 1997