

HPLC i Jonska hromatografija: principi i primena

Dr Ljubiša Ignjatović
Fakultet za fizičku hemiju, Beograd



Sadržaj

Šta je hromatografija?

- O istoriji i fizičkoj hemiji hromatografije

Gde se hromatografija “dešava”?

- Od jonske izmene do jonskih parova

Koji detektori mogu da se koriste?

- Od voltometrije do konduktometrije

Šta je jonska hromatografija sa supresijom?

- Od visoke do niske osnovne provodljivosti

Hromatografija

- Od početnika do eksperta

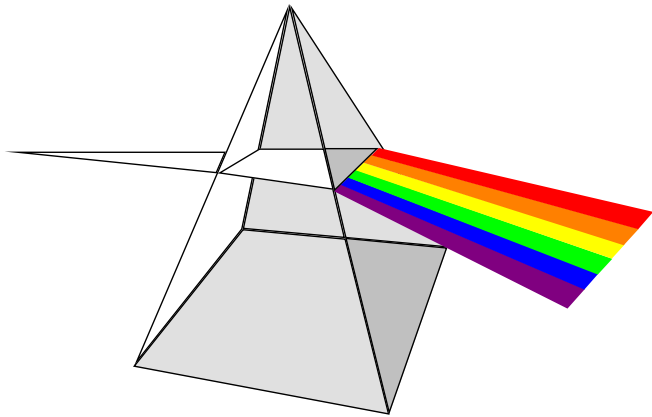


Istorija: M. Cvet, 1903. godine

Razdvajanje obojenih pigmenata biljnih ekstrakata na koloni od CaCO_3

Definicija

«Analitička metoda gde se smeša supstanci koje se javljaju samo u jednoj boji razdvajaju na način da različite boje postaju vidljive. Metoda se koristi za razdvajanje hemijskih supstanci koje su hemijski vrlo slične i teško razdvojive»



Grčki

chroma = boja

graphein = pisati

•HROMATOGRAFIJA



Hromatografija obuhvata više različitih grupa metoda koje omogućavaju razdvajanje, izolovanje, indentifikaciju i određivanje komponenti u smeši. Komponente smeše se razdvajaju na osnovu različitih koeficijenata raspodele između POKRETNE (mobilne) i NEPOKRETNE (stacionarne)faze

Pokretna faza može biti: gas ili tečnost,
a nepokretna: tečnost na nekom čvrstom nosaču, adsorpcioni sloj na površini čvrste faze ili jonoizmenjivač.

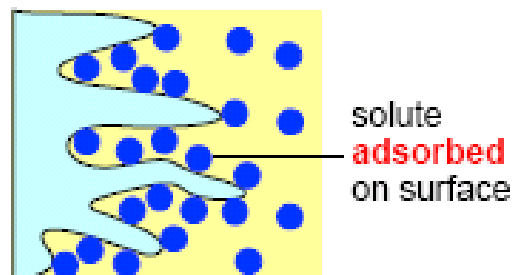
•KLASIFIKACIJA HROMATOGRAFSKIH METODA

IC IC IC^{IC}
IC IC

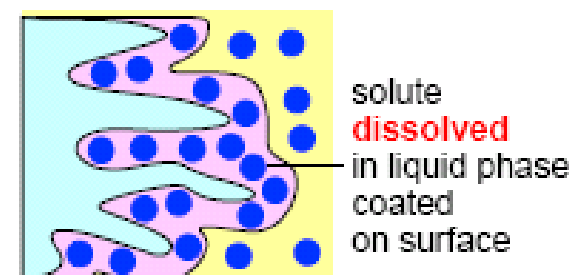
- Podela hromatografskih metoda se može izvršiti na više načina:
- Opšta klasifikacija ili klasifikacija prema načinu smeštanja stacionarne faze:
 - PLANARNA (Tankoslojna (TLC), Papirna (PC), Elektrohromatografija)
 - NA KOLONI (Gasna (GC), Tečna (LC))
- Prema fizičkoj prirodi mobilne i stacionarne faze:
 - Tečno - tečno
 - Tečno - čvrsto
 - Gas - tečno
 - Gas - čvrsto
 - Tečna hromatografija
 - Gasna hromatografija

Prema fizičko-hemijskom procesu na granici faza:

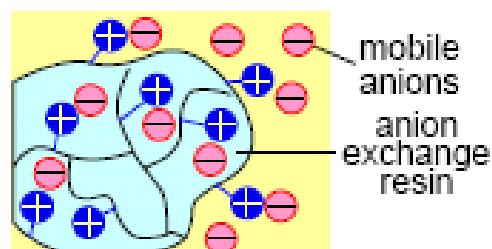
- Adsorpciona (adsorpcija)
- Particiona (rastvaranje)
- Jonoizmenjivačka (jonska izmena)
- Ekskluziona (isključivanja na osnovu veličine molekula)
- Afinitetna (stvaranje kompleksa)



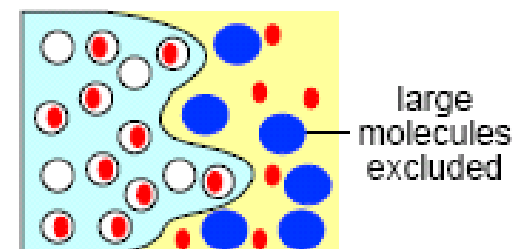
Adsorption Chromatography



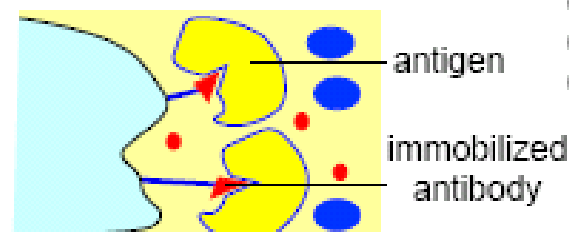
Partition Chromatography



Ion-Exchange Chromatography



Molecular Exclusion Chromatography
Gel Permeation Chromatography
Gel-Filtration Chromatography
Gel Chromatography



Affinity Chromatography

- **Prema načinu pomeranja faza:**

- Eluirajuća
- Frontalna
- Istiskujuća

- **Prema cilju:**

- Analitička (kvalitativna i kvantitativna)
- Preparativna (izdvajanje čiste supstance u većoj količini)

- **Tečna hromatografija** je varijanta hromatografije čija je pokretna faza tečna, a nepokretna faza može biti granulovana čvrsta faza ili tečnost nanešena na granule čvrstog nosača (nerastvorna u tečnosti koja predstavlja mobilnu fazu).
- Za razliku od gasne hromatografije koja zahteva da uzorak bude u stanju gasa ili pare, tj. da su temperature daleko iznad sobne, tečna hromatografija se izvodi uglavnom u oblasti sobne temperature, tj. mogu se analizirati i termički nestabilne supstance (npr. organske supstance biološkog porekla i značaja).

• VISOKOPERFORMANSNA TEČNA HROMATOGRAFIJA

- Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (high pressure liquid chromatography) ili tečna hromatografija visoke efikasnosti (high performance liquid chromatography - HPLC) je tečno-hromatografska tehnika u kojoj se tečnost kroz kolonu proteruje pod pritiskom do 400 bara, pa i većim.
- Analize sa različitim parovima pokretna/nepokretna faza se izvode jednim jedinstvenim uređajem koji omogućuje kontinualnu promenu hemijskog sastava pokretne faze u cilju poboljšanja separacije, priključivanje raznih tipova detektora i pumpi, automatsko upravljanje postupkom od uzimanja uzorka do registracije hromatograma i obrade podataka.

• TIPOVI HPLC

IC IC IC^{IC}
IC IC

Četiri osnovna tipa HPLC su sledeća:

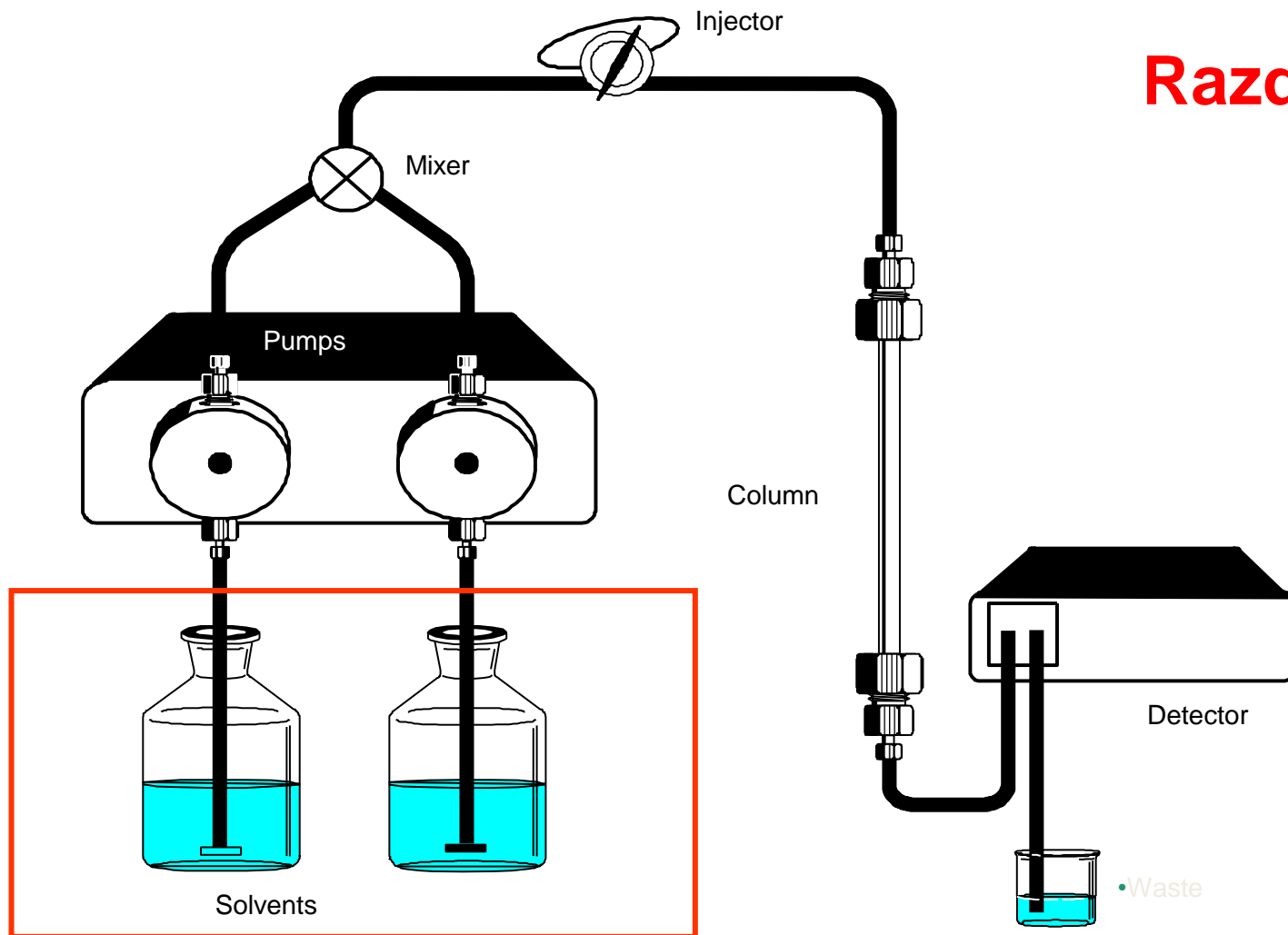
- Hromatografija pomoću jonskih izmenjivača
- Tečno-čvrsta (adsorpciona) hromatografija
- Tečno-tečna hromatografija
- Hromatografija istiskivanja (isključenja) po veličini (SEC, GPC)

Ovi tipovi reprezentuju četiri posebna mehanizma interakcije molekula uzorka sa stacionarnom fazom. Razlike između ovih tipova hromatografije leže u osnovi u različitim kolonama koje se koriste.

- Uređaj za visokoperformansnu tečnu hromatografiju sastoji se iz:
 - rezervoara za mobilnu fazu, pumpe, injektora, kolone, detektora, termostata za kolonu i detektor, uređaja za registrovanje i obradu podataka.
- Protok tečne faze kroz kolonu, koja je termostatirana obezbeđuje pumpa koja proizvodi visoki pritisak. Tečna faza, nakon injektiranja uzorka, po izlasku iz kolone, protiče kroz odgovarajući osetljivi detektor čiji je odziv srazmeran koncentraciji supstance. Odziv detektora se prevodi u odgovarajući naponski signal koji se automatski beleži.

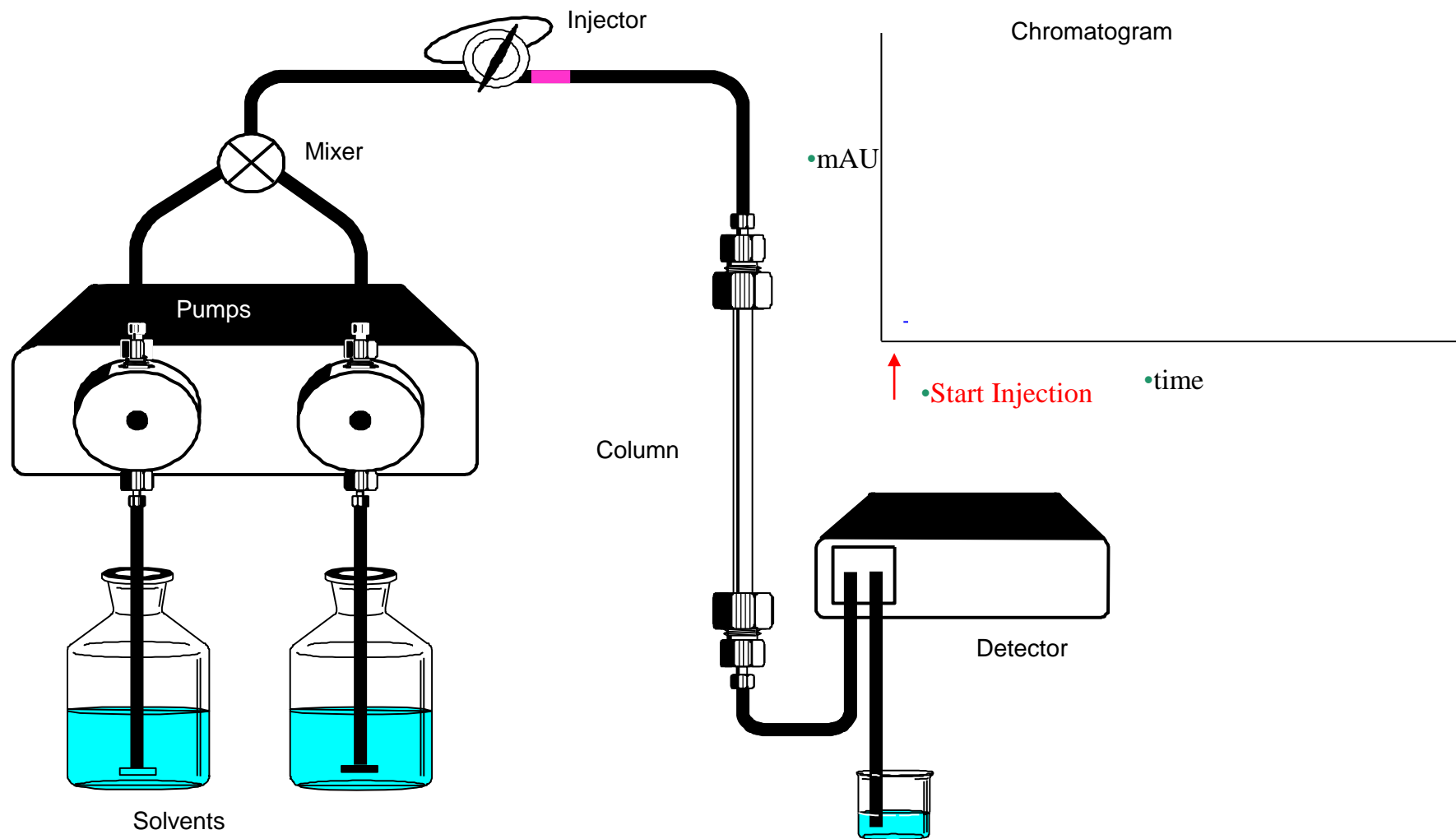


Razdvajanje



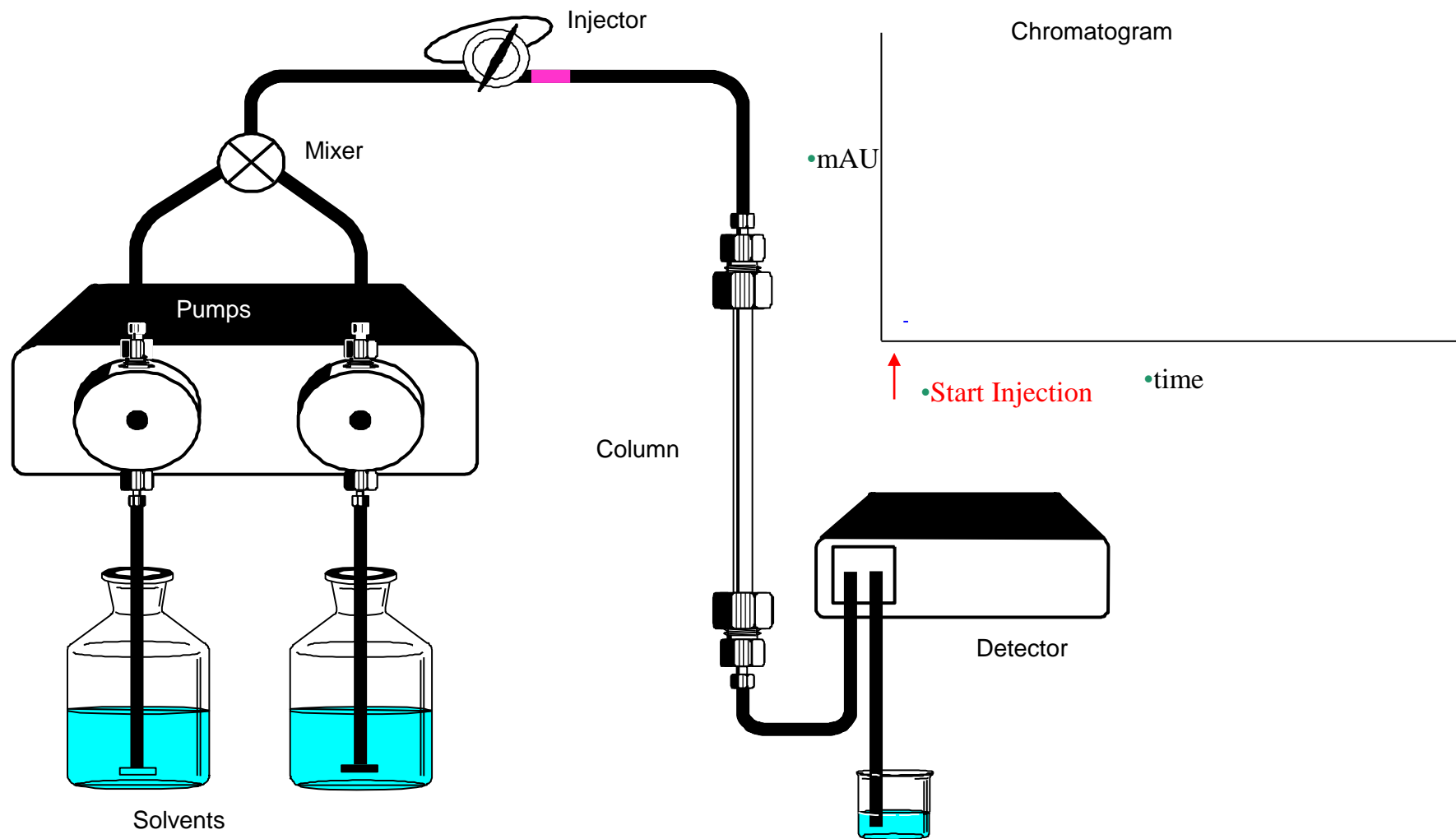
Razdvajanje

IC IC IC IC



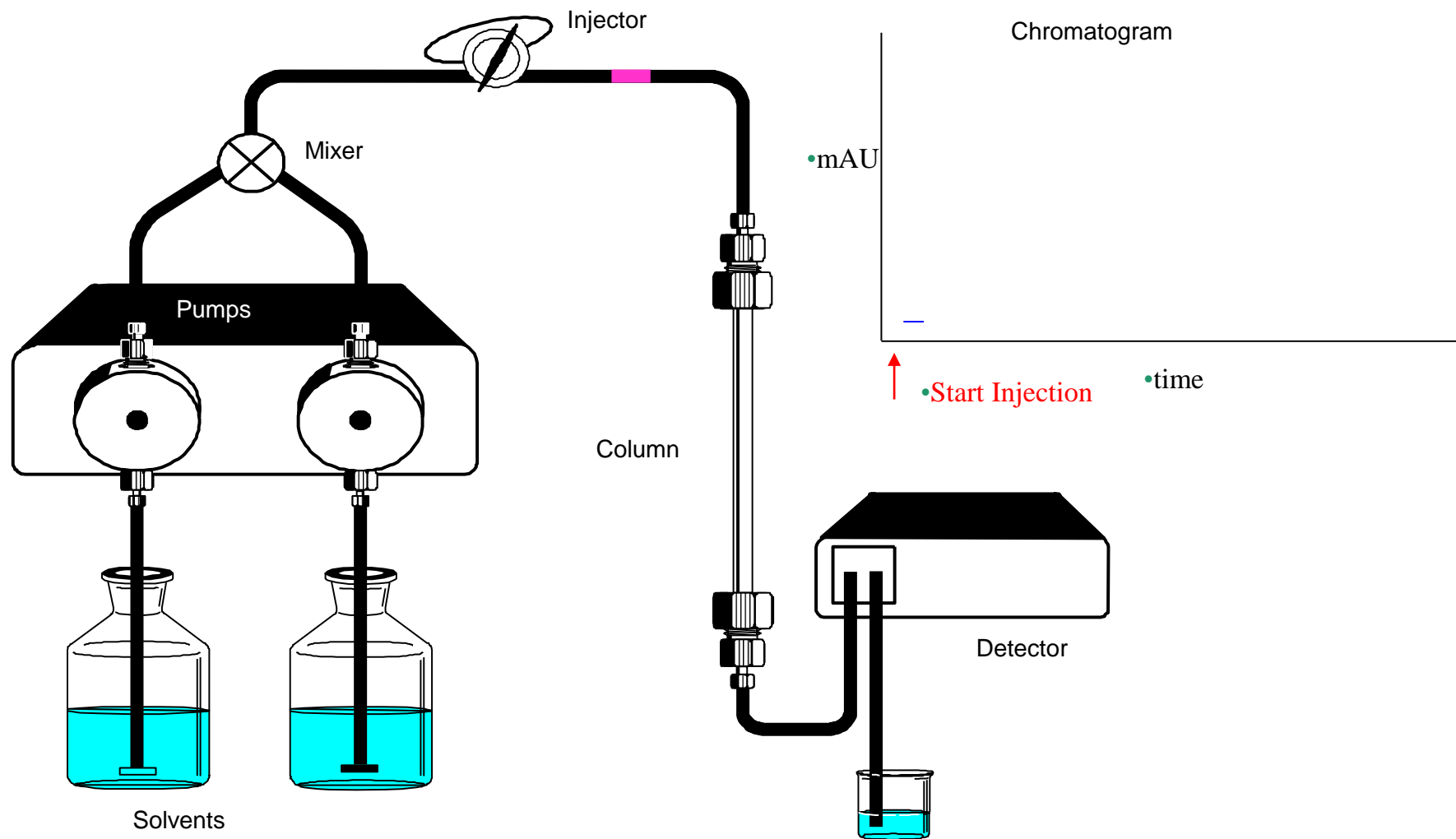
Razdvajanje

IC IC IC IC



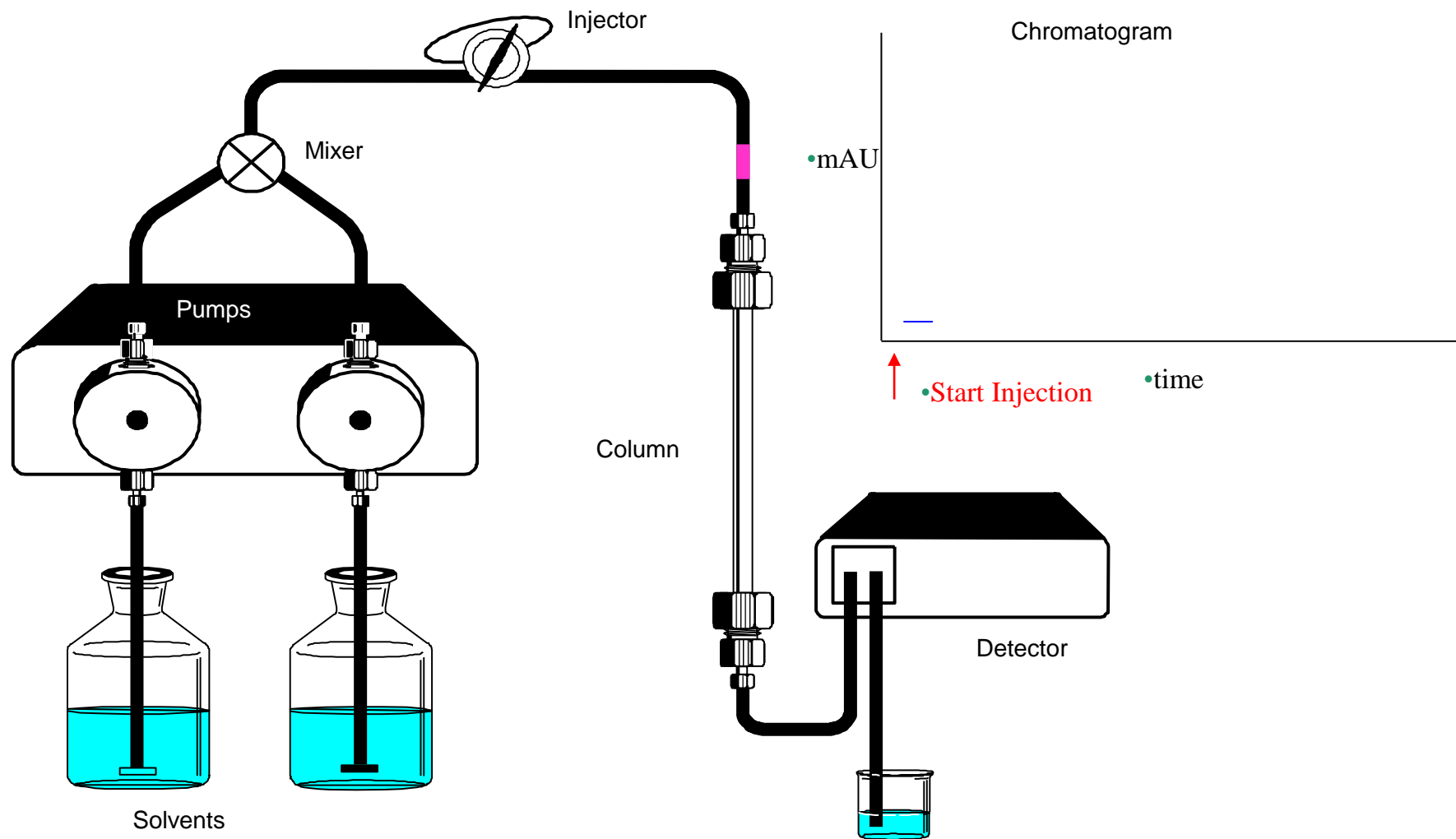
Razdvajanje

IC IC IC IC



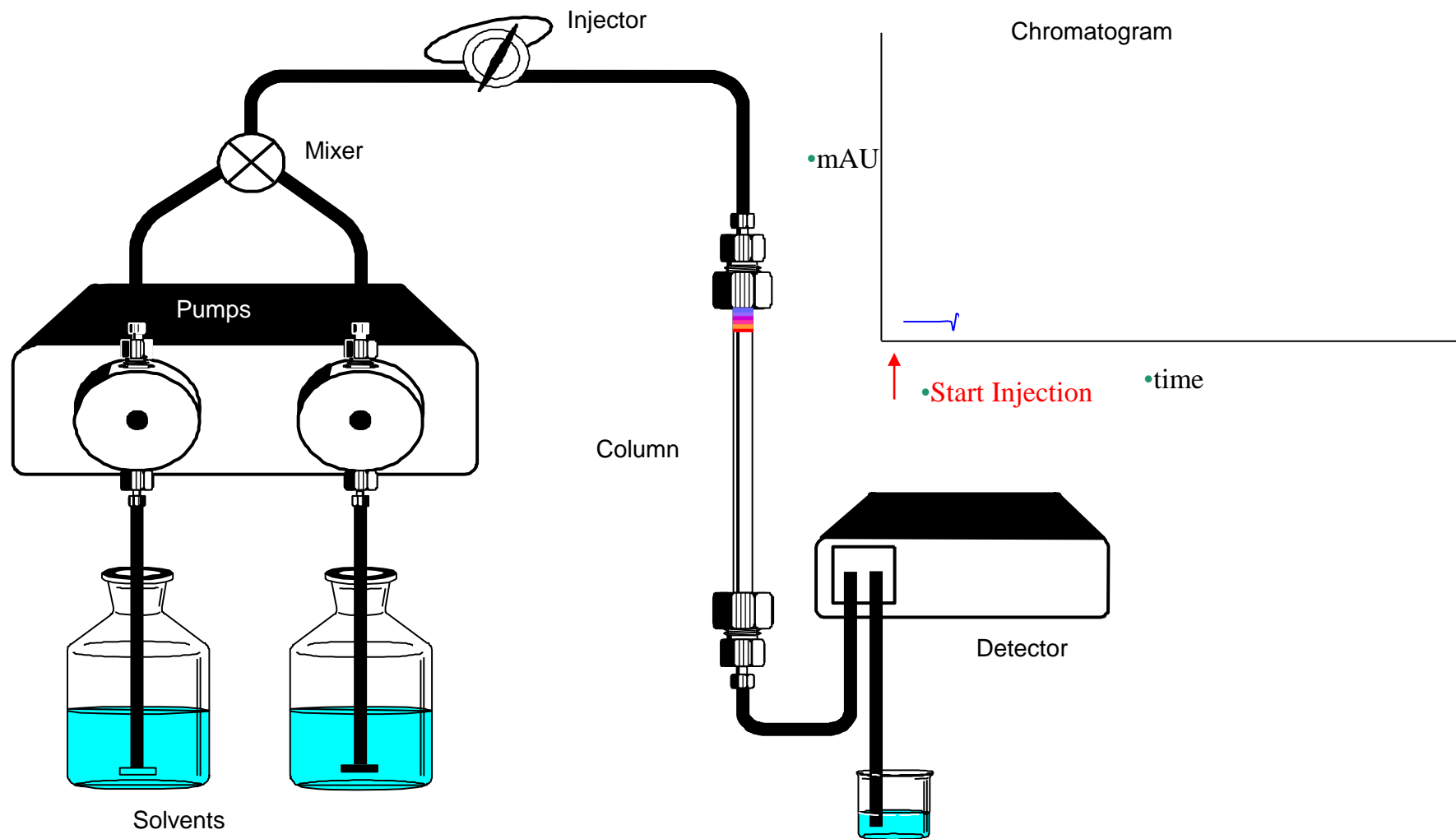
Razdvajanje

IC IC IC IC



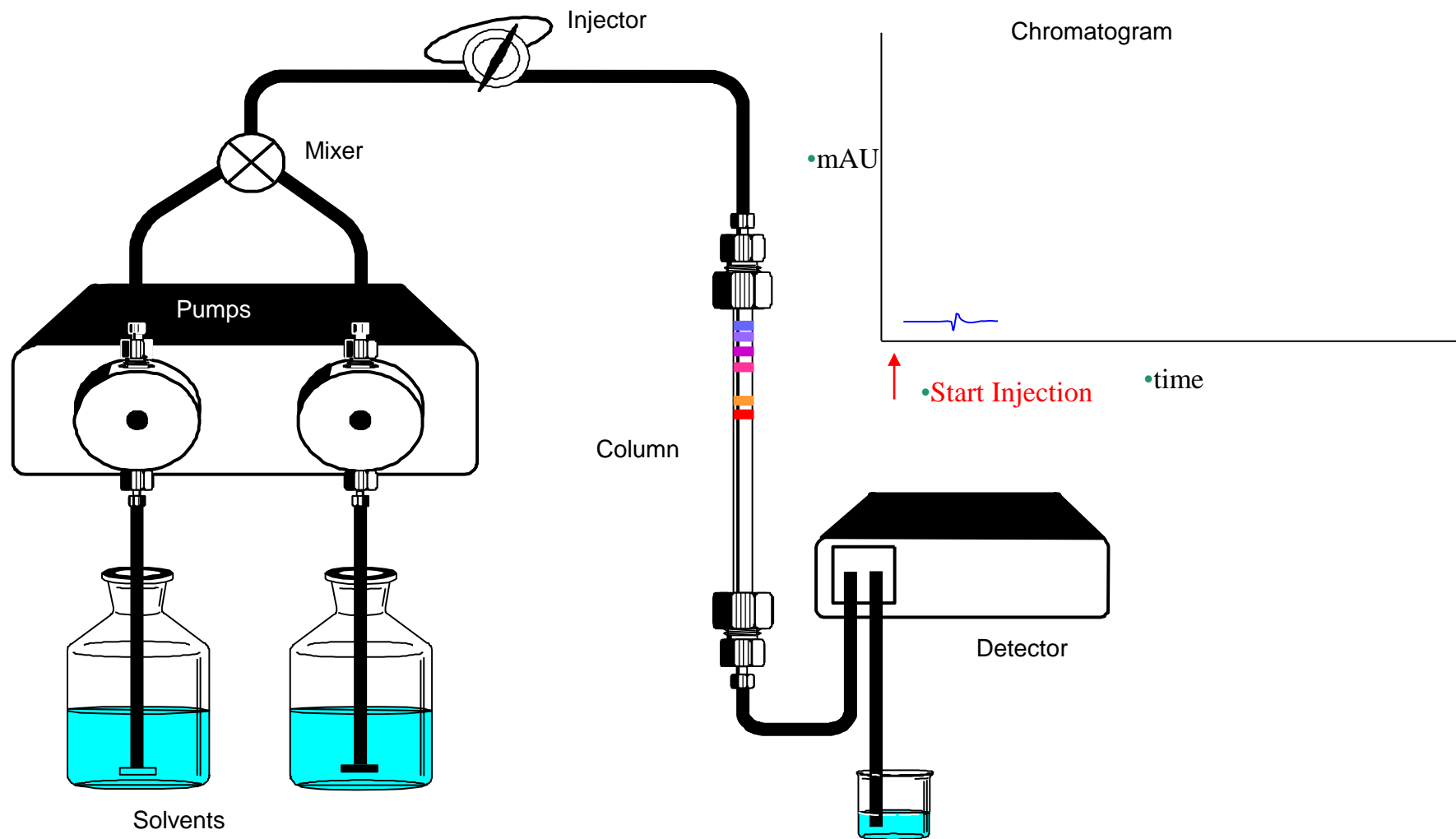
Razdvajanje

IC IC IC IC



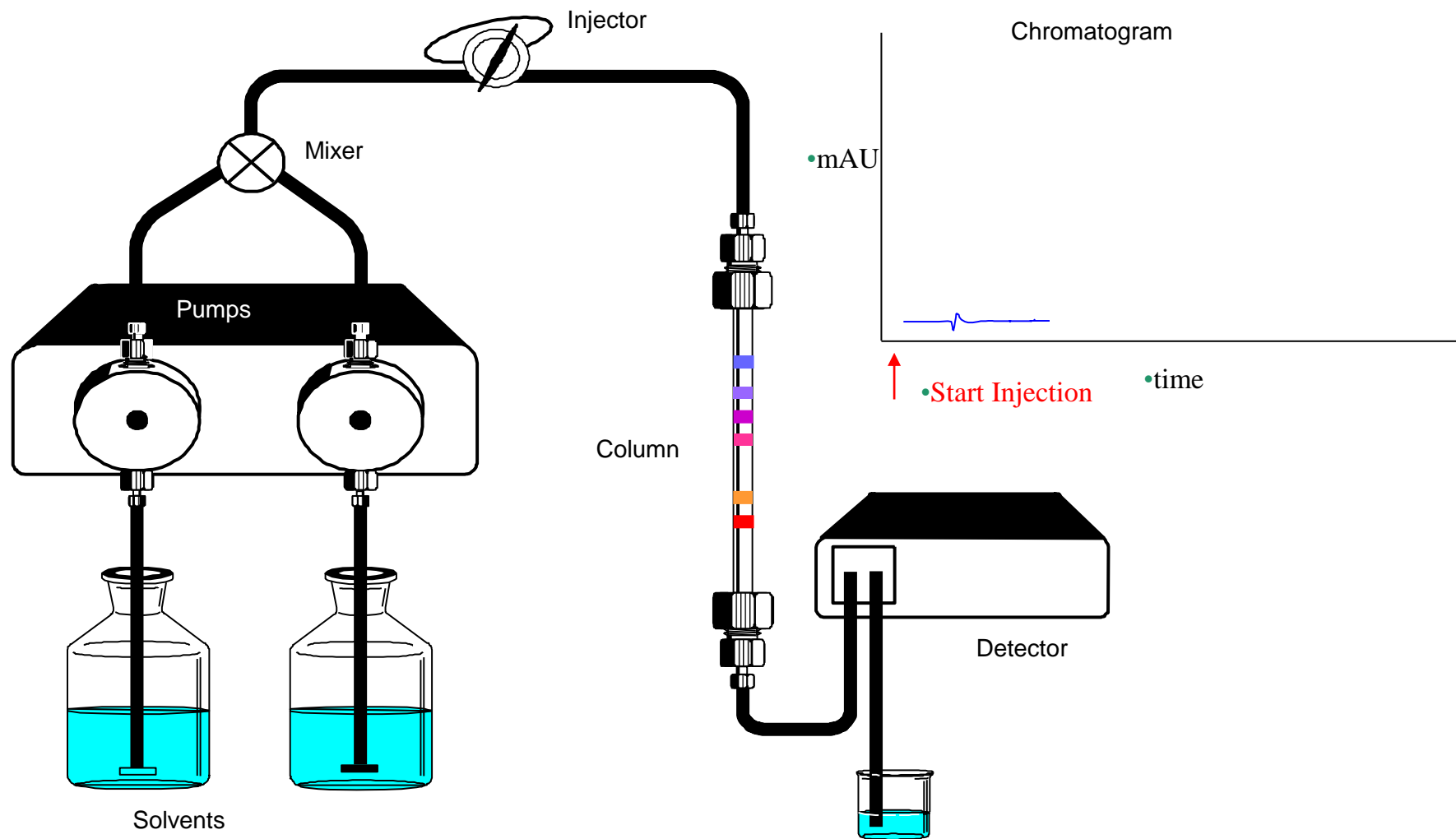
Razdvajanje

IC IC IC IC



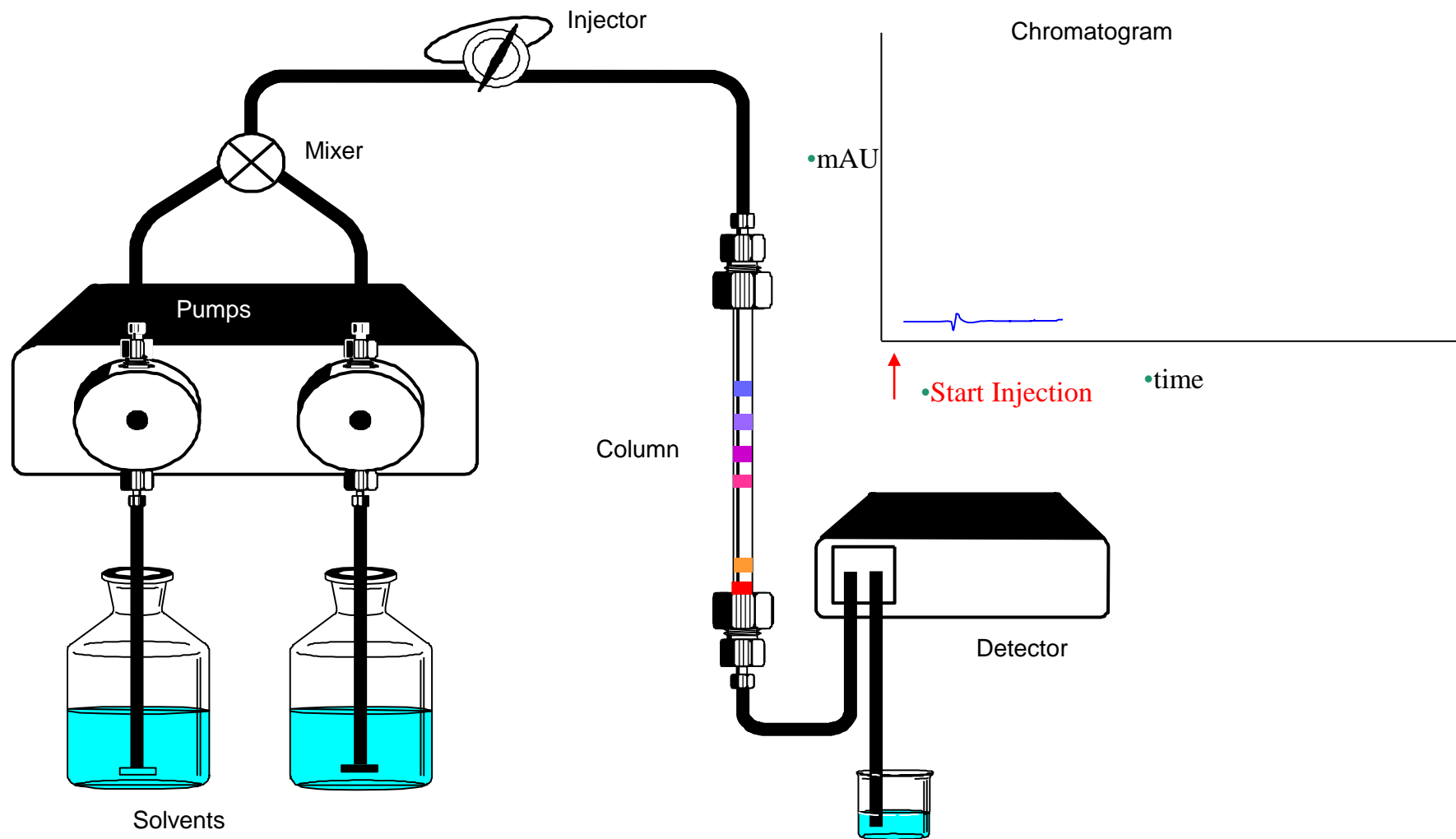
Razdvajanje

IC IC IC IC



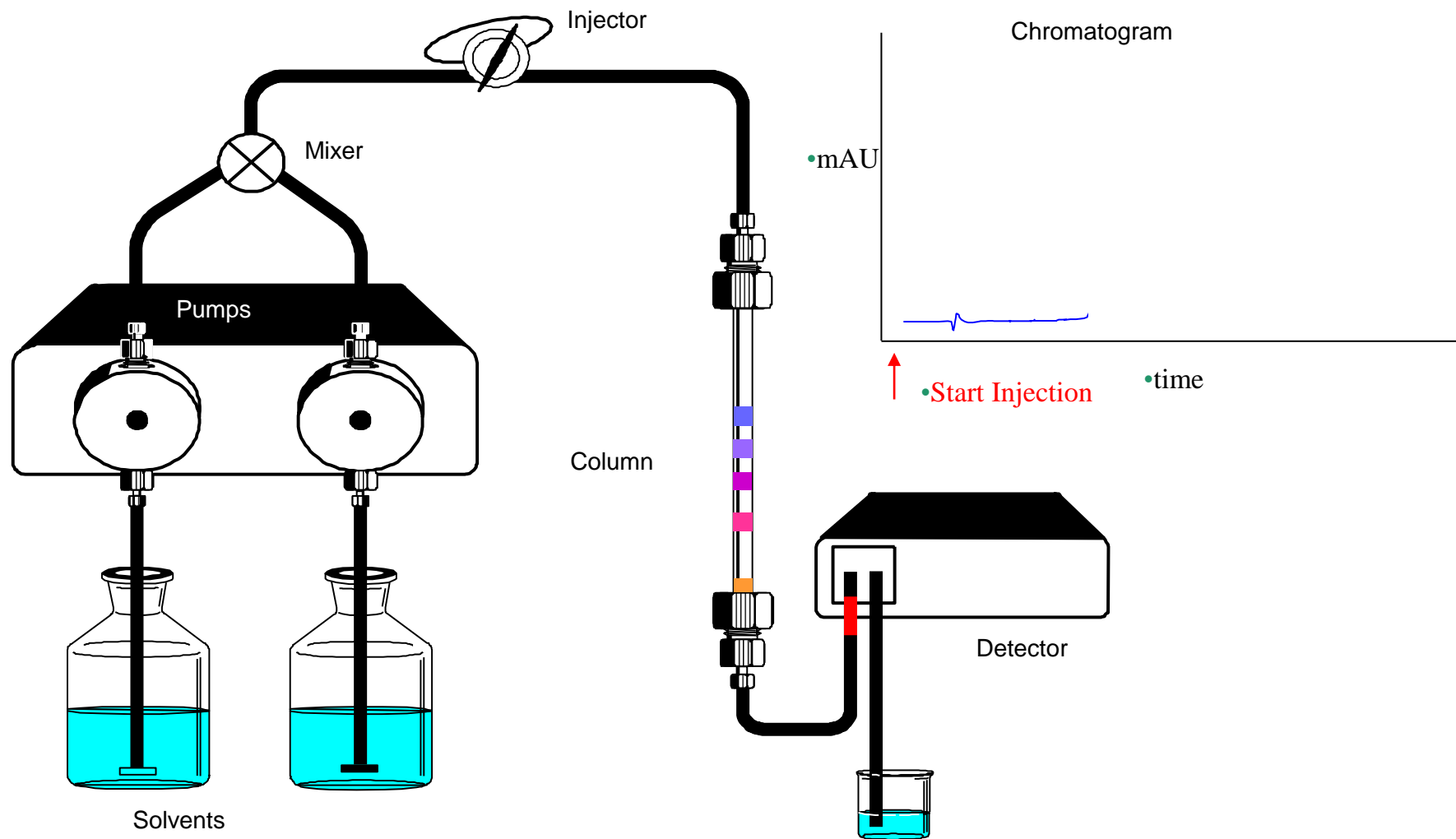
Razdvajanje

IC IC IC IC



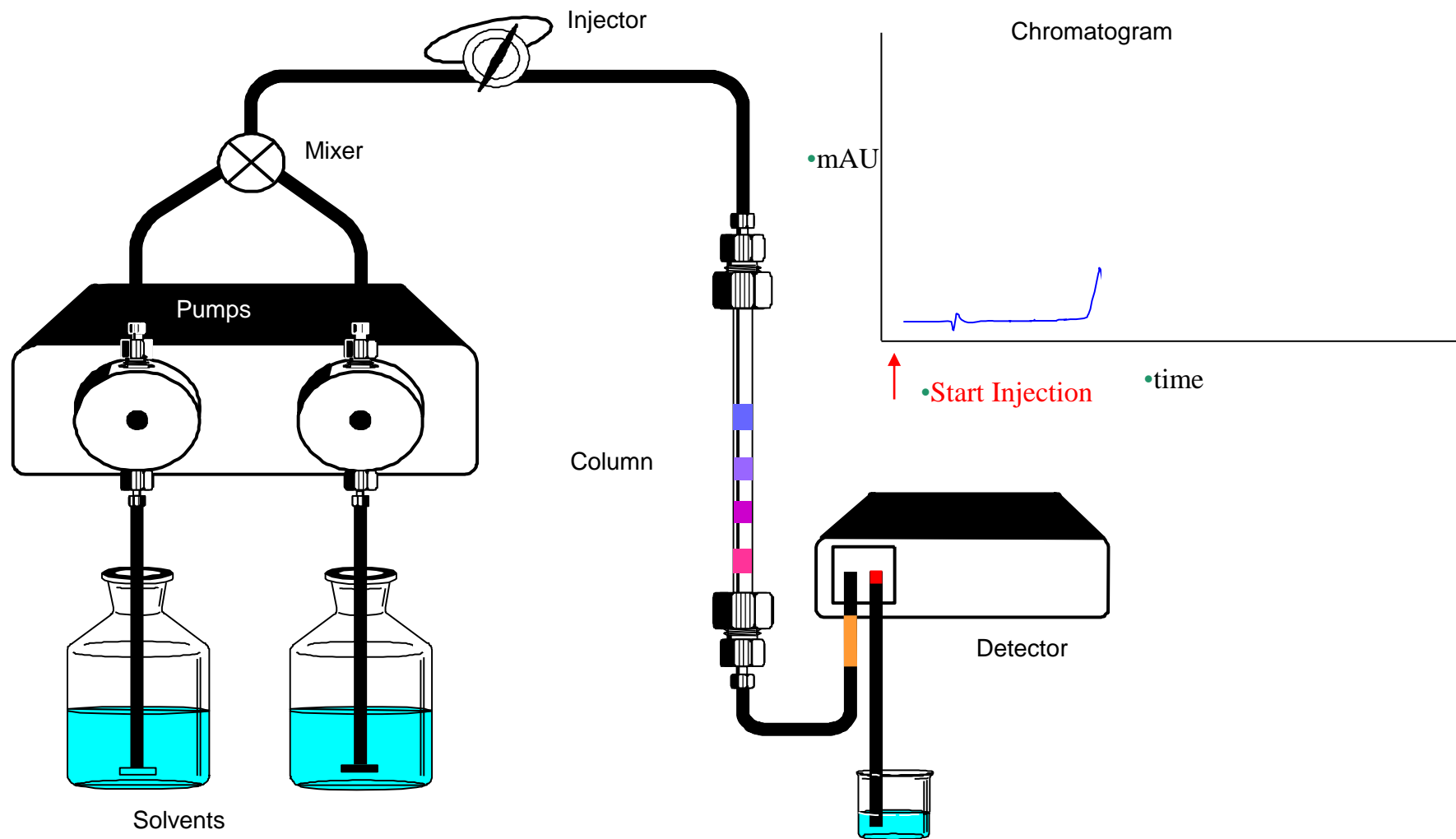
Razdvajanje

IC IC IC IC



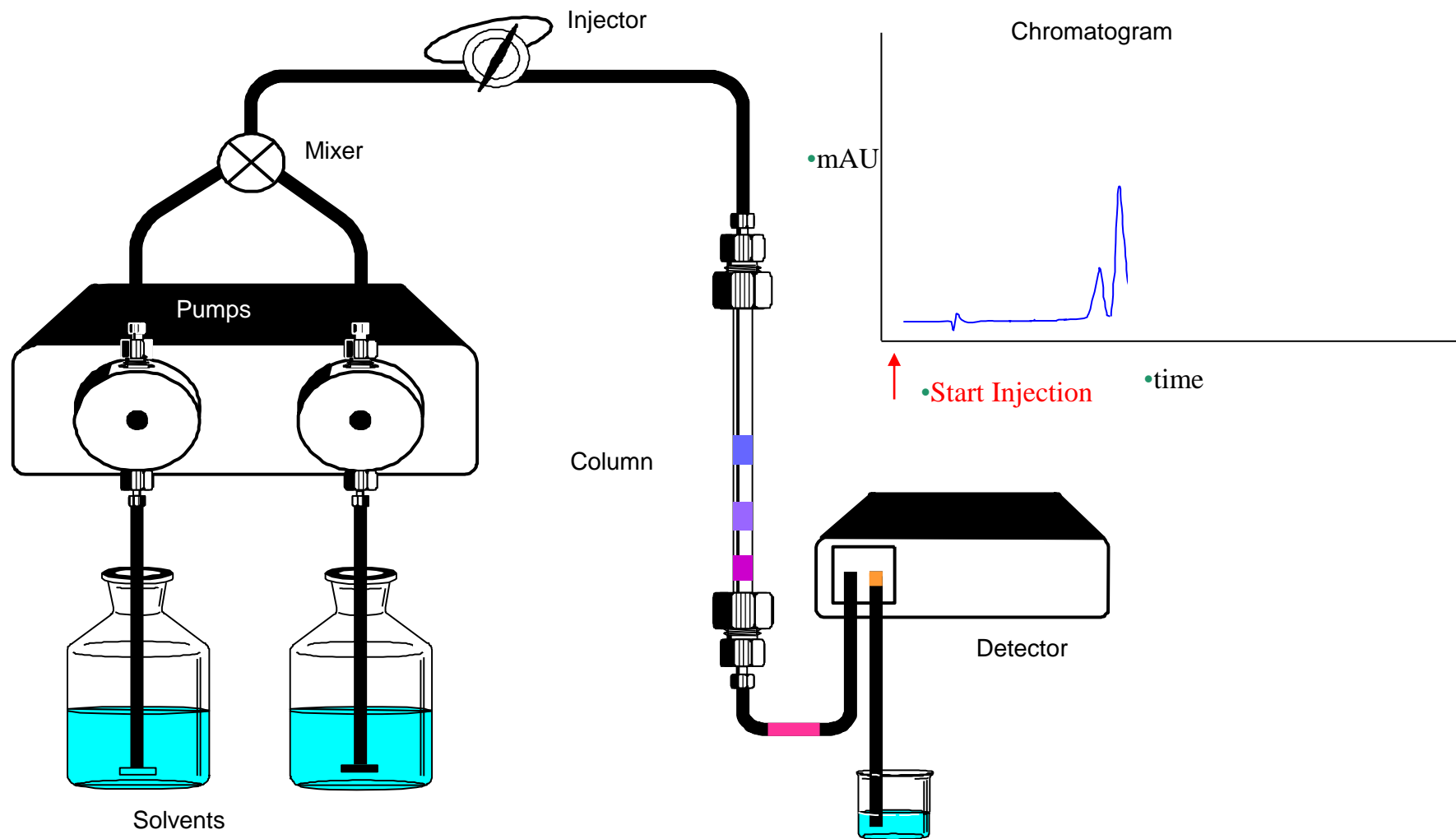
Razdvajanje

IC IC IC IC



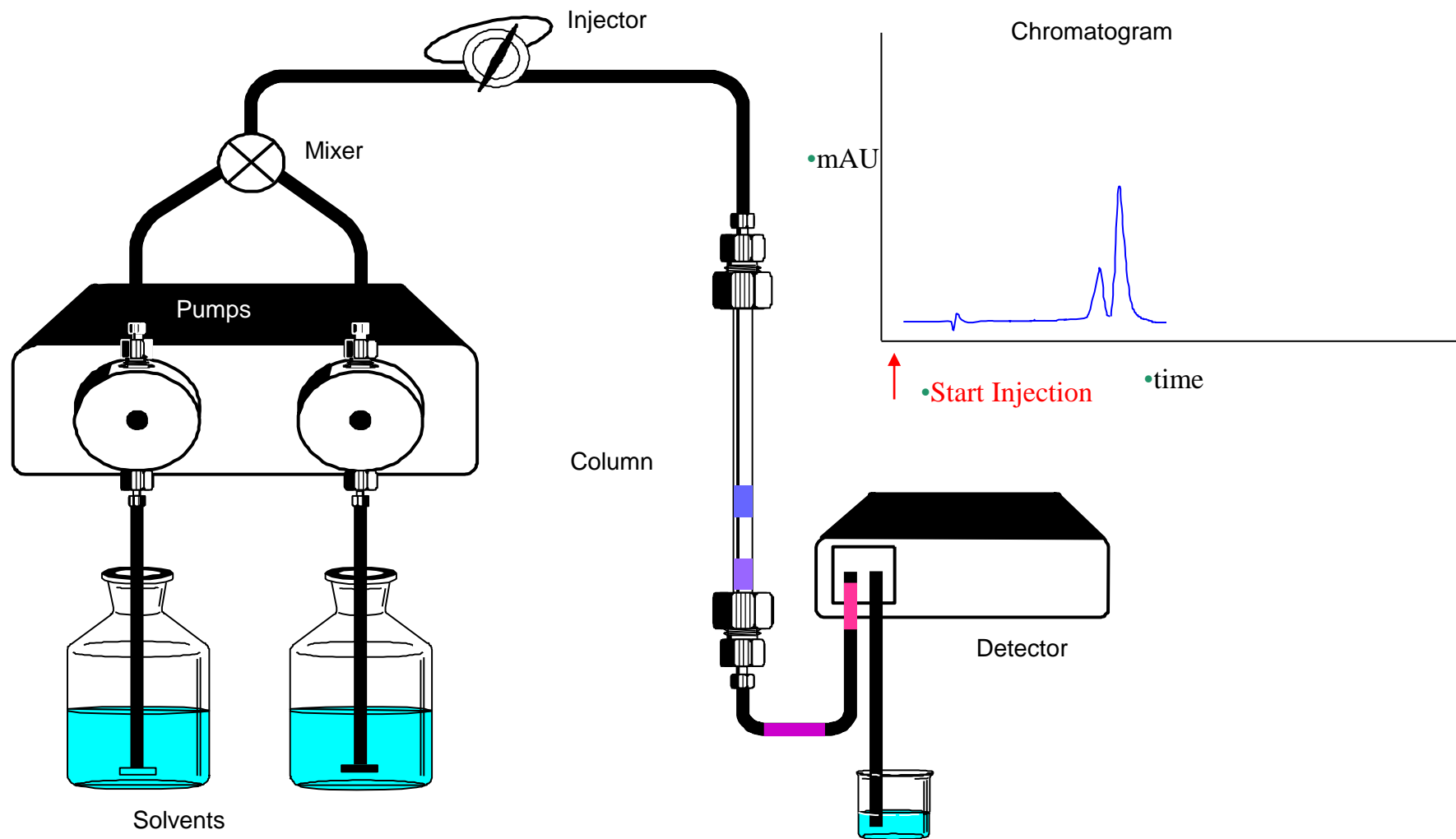
Razdvajanje

IC IC IC IC



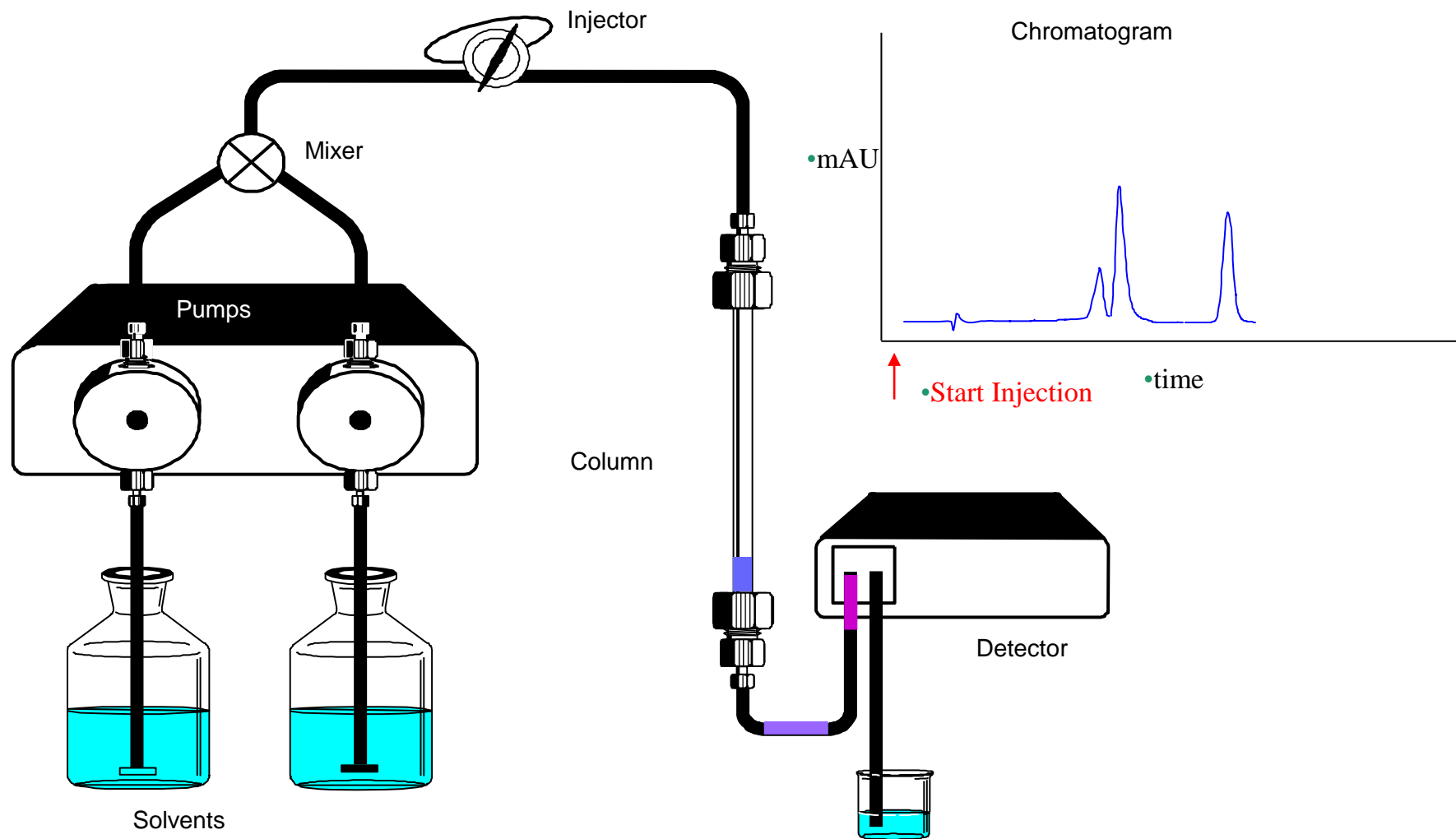
Razdvajanje

IC IC IC IC



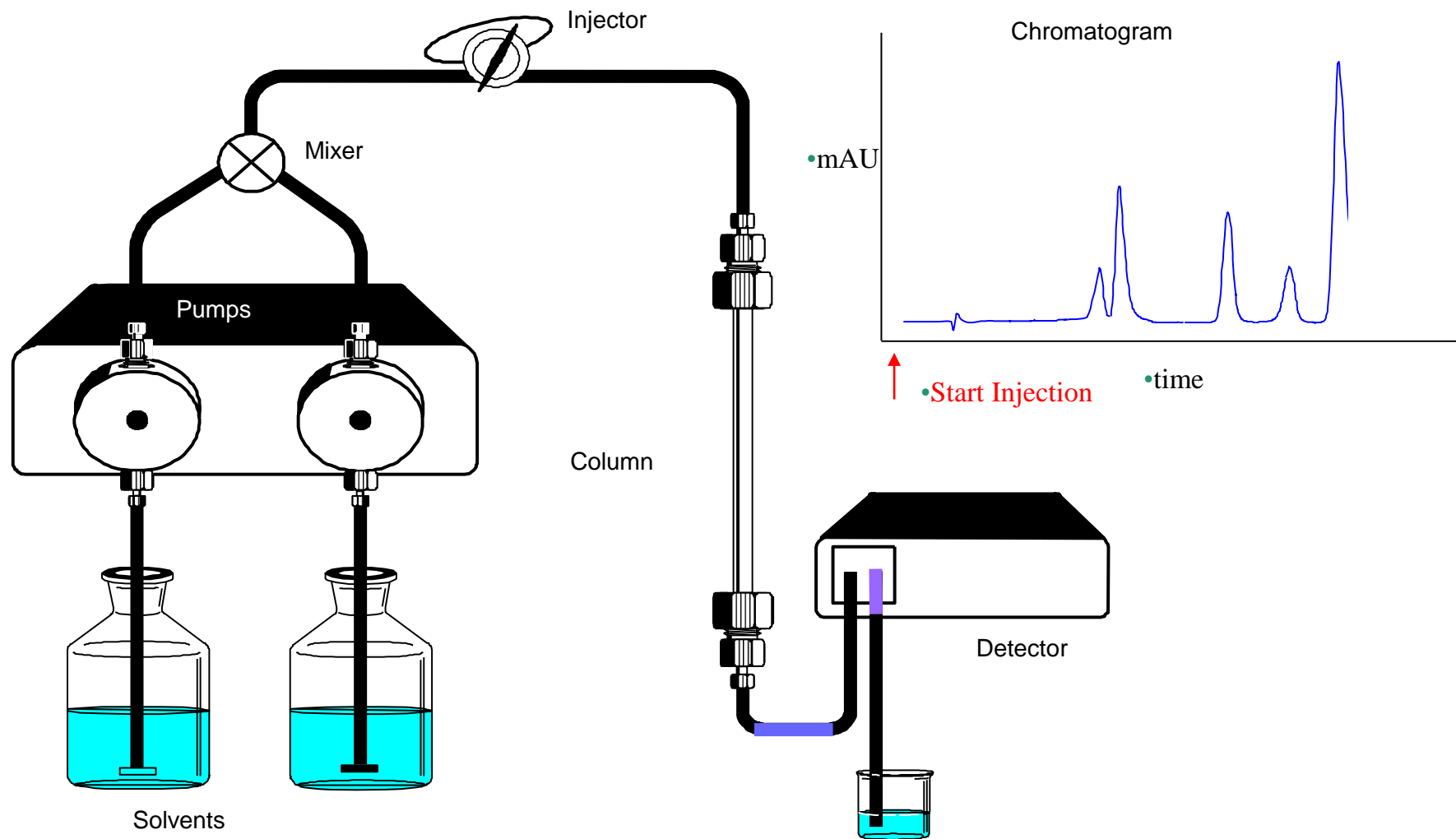
Razdvajanje

IC IC IC IC



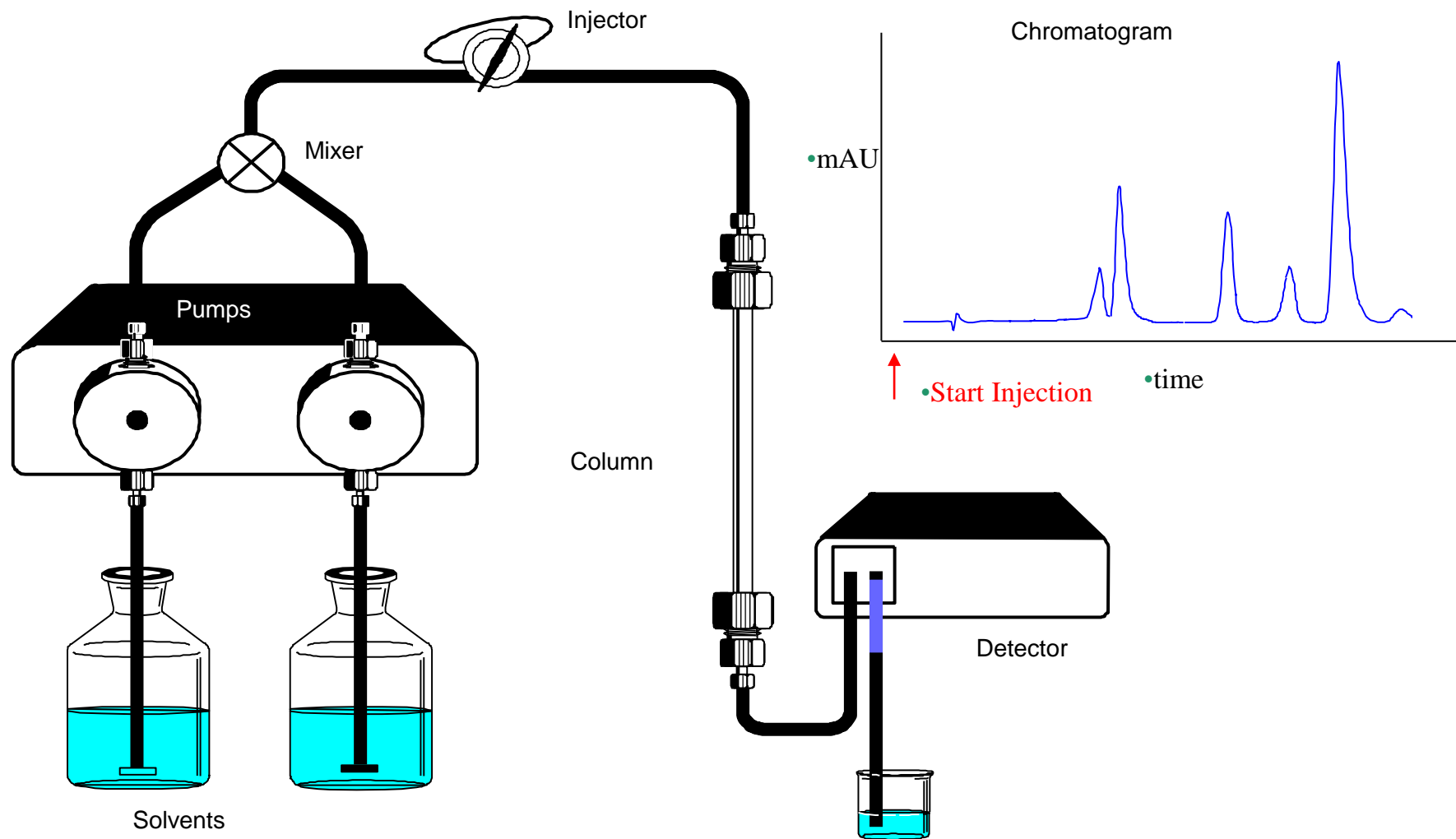
Razdvajanje

IC IC IC IC



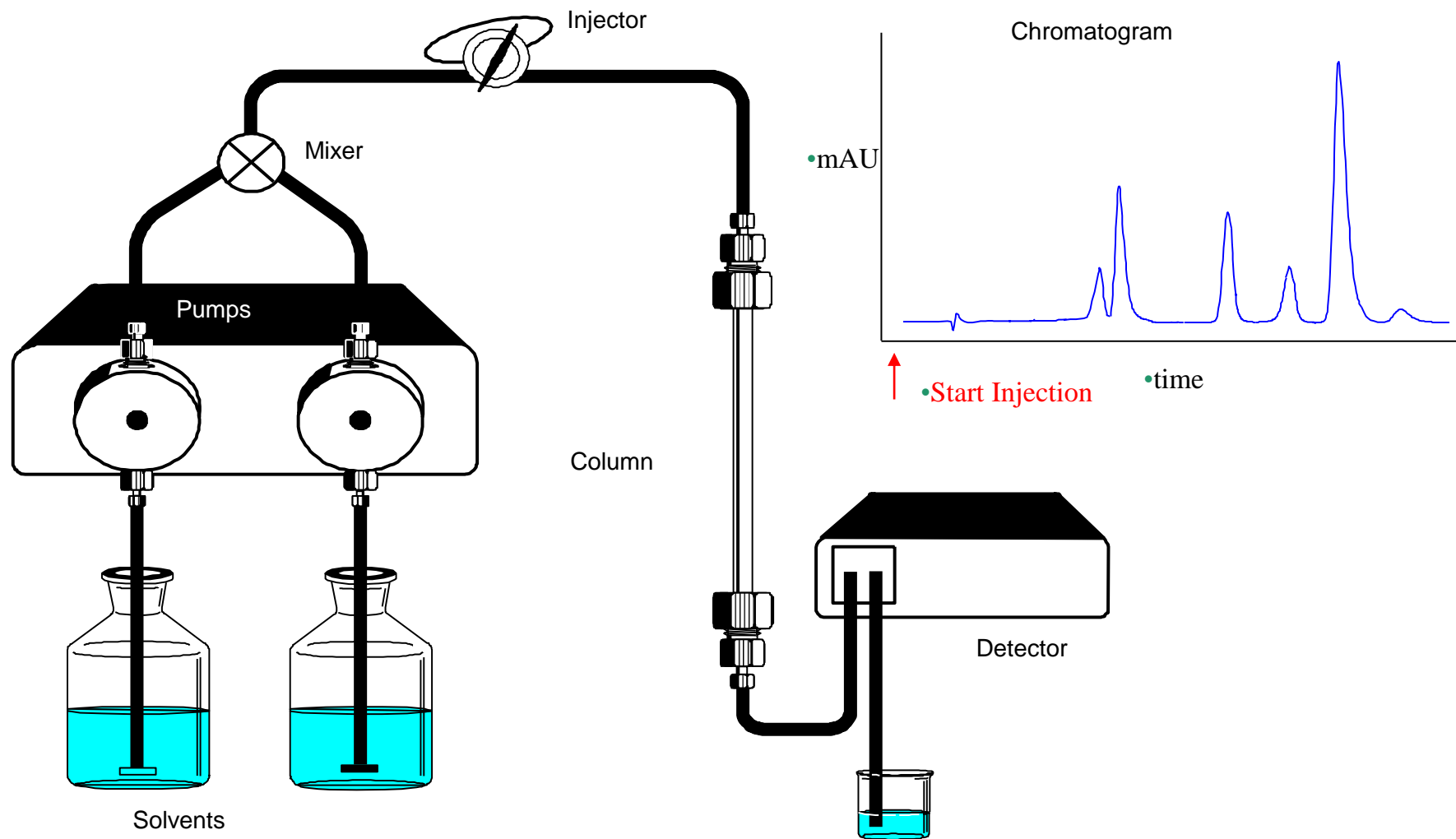
Razdvajanje

IC IC IC IC



Razdvajanje

IC IC IC IC

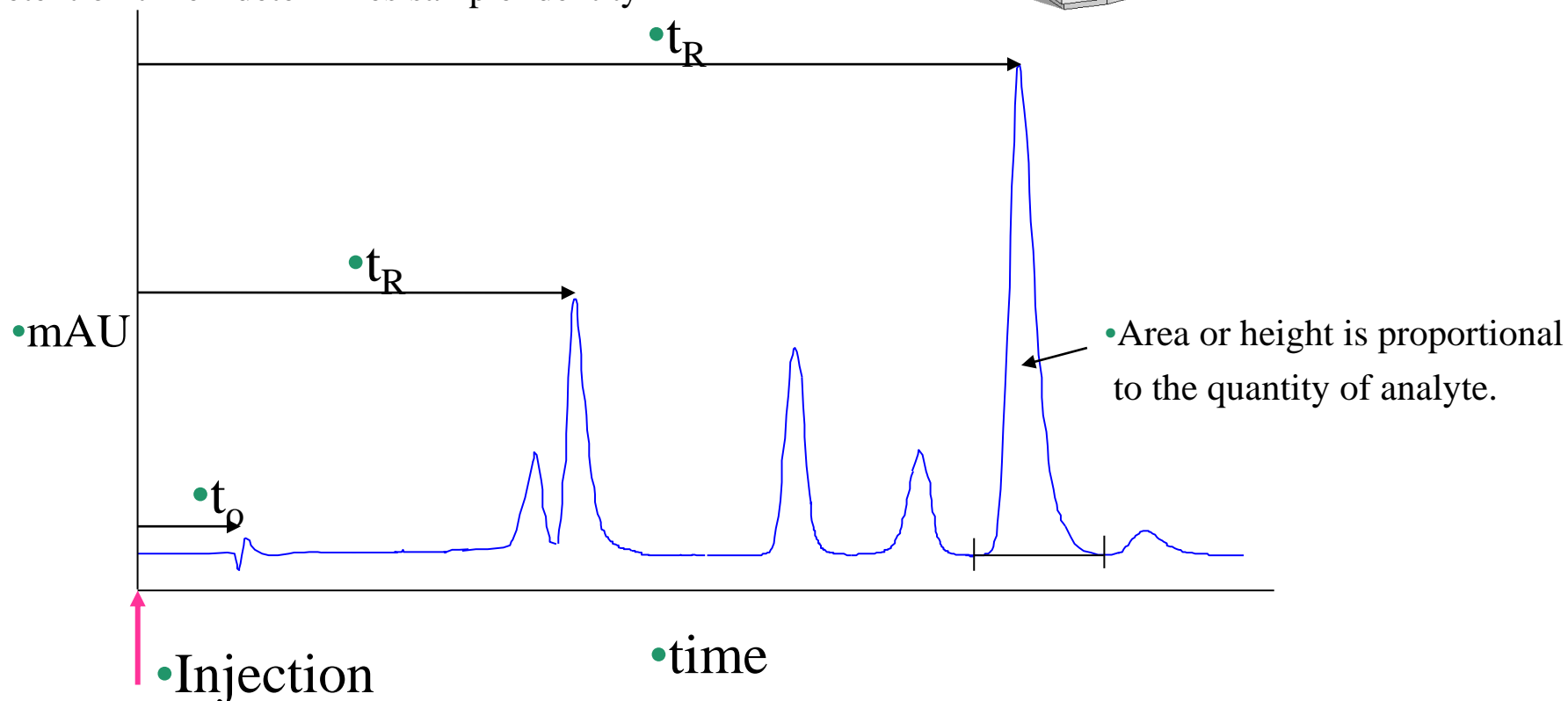
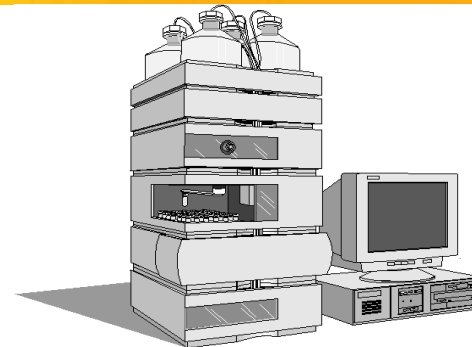


CHROMATOGRAM

IC IC IC IC

IDENTIFIKACIJA SUPSTANCI

- t_o - elution time of unretained peak
- t_R - retention time - determines sample identity



Istorija

| | | | |
|---------|--|------|------------------------------|
| 1850 | Gline kao izmenjivači za Mg^{2+} , Ca^{2+} i NH_4^+ | | Thomson, Way |
| 1935 | Sulfonovani i aminovani polimeri | | Adams, Holms |
| 1942 | Sulfonovane polistiren/divinilbenzen smole (Manhattan projekt) | | d'Alelio |
| 1947 | Aminovane PS/DVB smole kao jonski izmenjivači | LC | McBurney |
| 1953 | Jon ekskluziona hromatografija | | Wheaton, Baumann |
| 1957 | Jonski izmenjivači sa velikom poroznošću | | Corte, Meyer et al. |
| 1959 | Teorijske osnove | | Helferich |
| 1967-70 | Pelikularni jonoizmenjivački materijali | | Horvath, Kirkland |
| 1975 | Jonoizmenjivačka hromatografija sa konduktometrijskom detekcijom i supresijom | | Small, Stevens, Baumann |
| 1979 | Konduktometrijska detekcija sa elektronskom supresijom | HPLC | Gjerde, Fritz, Schmuckler |
| 1976-80 | Jon-par hromatografija | | Waters, Bidlingmeier, et. al |

Polarnosti

Hromatografske metode

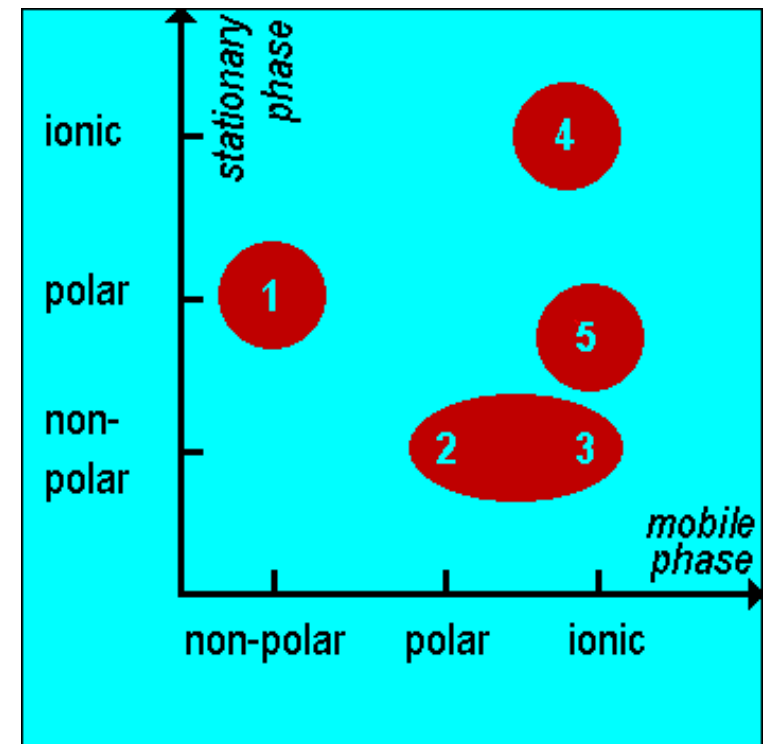
Na osnovu polarnosti stacionarnih i mobilnih faza razlikuju se sledeće metode:

Grupa 1 – tradicionalna TLC + HPLC

1. normalno fazna hromatografija
2. reverzno fazna hromatografija

Grupa 2 – Jonska hromatografija

4. jonoizmenjivačka hromatografija
3. jon-par hromatografija
5. jon-ekskluziona hromatografija



Tradicionalne metode

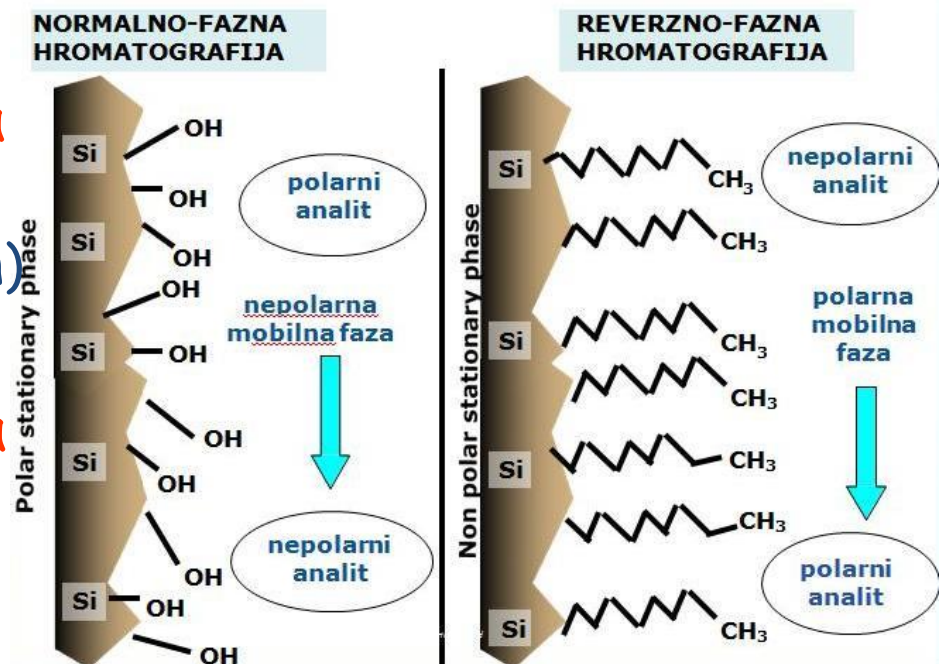
Grupa 1 - tradicionalna TLC + HPLC

1. Normalno fazna hromatografija

stacionarna f. = polarna (npr. SiO_2)
mobilna f. = nepolarna (npr. n-heksan)

2. Reverzno fazna hromatografija

stacionarna f. = nepolarna (npr. C_{18})
mobilna f. = polarna
(npr. acetonitril ili metanol/voda)

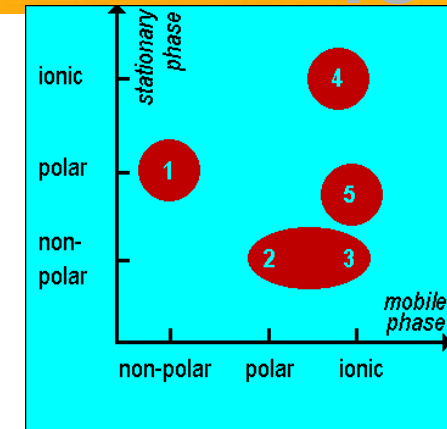


Hromatografija

IC metode

Grupa 2 - IC

4. Jonoizmenjivačka hromatografija



Katjoni i anjoni formiraju slabe jonske veze sa stacionarnom fazom.

Katjoni: Stacionarna faza = polarna (npr. R-SO_3^-) -
Mobilna faza = polarna (npr. HNO_3 aq.)

Anjoni: Stacionarna faza = polarna (npr. R-NR_3^+) -
Mobilna faza = polarna (npr. Na_2CO_3 aq.)

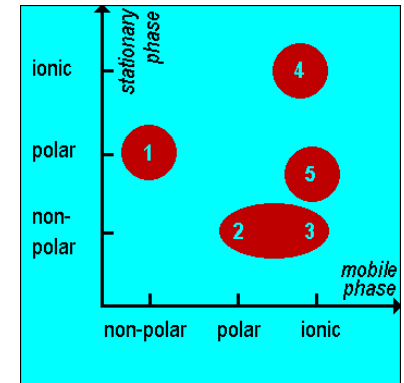
Hromatografija

IC IC IC^{IC}
IC IC

IC metode

Grupa 2 - IC

3. Jon-par hromatografija



Katjoni i anjoni reaguju sa dodatim lipofilnim kontraionom stvarajući nejonski molekul. Rezultujući nepolarni molekul se onda odvaja u RP-modu.

Stacionarna faza = nepolarna (npr. C_{18})

mobilna faza = polarna (npr. acetonitril ili metanol/voda)

Hromatografija

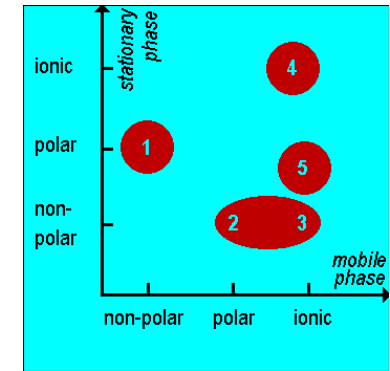
IC metode

Grupa 2 - IC

5. Jon ekskluziona hromatografija

Dodavanjem H^+ -jona stacionarna faza se transformiše u nejonsku, ali polarnu Donanovu membranu. Samo nedisosovani molekuli mogu da uđu u ovu membranu. Ako disosuju oni se istiskuju iz stacionarne faze. Razdvajanje komponenti vrši se na osnovu razlike konstanti disocijacije ispitivanih molekula.

- mobilna faza. = polarna (npr. H_2SO_4 aq.)



Zaključak

Definicija

Jonska hromatografija obuhvata sve hromatografske metode koje razdvajaju jonske substance i substance koje lako disosuju. Ove metode su jon-par hromatografija (3), jonoizmenjivačka hromatografija (4) i jon ekskluziona hromatografija (5).

Analit i mobilna faza su u početku uvek polarne i/ili jonske. Jonska izmena je najvažniji mehanizam razdvajanja u jonskoj hromatografiji.

HPLC i IC

Tečno-čvrsta hromatografija

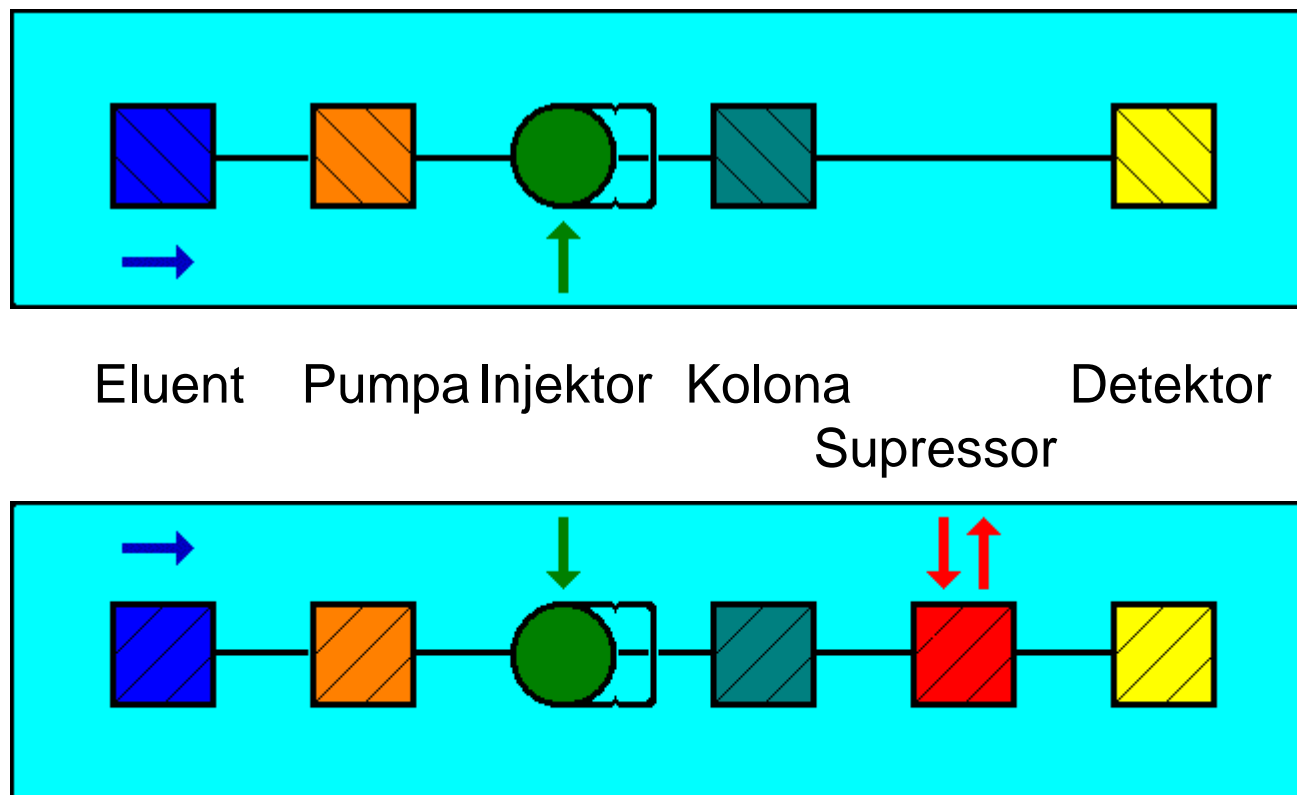
Od uvođenja visokoperformansne ili tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) krajem šezdesetih godina prošlog veka, tečna hromatografija postaje jedna od najznačajnijih i najprimenjivanijih metoda savremene instrumentalne analize.

Jonska hromatografija je jedan „aliquot“ u HPLC-familiji.

[mobilna faza = tečnost; stacionarna faza = čvrsta]



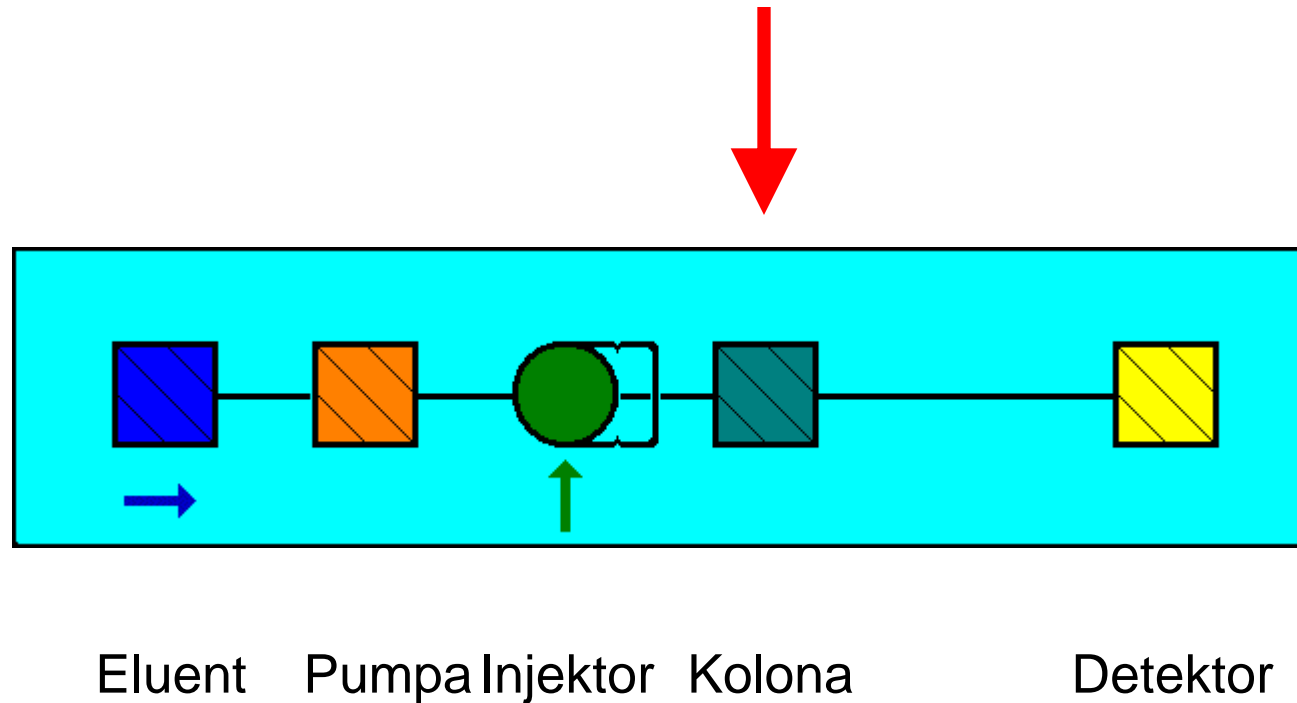
Blok šema



Hromatografija

IC IC IC^{IC}
IC IC

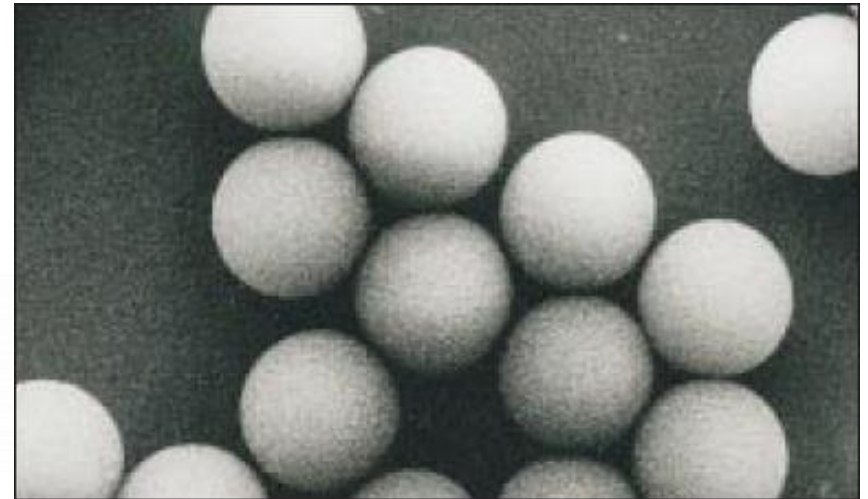
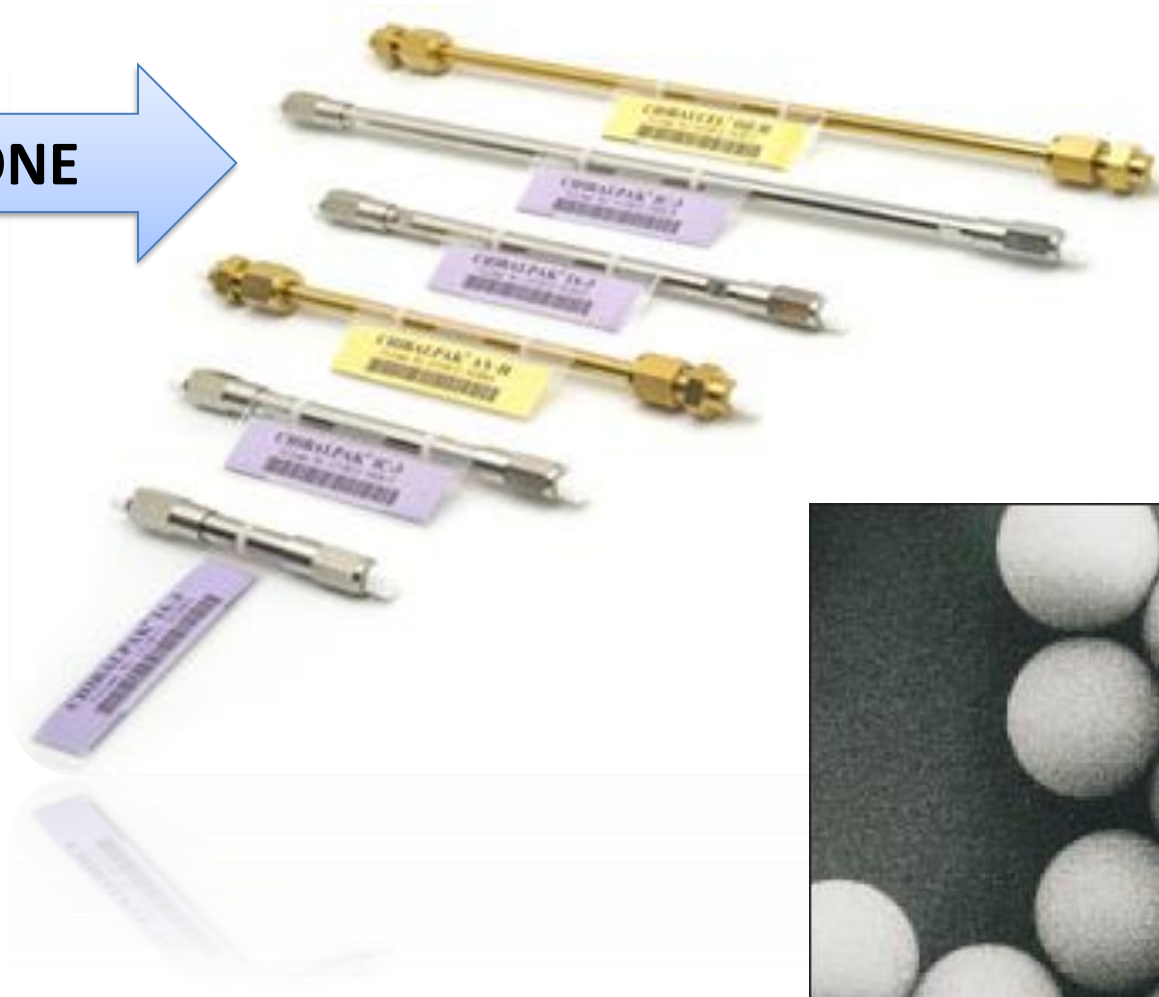
Gde se “dešava”?



Hromatografija

IC IC IC^{IC}
IC IC

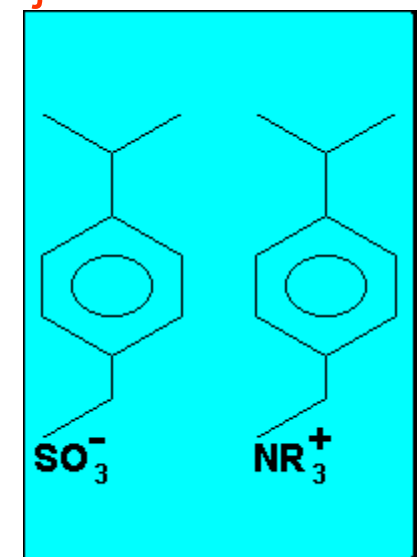
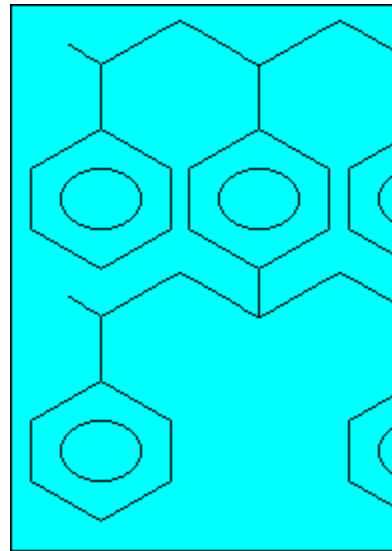
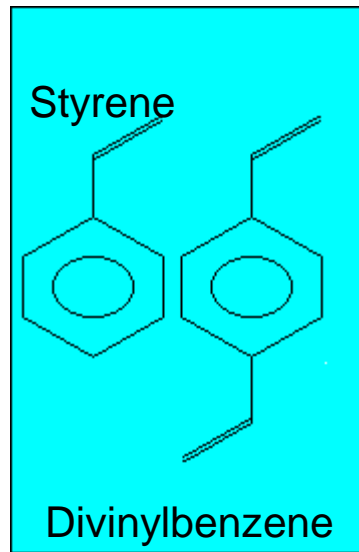
• KOLONE



Jonska izmena

stacionarna faza

- Katjonima je potreban katjonski izmenjivač; anjonima je potreban anjonski izmenjivač
- Kakva je građa stacionarne faze?



Katjonski
izmenjivač

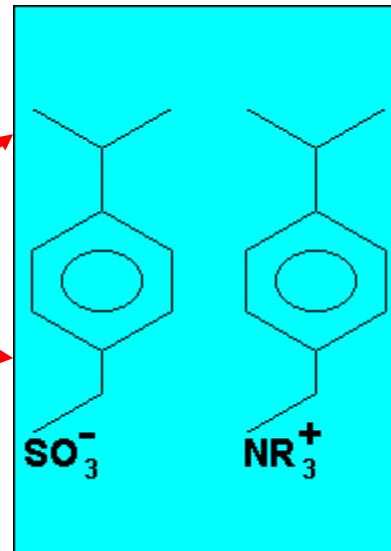
Stiren-divinilbenzen polimer

Anjonski
izmenjivač

Jonska izmena

Sastav stacionarne faze

- substrat / smola nosač
- odvajajuća grupa
- grupa koja nosi separaciona svojstva i kapacitet



Substrati

- Polistiren/divinilbenzen
- Polimetakrilat
- Polialkohol
- Hidoksietilmetakrilat (HEMA)
- Silikat

Anjonski izmenjivači

- kvaternerne amonijum grupe
- alkil amini
- hidroxi-alkilamini
- alkil amini sa akrilatnim tipom vezivanja

Katjonski izmenjivači

- sulfonati
- karboksilati

Odvajanje

- alkil lanac

Jonska izmena

Mobilne faze

- mobilna faza i rastvara i nosi uzorak
- mobilna faza je obično vodeni rastvor

anioni (I)

- Ftalna kiselina
- Salicilna kislina
- p-hidroksibenzojeva kis.
- Benzojeva
- Boratna kiselina
- Borat/Glukonat
- Kalijum hidroksid
- ...

anioni (II)

- Karbonat/bikarbonat
- Kalijum hidroksid
- Borat

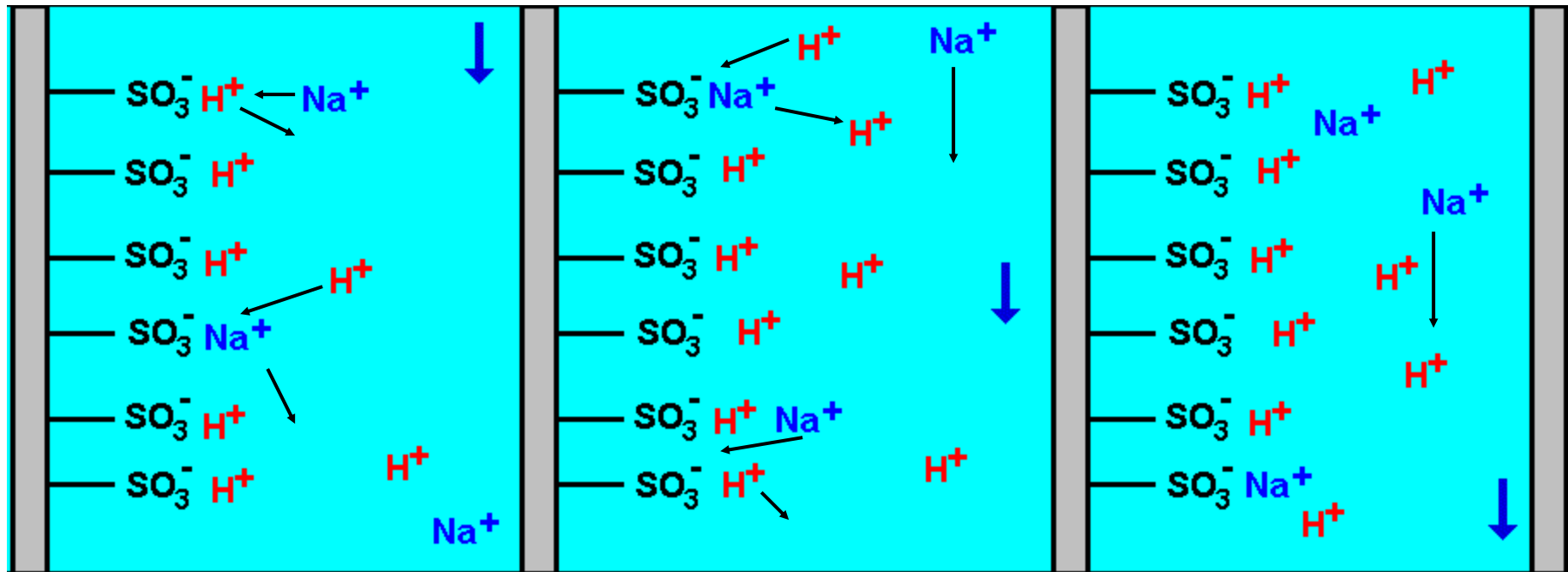
katjoni (I)

- Azotna kiselina
- Vinska kiselina
- Vinska/dipikolinska kiselina
- Vinska/limunska kiselina
- Natrijum-dihidrogenfosfat
- oksalna kiselina/etilen diamin/aceton
- ...

Jonska izmena

Mehanizam razdvajanja katjona

Stacionarna i mobilna faza su zajedničke za analit



Jonska izmena

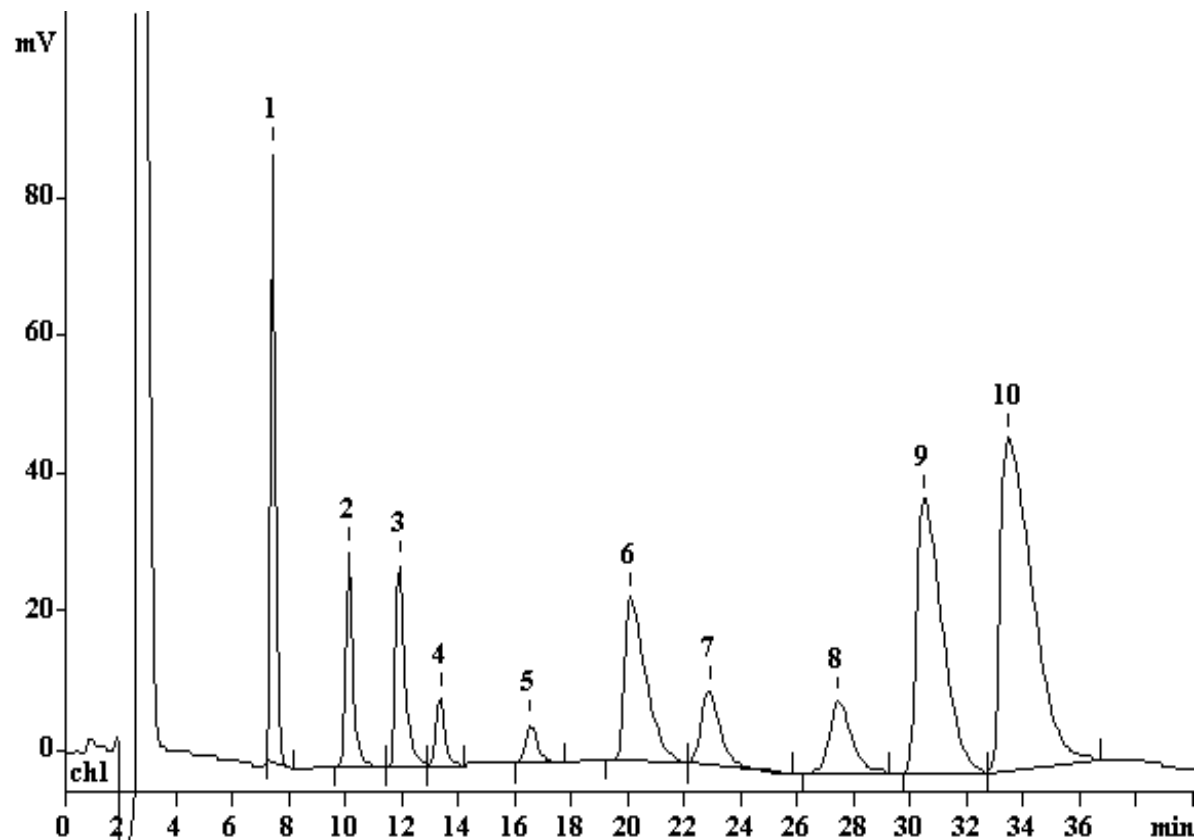
Katjoni

C2 – 250

Vinska-/dipikolinska kiselina/
etar; 4/0.45/0.05 mmol/L

| | | |
|----|------------------------------|-----|
| 1 | Litijum | 0.5 |
| 2 | Natrijum | 1.0 |
| 3 | NH ₄ ⁺ | 1.0 |
| 4 | MES | 1.0 |
| 5 | DEA | 1.0 |
| 6 | Kalijum | 4.8 |
| 7 | TEA | 5.0 |
| 8 | MDEA | 4.8 |
| 9 | Kalcijum | 5.0 |
| 10 | Magnezijum | 4.0 |

ppm



Jonska izmena

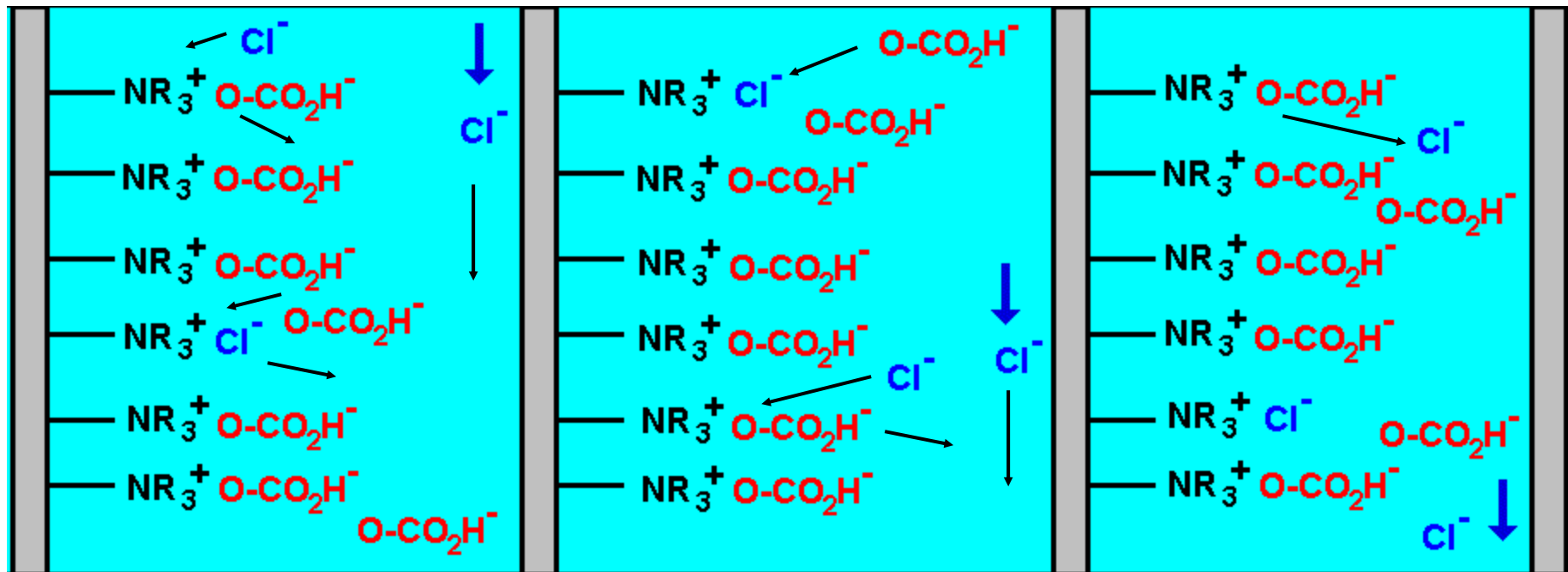
Katjoni

| I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|----|----|----|-----|----|----|----|-----|------|
| H | | | | | | | | | | | | | | | | | He |
| Li | Be | | | | | | | | | | | B | C | N | O | F | Ne |
| Na | Mg | | | | | | | | | | | Al | Si | P | S | Cl | Ar |
| K | Ca | Sc | Ti | V | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Ga | Ge | As | Se | Br | Kr |
| Rb | Sr | Y | Zr | Nb | Mo | Tc | Ru | Rh | Pd | Ag | Cd | In | Sn | Sb | Te | I | Xe |
| Cs | Ba | La | Hf | Ta | W | Re | Os | Ir | Pt | Au | Hg | Tl | Pb | Bi | Po | At | Rn |
| Fr | Ra | Ac | Ku | | | | | | | | | | | | | | |

Jonska izmena

Mehanizam razdvajanja anjona

Stacionarna i mobilna faza zajedničke za analit



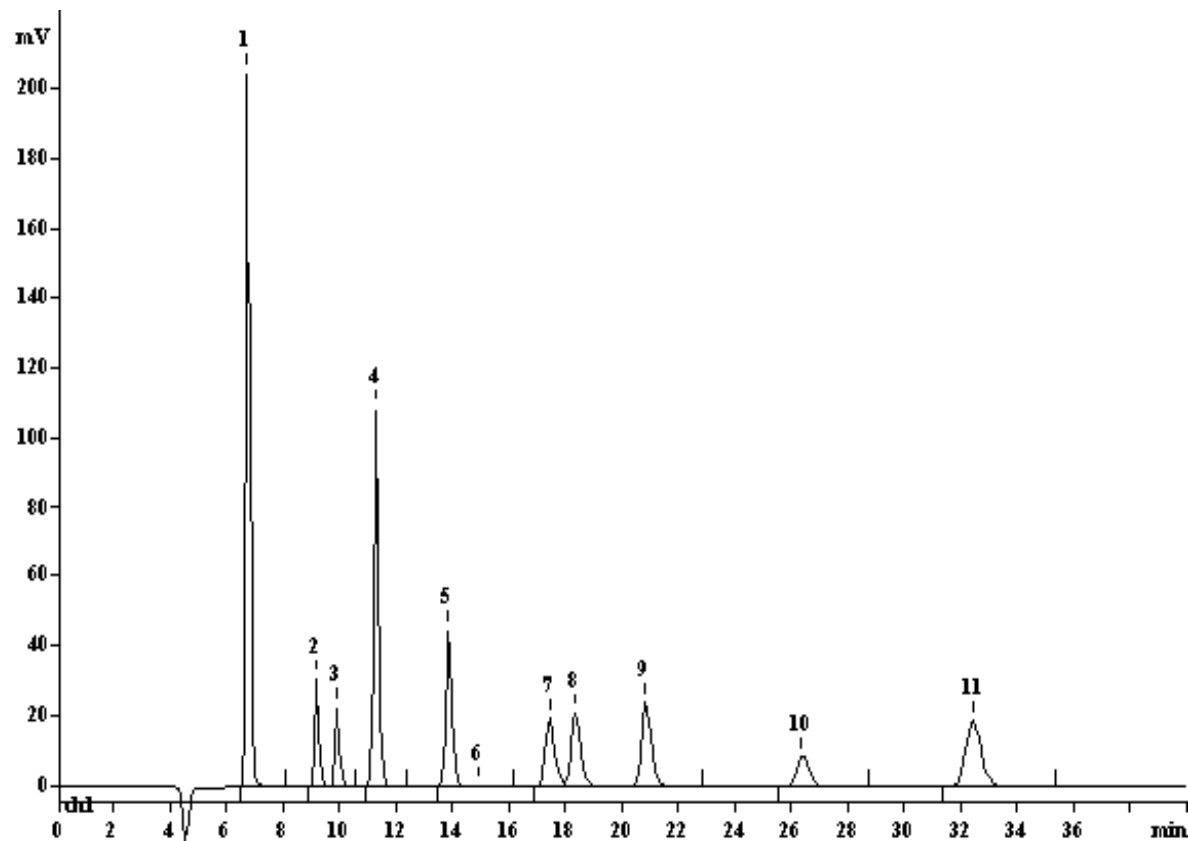
Jonska izmena

Anjoni

A Supp 5 – 250

NaHCO₃/Na₂CO₃; 1/3.2 mmol/L

| | | |
|----|---------|---------|
| 1 | Fluorid | 5.0 |
| 2 | Hlorit | 5.0 |
| 3 | Bromat | 5.0 |
| 4 | Hlorid | 5.0 |
| 5 | Nitrit | 5.0 |
| 7 | Hlorat | 5.0 |
| 8 | Bromid | 5.0 |
| 9 | Nitrat | 5.0 |
| 10 | Fosfat | 5.0 |
| 11 | Sulfat | 5.0 ppm |



Jonska izmena

Anjoni

| I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|----|----|----|-----|----|----|----|-----|------|
| H | | | | | | | | | | | | | | | | | He |
| Li | Be | | | | | | | | | | | B | C | N | O | F | Ne |
| Na | Mg | | | | | | | | | | | Al | Si | P | S | Cl | Ar |
| K | Ca | Sc | Ti | V | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Ga | Ge | As | Se | Br | Kr |
| Rb | Sr | Y | Zr | Nb | Mo | Tc | Ru | Rh | Pd | Ag | Cd | In | Sn | Sb | Te | I | Xe |
| Cs | Ba | La | Hf | Ta | W | Re | Os | Ir | Pt | Au | Hg | Tl | Pb | Bi | Po | At | Rn |
| Fr | Ra | Ac | Ku | | | | | | | | | | | | | | |

Jonska izmena

Katjoni

- Katjoni interaguju sa baznim grupama na stacionarnoj fazi. Zbog različite jačine vezivanja (konstante ravnoteže jonske izmene) oni će, ranije ili kasnije, biti eluirani pomoću nadolazećih protona iz eluenta.

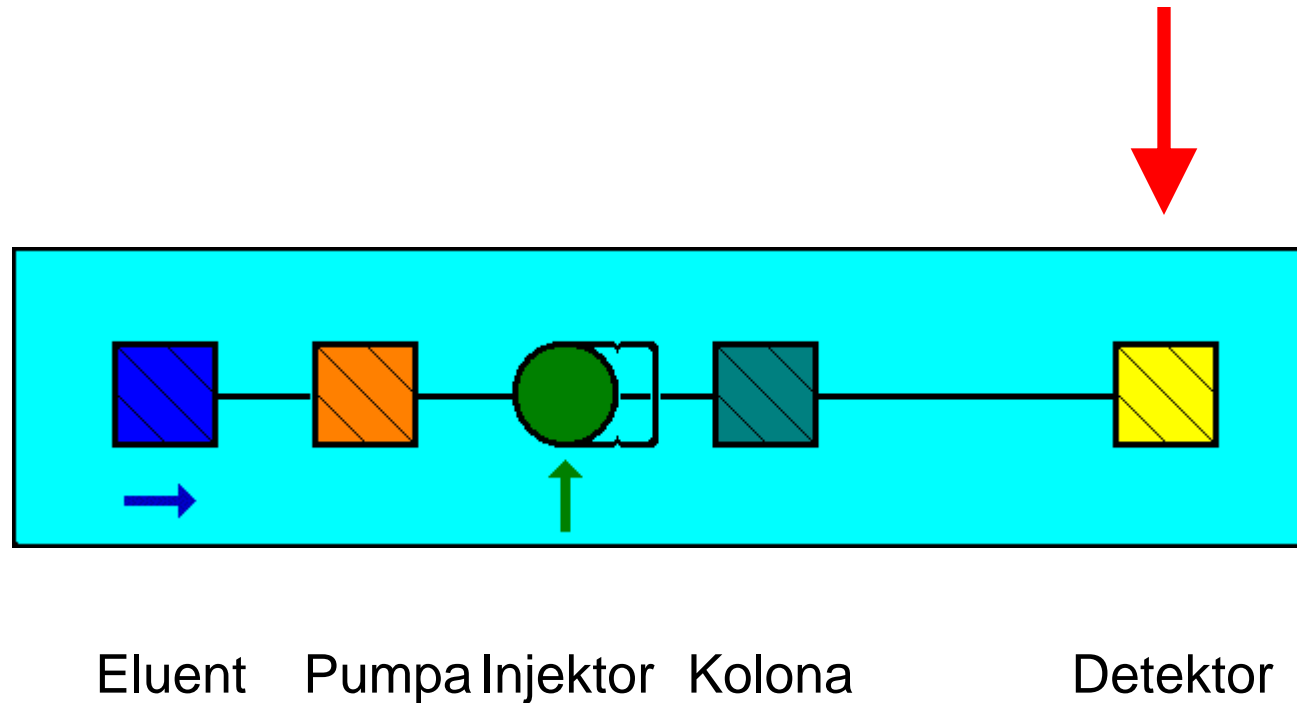
Anjoni

- Anjoni interaguju sa kiselim grupama na stacionarnoj fazi. Zbog različite jačine vezivanja (konstante ravnoteže jonske izmene) oni će, ranije ili kasnije, biti eluirani pomoću nadolazećih karbonatnih ili hidroksilnih jona iz eluenta.

Razdvajanje

- Različite ravnotežne konstante jonske izmene ispitivanih **katjona** ili **anjona** dovode do različitih retencionih vremena što znači do razdvajanja substancija koje su «hemijski vrlo slične».

Detekcija



Detekcija

Tipovi detekcije

- **Konduktivitetni detektor**
- Amperometrijski detektor
- **UV/VIS detektor**
- Maseno spektrometrijski detektor



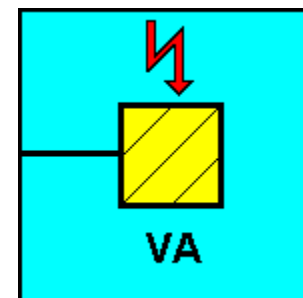
Elektrohemijska (VA)

Merni princip

Između elektroda u troelektrodnoj ćeliji, koja se sastoji od referentne, radne i pomoćne elektrode, dovodi se određeni napon (razlika potencijala). Ako neka oksidizabilna ili reducibilna supstanca prolazi kroz ćeliju doći će do procesa elektrohemijske oksidacije ili redukcije. Meri se struja koja odgovara koncentraciji supstance koja se oksiduje ili redukuje.

Jednostavno priključivanje (na kraju) bilo kojeg IC- ili HPLC-sistema

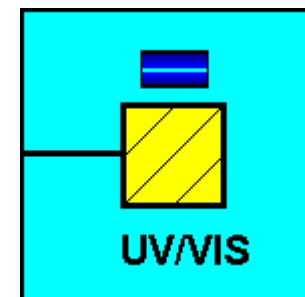
- Veliki izbor elektrodnih materijala (staklasti ugljenik, karbonska pasta, Ag, Au, Pt, itd.)
- Visoko osetjiva
- Veoma selektivna
- Destruktivna metoda



UV/VIS

Karakteristike

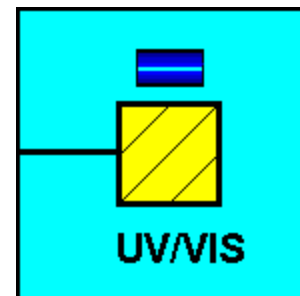
- Osetljiva za jone koji apsorbuju UV/VIS svetlost, npr. **nitriti, nitrati, tiosulfati**
- Skoro bez interferencija od strane nehromoforskih jona, npr. hlorida, sulfata
- Eluent mora da bude UV/VIS-transparentan
- Ograničene mogućnosti za korišćenje organskih modifikatora
- Uglavnom nedestruktivna metoda



Indirektna UV/VIS

Karakteristike

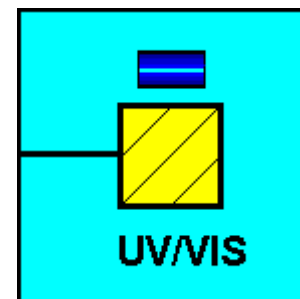
- UV/VIS-apsorbujući eluent, npr. ftalna kiselina
- Anjoni koji se detektuju ne apsorbuju primenjenu monohromatsku svetlost
- Detektor mora da bude vrlo osetljiv jer se merenje vrši sa veoma malim intenzitetom svetlosti
- Osetljivost je manja nego kod konduktometrijske detekcije



UV/VIS sa poslekolonskom reakcijom (pcr)

Karakteristike

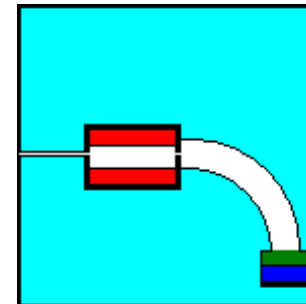
- Selektivna određivanja
- Duže traje (uključuje hemijsku reakciju)
- Složeniji instrumentalni sistem
- Dodatno širenje pikova
- Koristi se kao poslednja alternativa



IC/MS

Karakteristike

- Kvalitativna i kvantitativna analiza
- Elementalna analiza
- Određivanje fragmenata molekula



Conductivity

What is conductometry?

Conductometry is the measurement of **conductivity** – a **conductometric** detector measures the electrical **conductivity** of ions in a solution. This is done by applying an electrical field between two electrodes. The ions migrate in this field. The anions migrate to the anode and the cations to the cathode. The electrical resistance of the solution is measured. The **conductivity** is the reciprocal of the resistance. Alternating current is used in order to avoid substance changes and the formation of diffusion boundary layers at the electrodes.

$$\kappa = \frac{1}{R} * K_c$$

R = resistance [Ω]

K_c = cell constant [1/cm]

κ = specific conductivity [1/ Ω or S]

Conductivity

What is specific conductivity?

The specific conductivity κ of an eluting ion depends on the concentration c of the individual ions i , the charge Z_i , and the equivalent conductivity Λ_i . The equivalent conductivity Λ_i is a concentration-dependent quantity. The values listed can be applied for concentrations below 0.001 mol/L. Z_i is the charge of the respective ion.

$$\kappa = \sum (\Lambda_i * z_i * c_i)$$

Λ_i = equivalent conductivity [S*cm²/mol]

Z_i = charge []

c_i = concentration [mol/L]

κ = specific conductivity [1/ Ω or S]

Σ = sum of all ions – anions and cations

Conductivity

Values for equivalent conductivity

| Anions | | Cations | |
|--------------------------------|-----|------------------------------|-----|
| OH ⁻ | 198 | H ⁺ | 350 |
| F ⁻ | 54 | Li ⁺ | 39 |
| Cl ⁻ | 76 | Na ⁺ | 50 |
| Br ⁻ | 78 | K ⁺ | 74 |
| I ⁻ | 77 | NH ₄ ⁺ | 73 |
| NO ₂ ⁻ | 72 | ½Mg ²⁺ | 53 |
| NO ₃ ⁻ | 71 | ½Ca ²⁺ | 60 |
| HCO ₃ ⁻ | 45 | Sr ²⁺ | 59 |
| ½CO ₃ ²⁻ | 72 | ½Ba ²⁺ | 64 |
| ½SO ₄ ²⁻ | 80 | ½Zn ²⁺ | 53 |
| ½Phthalate | 38 | ½Cu ²⁺ | 55 |

[c] < 0.001 mol/L; Λ_{∞} = equivalent conductivity [S*cm²/mol]

Conductivity

What influences the measured value?

• the concentration $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ which is the actual result

• the equivalent conductivity of the respective ions

• the charge of the respective ions

• the cell constant $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ which are constant

• the temperature $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ which should be constant

$$\kappa = \frac{1}{R} * K_c$$

$$\kappa = \sum (\Lambda_i * z_i * c_i)$$

$$\kappa_{El.} = c_{El.}^+ * \Lambda_{El.}^+ + c_{El.}^- * \Lambda_{El.}^-$$

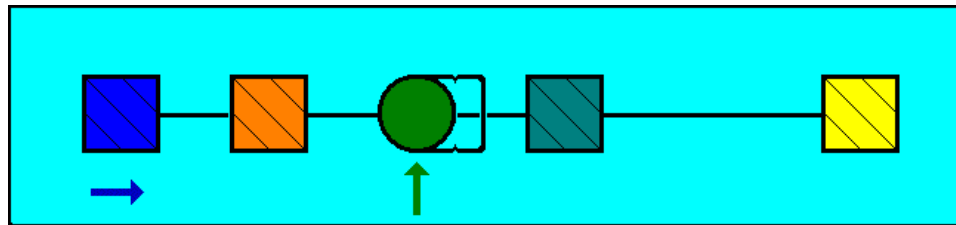
$$\Lambda \approx T \approx 2 \% / ^\circ\text{C}$$

Chemical suppression

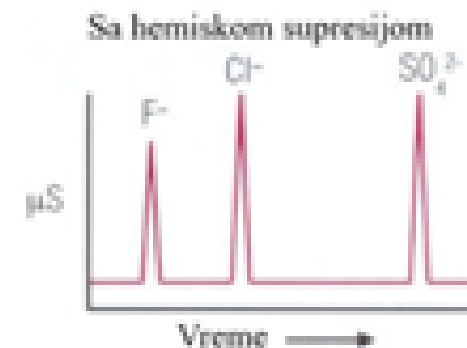
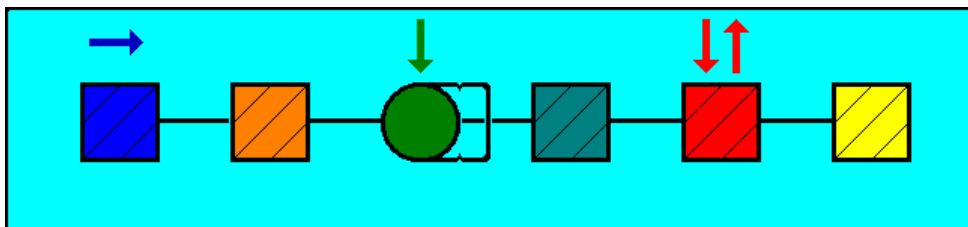
IC IC IC^{IC}
IC IC

With or without?

Ion chromatography without suppression



Ion chromatography with suppression



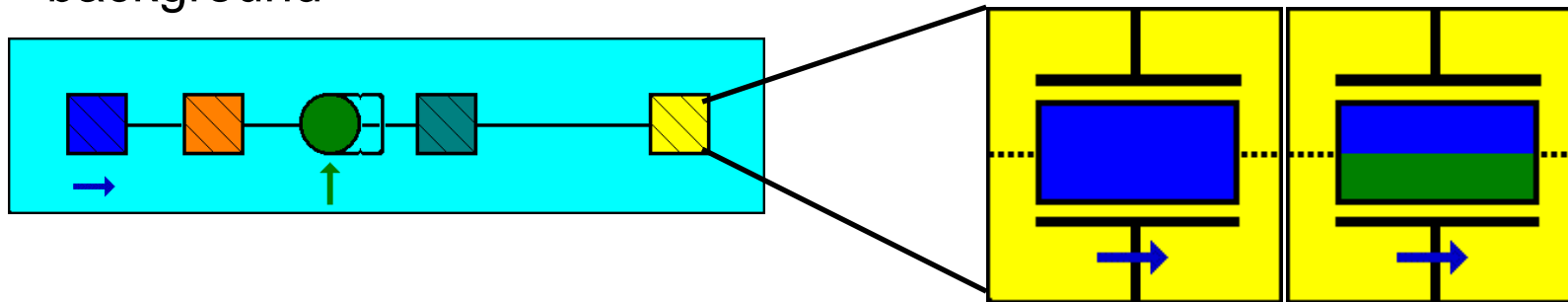
Chemical suppression

IC IC IC^{IC}
IC IC

Without

Characteristics

- Background conductivity = **eluent**
- Conductivity in a peak = **eluent** plus **sample**
- Measured value = difference between **eluent** plus **sample** and background

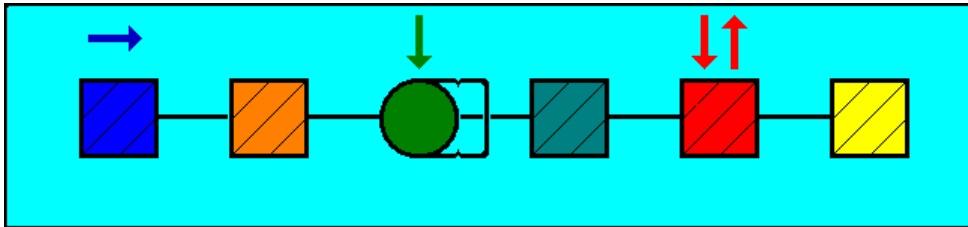


$$K_{Det.} = K_{Peak} - K_{El.}$$

Chemical suppression

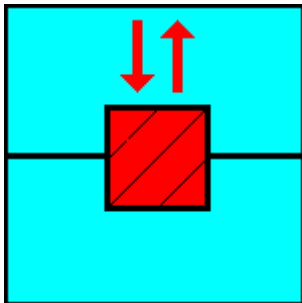
With

Ion chromatography with chemical suppression



Suppression reduces the background conductivity.

Suppression changes the counter ions in the sample.



In **cation** chromatography an **anion exchanger** is used
– all anions are replaced by OH^-
in **anion** chromatography a **cation exchanger** is used
– all cations are replaced by H^+

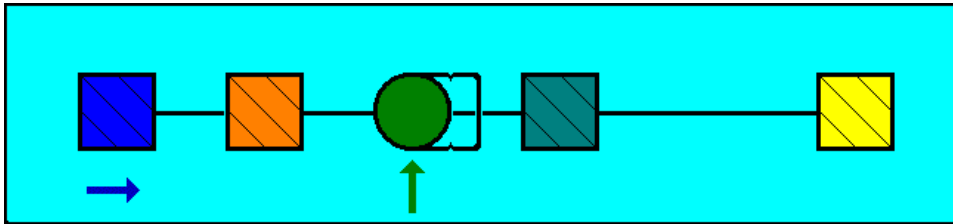
By this reaction an eluent with high conductivity is transferred to water (+ $\text{CO}_2 \uparrow$) which is of low conductivity.

Chemical suppression

IC IC IC^{IC}
IC IC

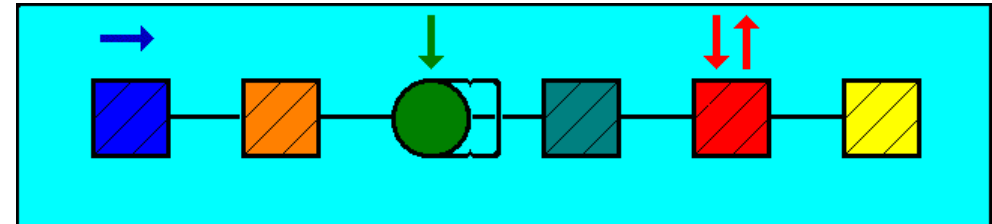
Comparison

IC without suppression



- high background conductivity
- anions with low sensitivity
- cations with high sensitivity
- high linearity in calibration
- low cost set up
- freedom of choice for eluents

IC with suppression

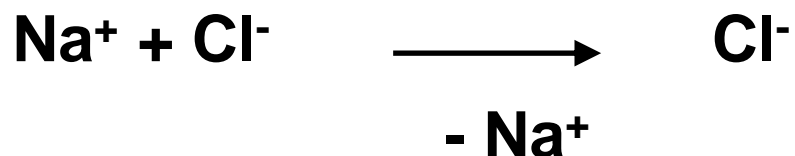
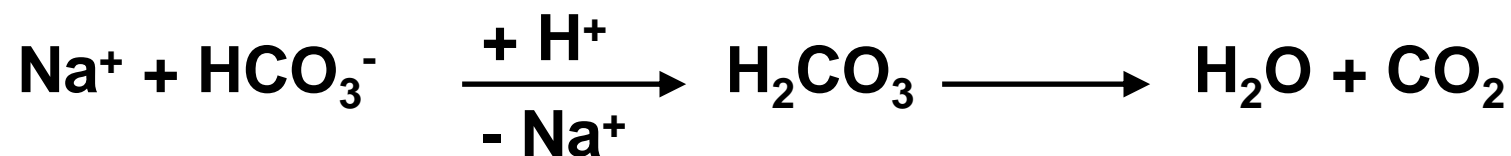


- low background conductivity
- anions with high sensitivity
- (detection limits 2-4 x lower)
- cations with high sensitivity
- non linear calibration
- more expensive set up
- eluents must react to H₂O

Theory and system setup of IC

Suppressed or non suppressed IC?

Suppressed conductivity

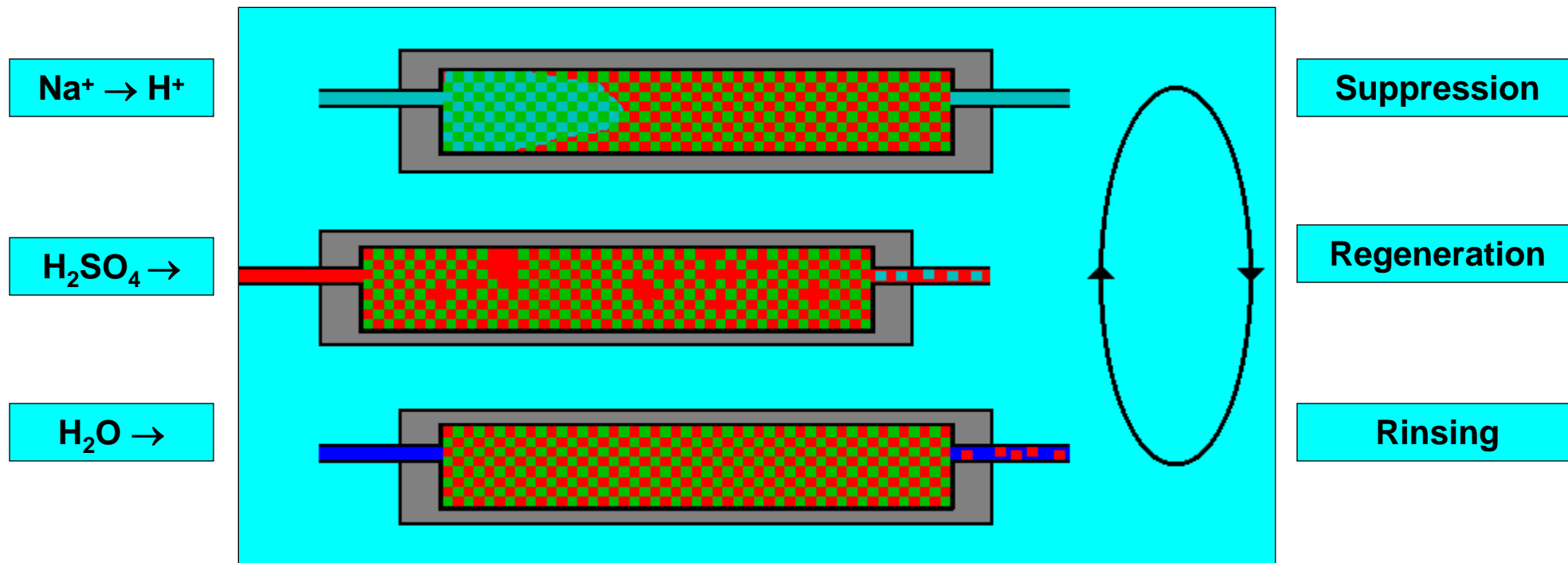


By this reaction an eluent with high conductivity is transferred to water (+ CO₂↑) which is of low conductivity.

Suppressors

IC IC IC^{IC}
IC IC

Metrohm Suppressor Module «MSM»

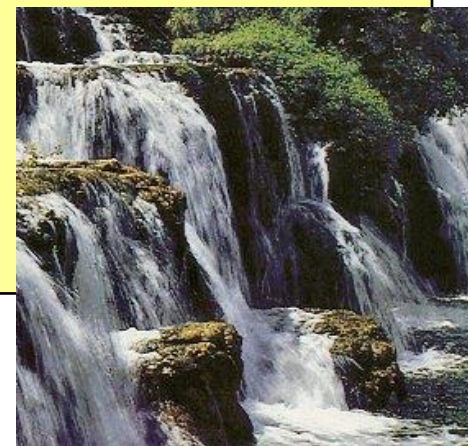


«Metrohm Suppressor Module» for **anions**
«Packed bed suppressor»



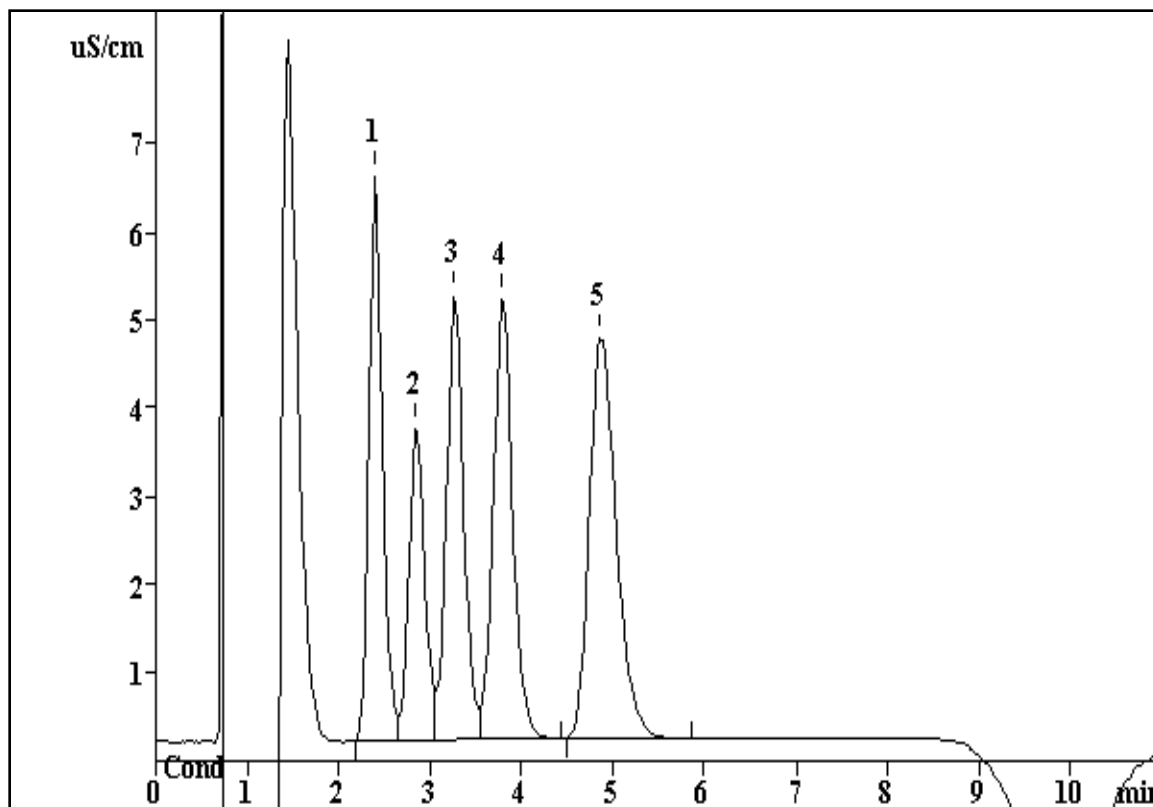
- **Applications for anions and cations analysis**

- a. Tap, process, waste, enviromental, ultra pure water
- b. Food
- c. Beverages
- d. Pharmaceuticals



Non suppressed anions

- Standard anions

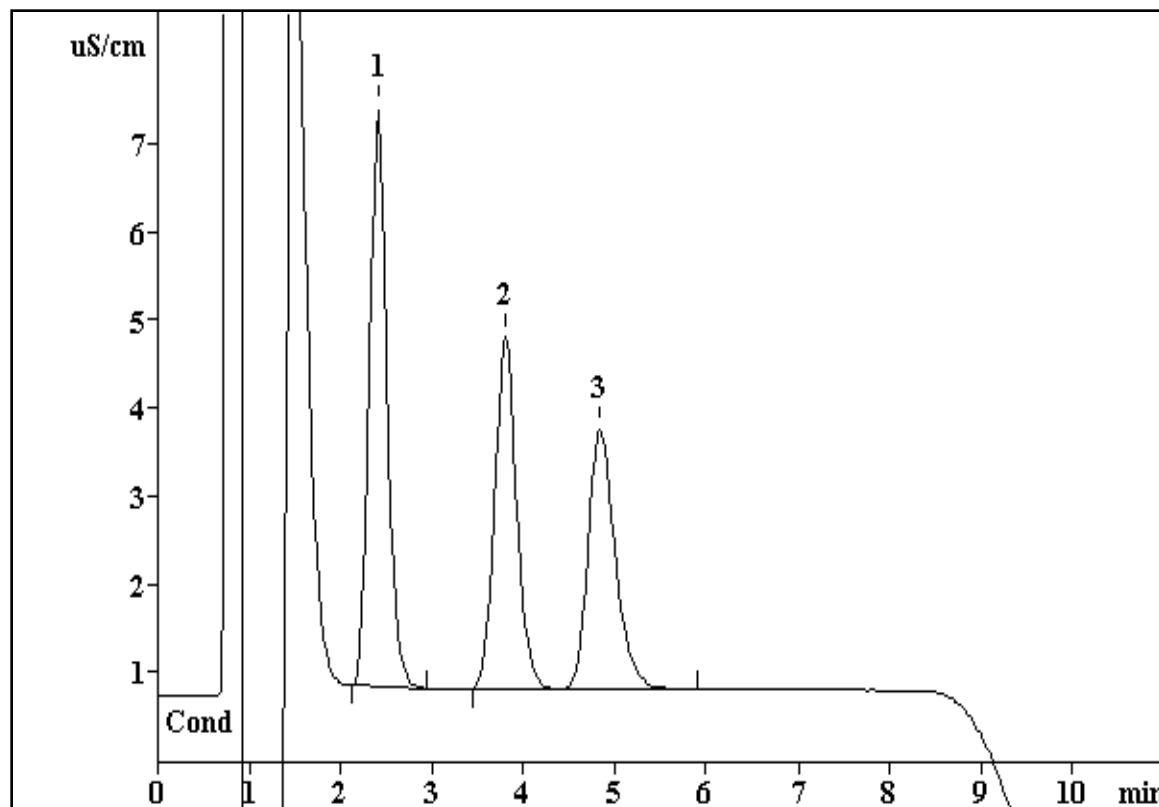


| Metrosep Dual 1 – 70 | | |
|----------------------|----------|-------|
| No | Ion | ppm |
| 1 | Chloride | 5.00 |
| 2 | Nitrite | 5.00 |
| 3 | Bromide | 10.00 |
| 4 | Nitrate | 10.00 |
| 5 | Sulfate | 10.00 |
| 6 | System | - |

Phthalic acid/acetonitrile: 8.0/2.0 mmol/L/% (TRIS pH = 4.0)

Non suppressed anions

• Tap water

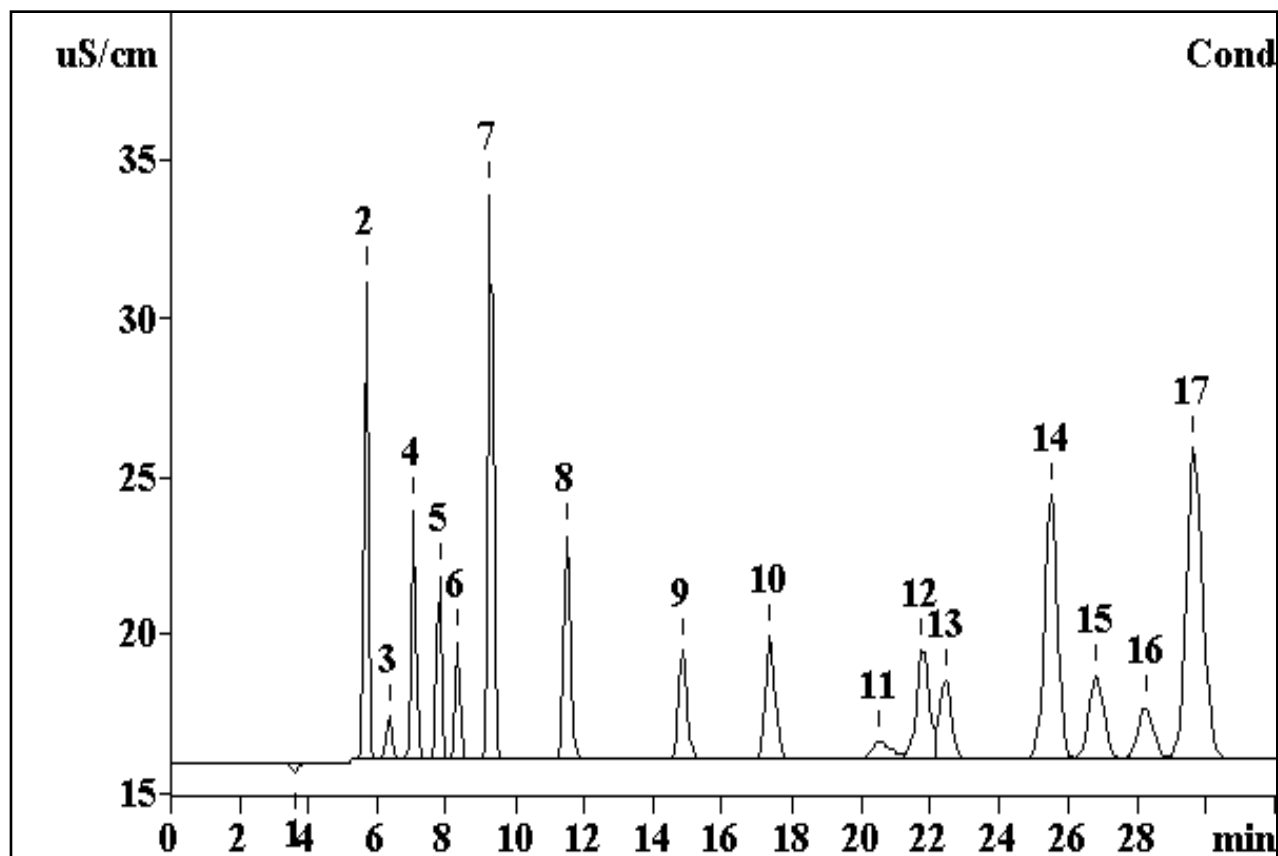


| Metrosep Dual 1 – 70 | | |
|----------------------|----------|------|
| No | Ion | ppm |
| 1 | Chloride | 6.65 |
| 2 | Nitrate | 8.94 |
| 3 | Sulfate | 6.56 |

Phthalic acid/acetonitrile: 8.0/2.0 mmol/L/% (TRIS pH = 4.0)

Suppressed anions

•Standard

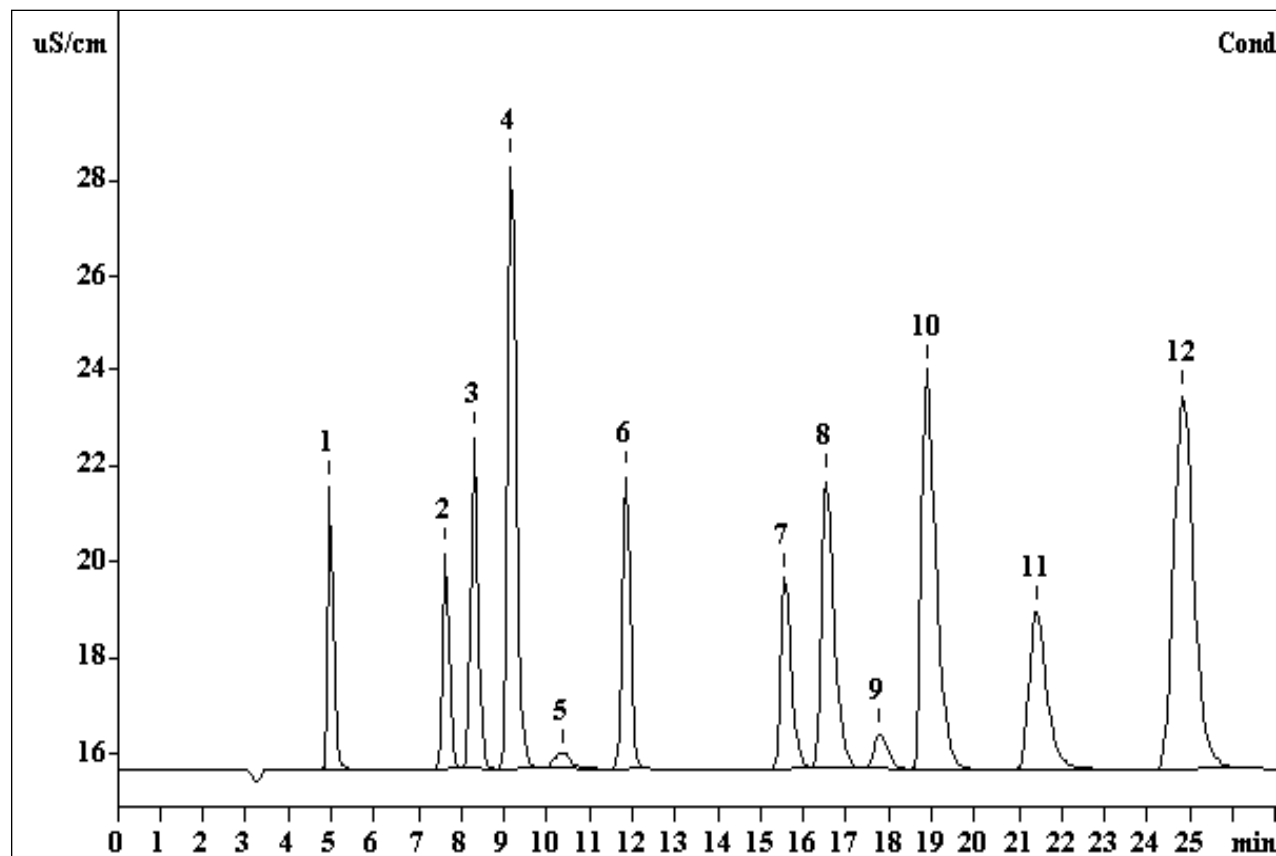


A Supp 5 – 250; $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$: 1.0/3.2 mmol/L

| No | Ion | ppm |
|----|-----------|-------|
| 2 | Fluoride | 5.00 |
| 3 | Acetate | 1.00 |
| 4 | Formate | 4.00 |
| 5 | Chlorite | 3.00 |
| 6 | Bromate | 2.00 |
| 7 | Chloride | 10.00 |
| 8 | Nitrite | 5.00 |
| 9 | Bromide | 3.00 |
| 10 | Nitrate | 4.00 |
| 11 | Benzoate | 1.00 |
| 12 | Phosphate | 5.00 |
| 13 | Selenite | 3.00 |
| 14 | Sulfate | 10.00 |
| 15 | Succinate | 4.00 |
| 16 | Arsenate | 3.00 |
| 17 | Oxalate | 15.00 |

Suppressed anions

• Oxohalides, EPA 300.1



Na_2CO_3 : 3.6 mmol/L; 45 °C

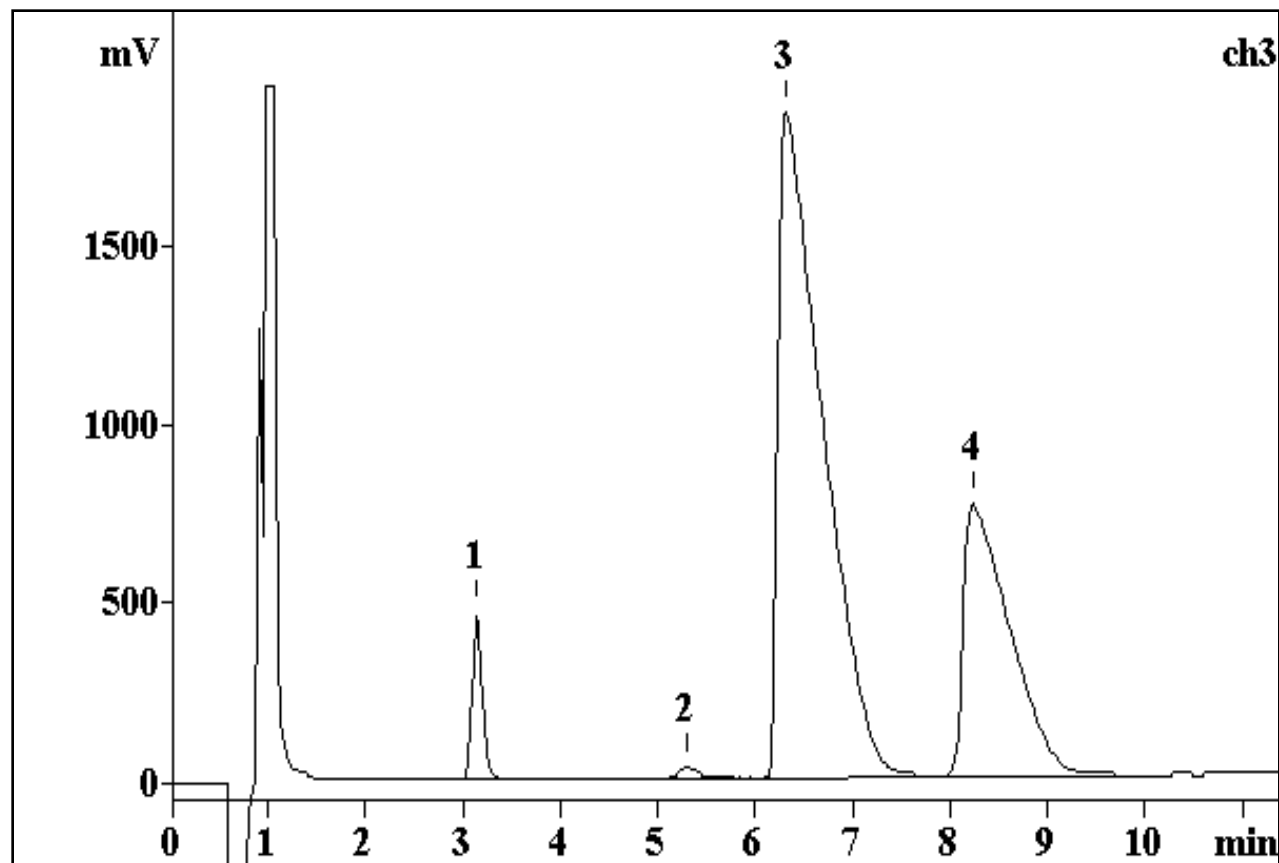
A Supp 7 – 250

Tap water + spiked

| | Ion | [ppm] |
|----|-----------|-------|
| 1 | Fluoride | 2.08 |
| 2 | Chlorite | 10.00 |
| 3 | Bromate | 20.00 |
| 4 | Chloride | 7.17 |
| 5 | Carbonate | n.q. |
| 6 | Nitrite | 10.00 |
| 7 | Bromide | 10.00 |
| 8 | Chlorate | 20.00 |
| 9 | DCA | 5.00 |
| 10 | Nitrate | 16.76 |
| 11 | Phosphate | 20.42 |
| 12 | Sulfate | 20.30 |

Cations

• Tap water



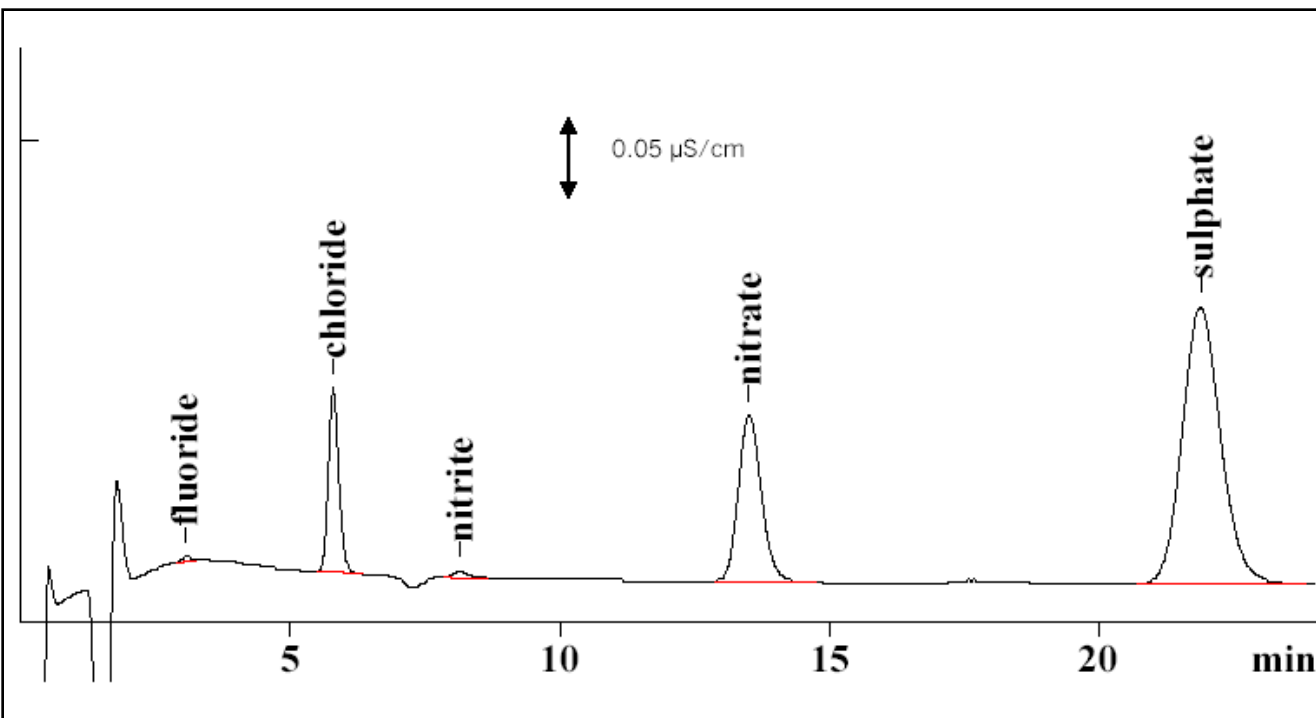
Tartaric acid/dipicolinic acid: 4/0.75 mmol/L

| Metrosep C 2 – 100 | | |
|--------------------|-----------|-------|
| No | Ion | ppm |
| 1 | Sodium | 4.78 |
| 2 | Potassium | 1.45 |
| 3 | Calcium | 92.97 |
| 4 | Magnesium | 19.46 |

Suppressed Anions

IC IC IC IC

•Rain water



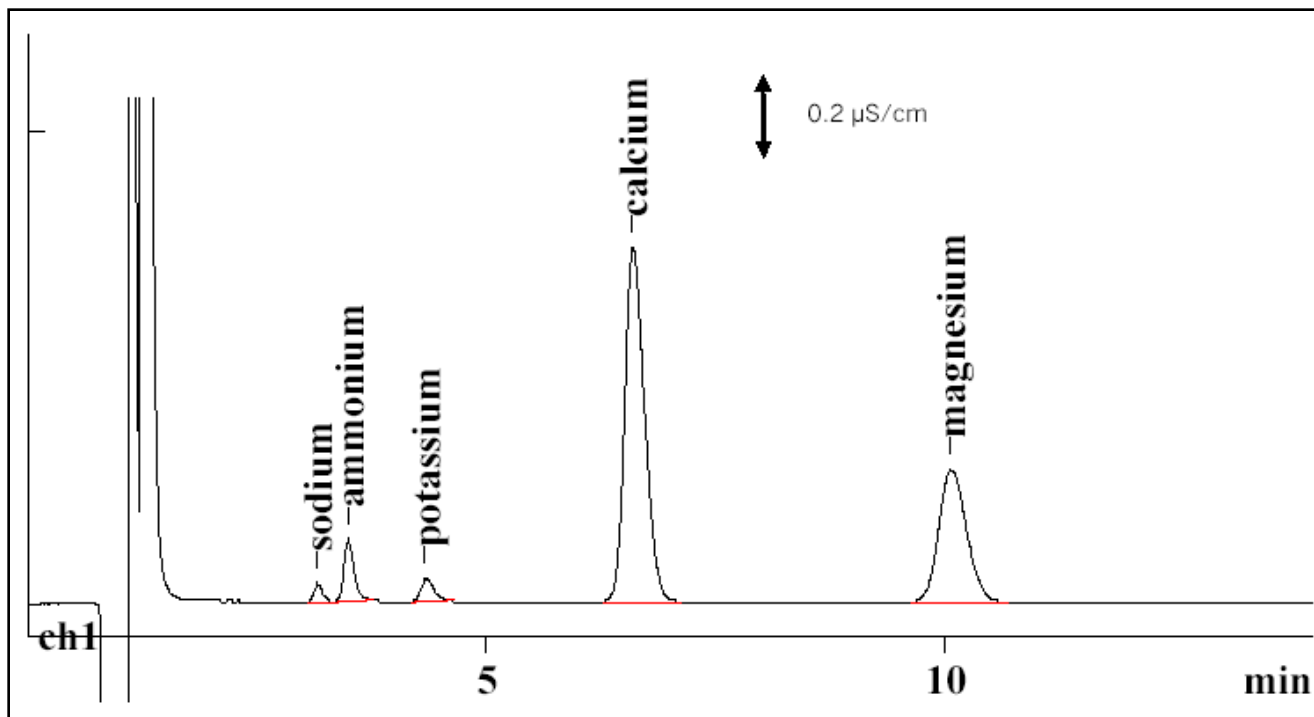
$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$: 2.0/1.3 mmol/L

| Anion Dual 2 | | |
|--------------|----------|-------|
| | Ion | [ppb] |
| 1 | Fluoride | 4 |
| 2 | Chloride | 174 |
| 3 | Nitrite | 35 |
| 4 | Nitrate | 674 |
| 5 | Sulfate | 1422 |

Cations

IC IC IC^{IC}
IC IC

•Rain water

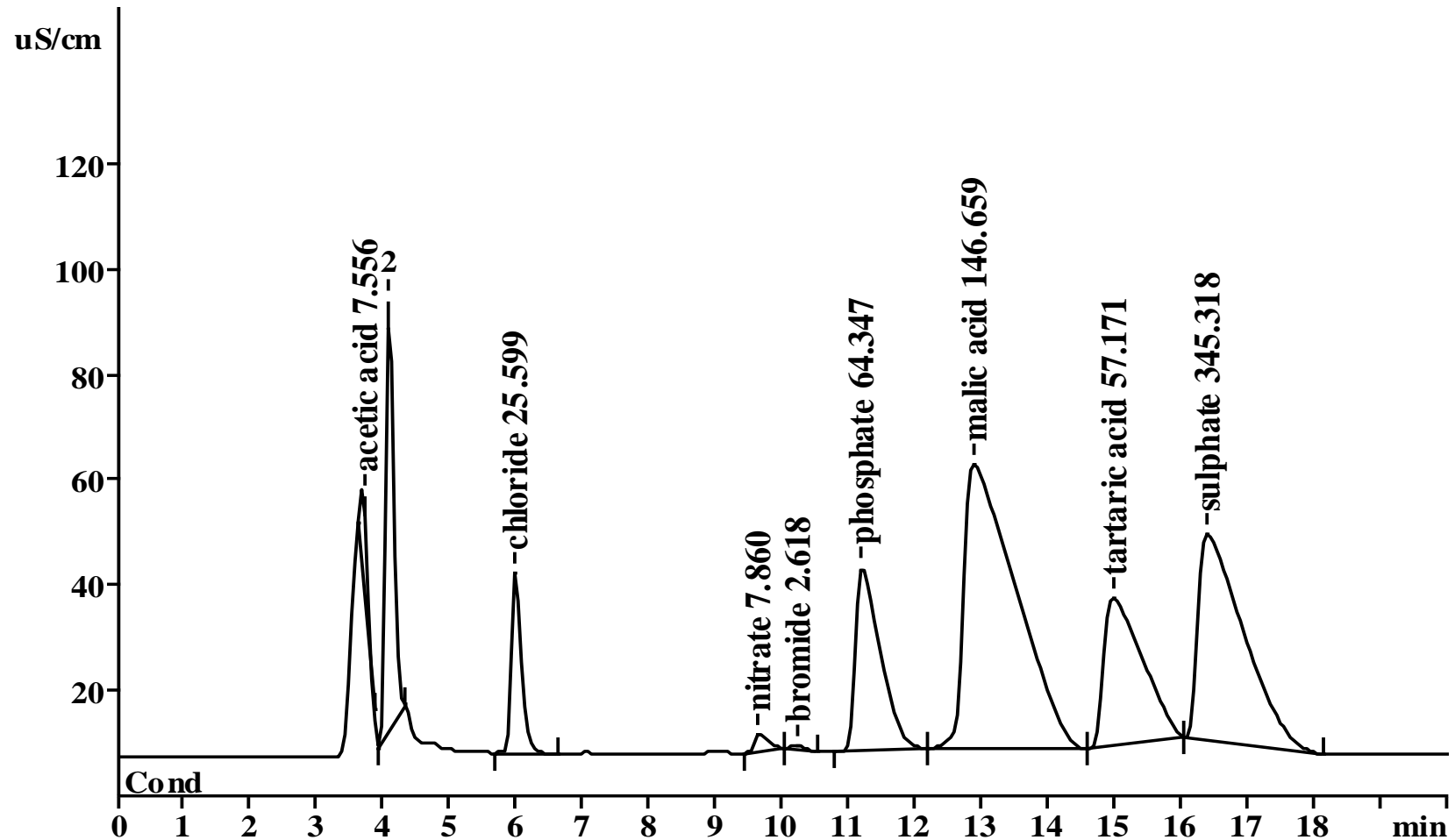


Tartaric acid/dipicolinic acid: 4.0/1.0 mmol/L

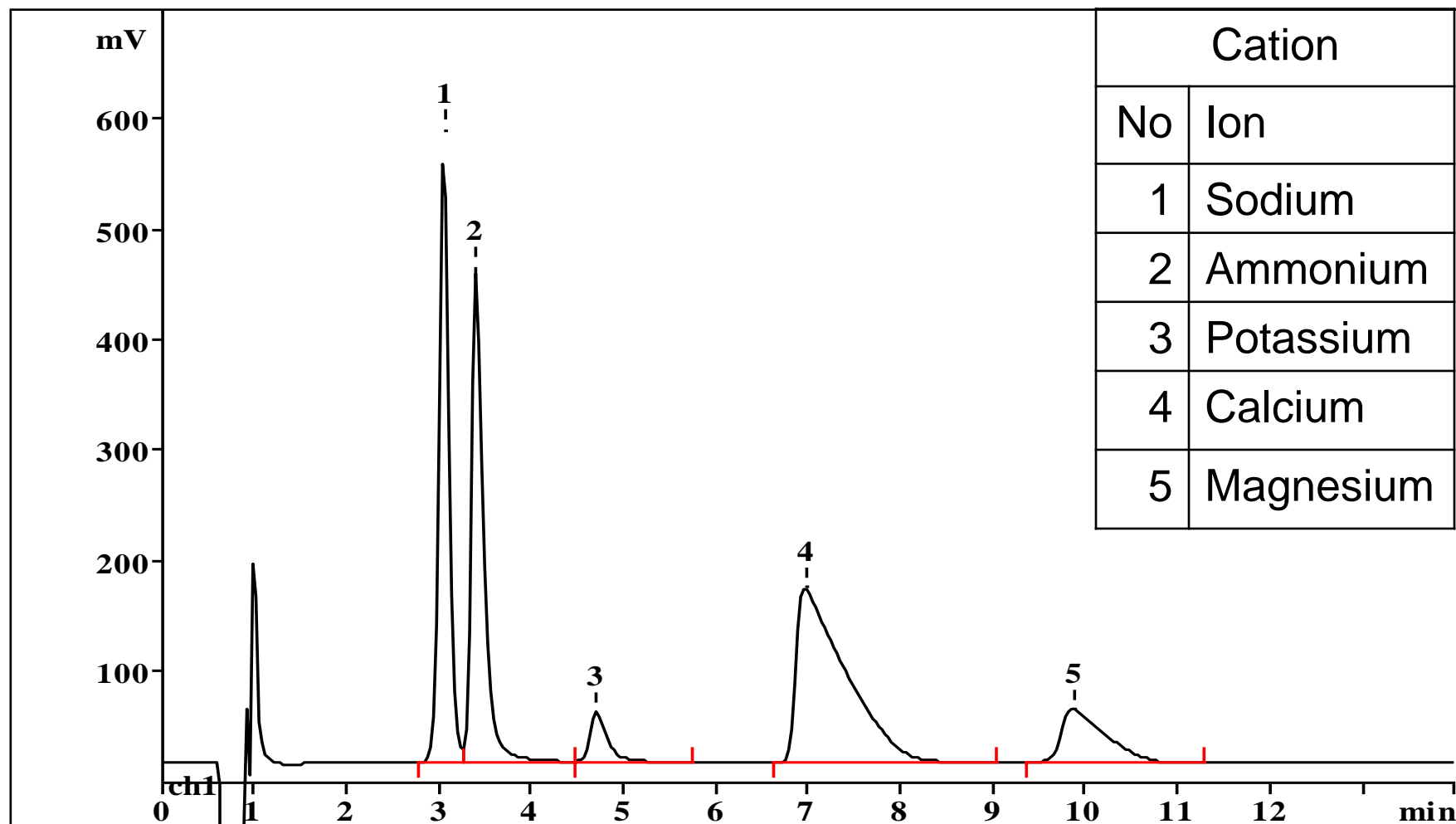
| Cation 1 -2 | | |
|-------------|-----------|-------|
| No | Ion | [ppm] |
| 1 | Sodium | 0.07 |
| 2 | Ammonium | 0.26 |
| 3 | Potassium | 0.32 |
| 4 | Calcium | 4.18 |
| 5 | Magnesium | 1.04 |

Food analysis

- Chromatogram of grape nectar



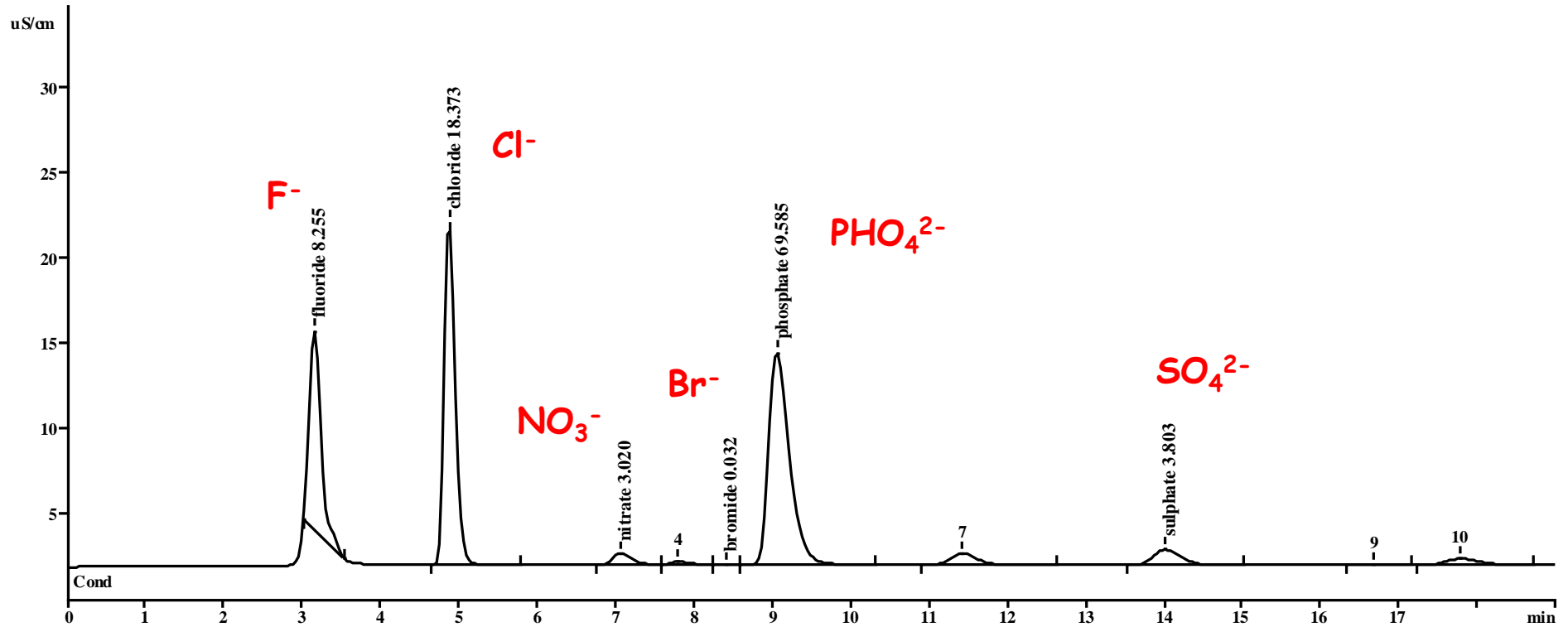
Chromatogram of cations in cheese



Food analysis

Ohmeljena sladovina

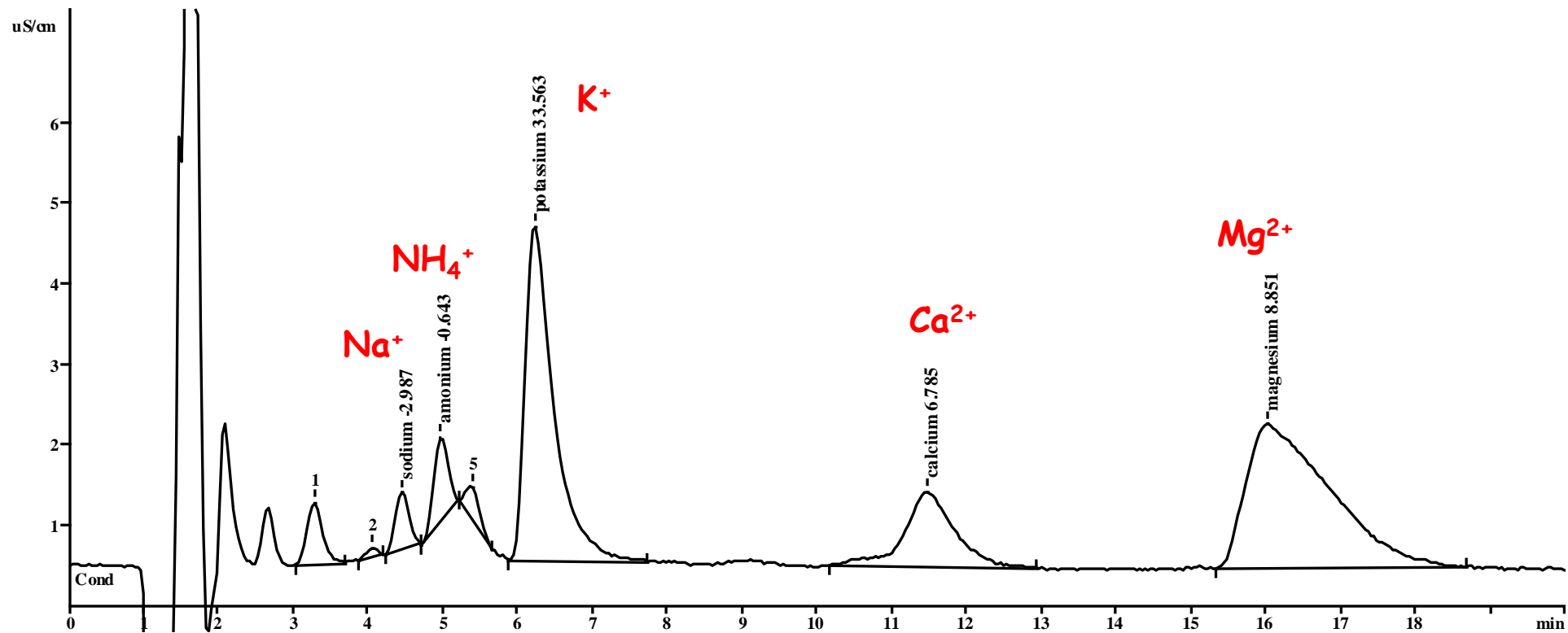
IC IC IC IC



Food analysis

IC IC IC IC

Pasterizovano pivo



Food analysis



Milk (in powder)

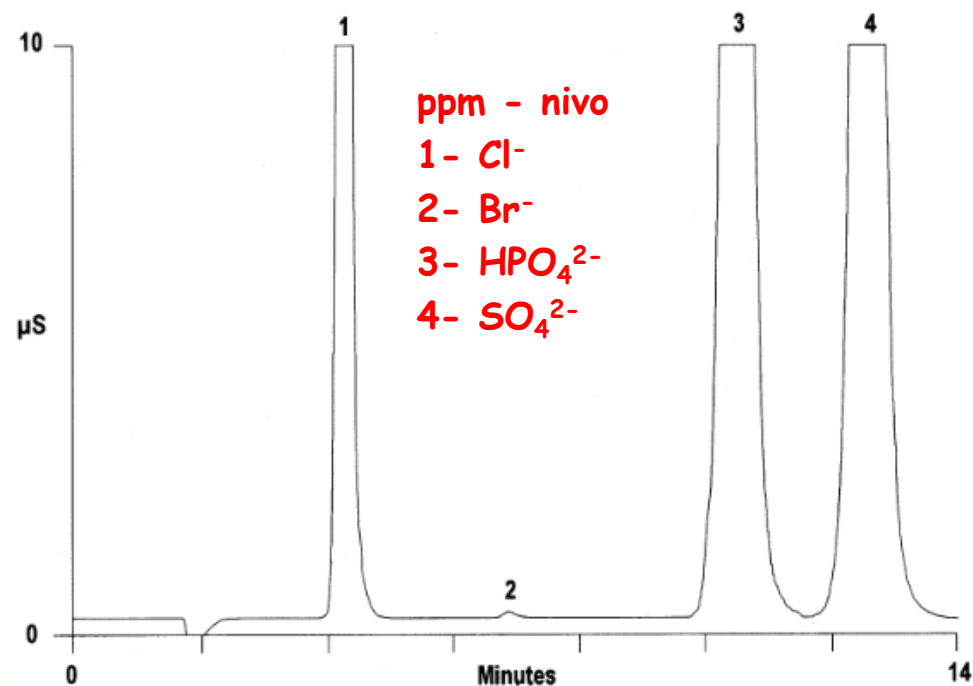
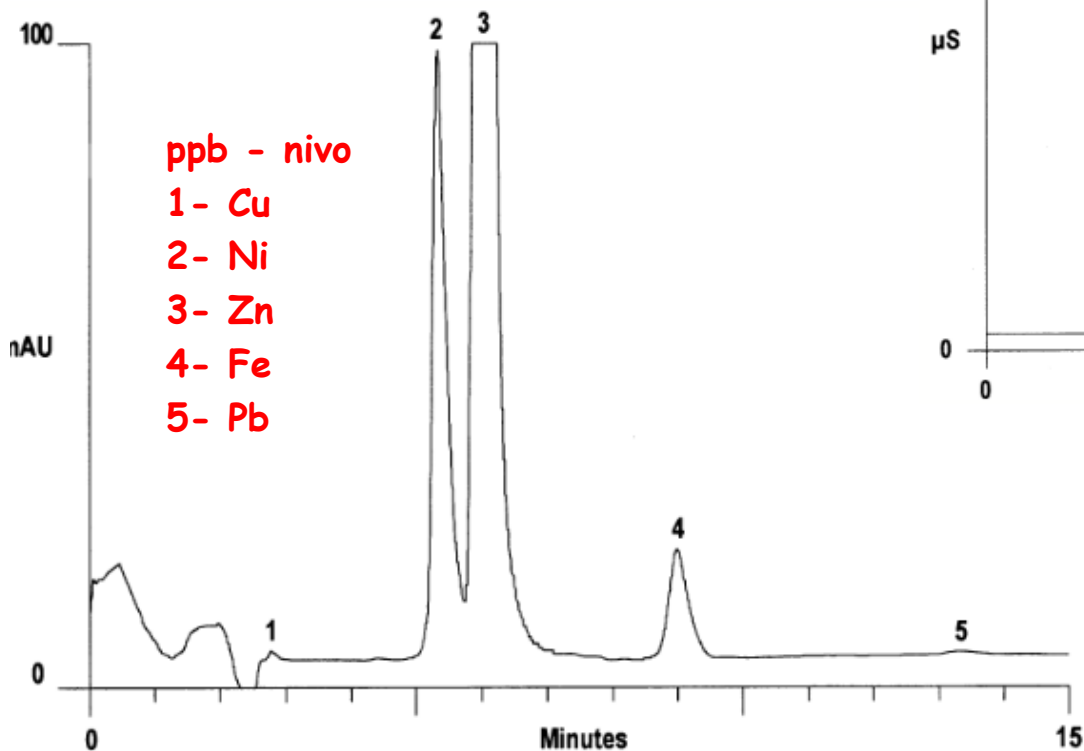
| | Cl^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} | Cu(II) , Cd(II) , Ni(II) , Zn(II) , Co(II) , Fe(III) , Pb(II) | |
|---|---|---|--|
| Column | IonPac AG14+AS14 | IonPac CG5A+CS5A | |
| Eluent | 3.5 mM Na_2CO_3 1.0 mM NaHCO_3 | <i>A</i> | <i>B</i> |
| | | 28 mM oxalic acid 45 mM NaCl 116 mM NaNO_3 40 mM HCl | 28 mM oxalic acid 45 mM NaCl 265 mM NaNO_3 40 mM HCl |
| Gradient | | | |
| 0 min | – | 100% | 0% |
| 9 min | – | 0% | 100% |
| Eluent flow rate (ml min^{-1}) | 1.2 | 1.0 | |
| Injection volume (μl) | 25 | 750 | |
| Detection | Suppressed conductivity | Spectrophotometry (530 nm) | |
| Post-column reagent | – | 0.4 mM PAR 1 M 2-dimethylaminoethanol 0.5 M NH_4OH 0.3 M NaHCO_3 (pH 10.4) | |
| PCR flow rate (ml min^{-1}) | – | 0.6 | |

Microchemical Journal 72 (2002) 277–284

Food analysis

Milk (in powder)

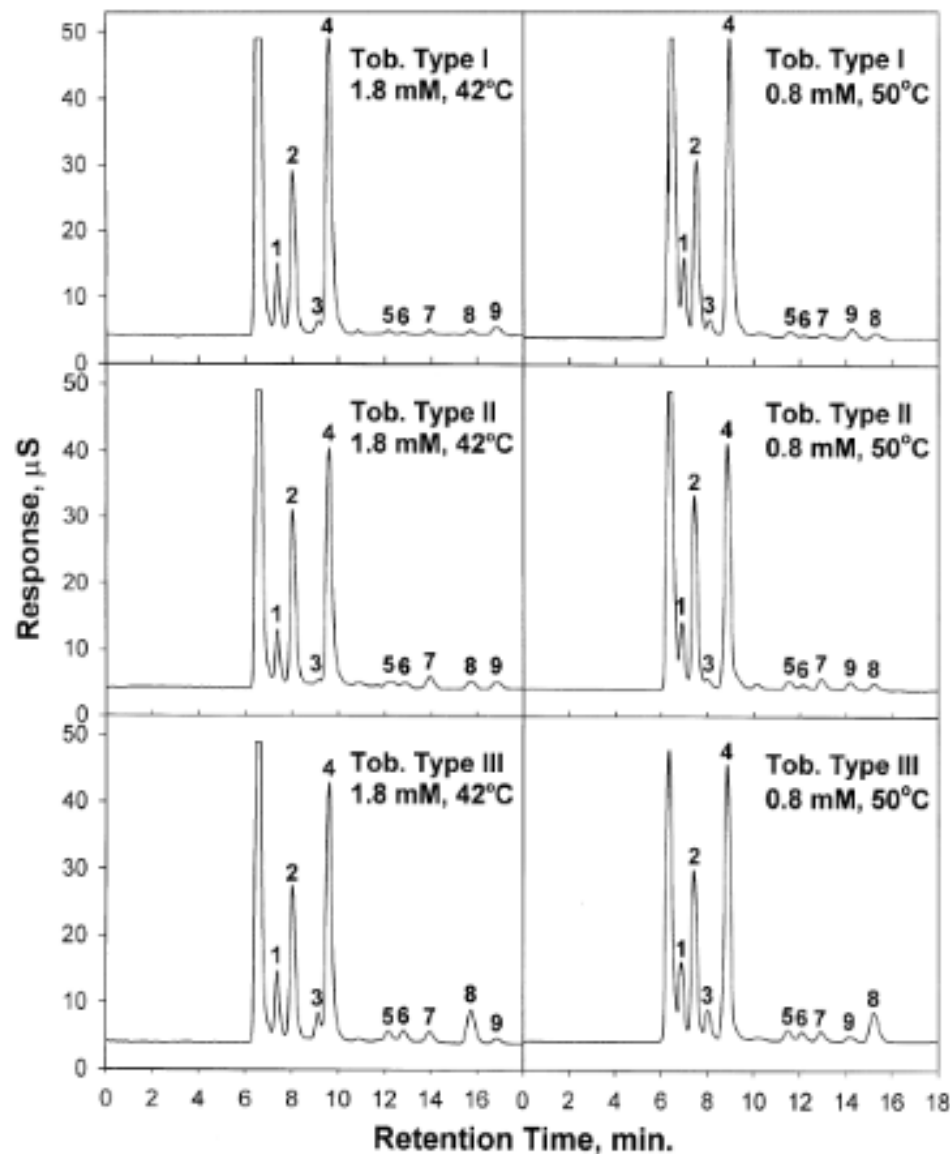
IC IC IC IC



Microchemical Journal 72 (2002) 277–284

Tobaco

IC IC IC^{IC}
IC IC

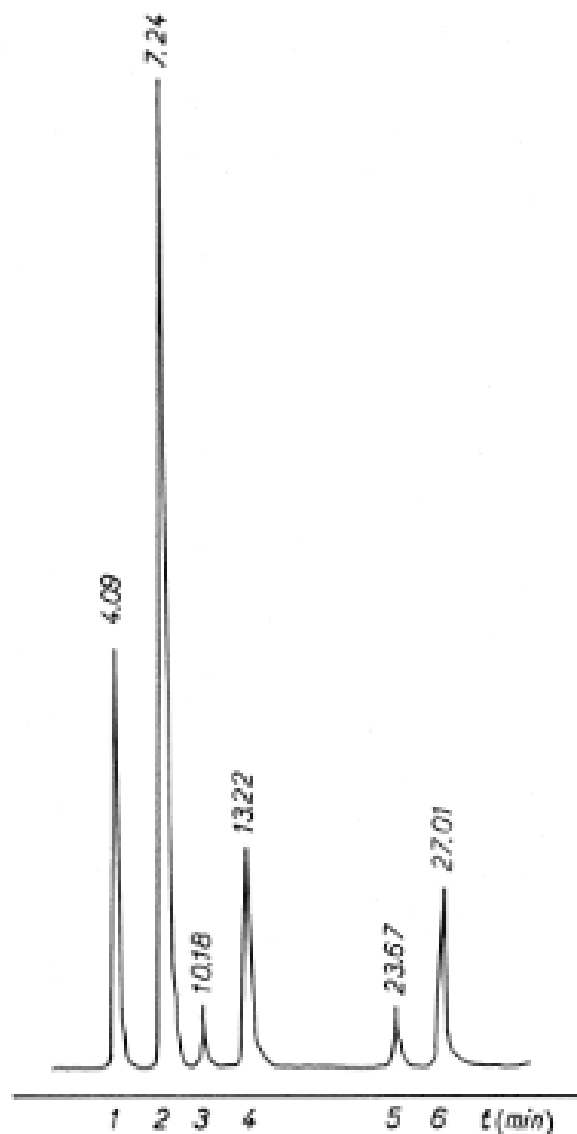


- 1 – fosfat-jon
- 2 - citrat-jon
- 3 - malat-jon
- 4 - sukcinat-jon
- 5 - laktat – jon
- 6 – formijat-jon
- 7 – acetat-jon
- 8 – piroglutaminat-jon

Journal of Chromatography A, 950 (2002) 81–88

Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals

IC IC IC IC



- 1 – B₃
- 2 – *p*-aminobenzoeva kiselina
- 3 – B₆
- 4 – standard (fenol)
- 5 – B₁
- 6 – B₂

in Beviplex[®] coated tablets. Mobile phase: hexanesulphonic acid sodium salt and triethanolamine in water–methanol (92:8 v/v) for the first ten minutes and (82.8:17.2 v/v) to the end of the separation. pH was adjusted to 2.8 with orthophosphoric acid. Phenol was used as an internal standard. The flow rate was 2 ml min⁻¹ and UV detection was performed at 280 nm, at room temperature.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
18 (1999) 999–1004

Hvala na pažnji