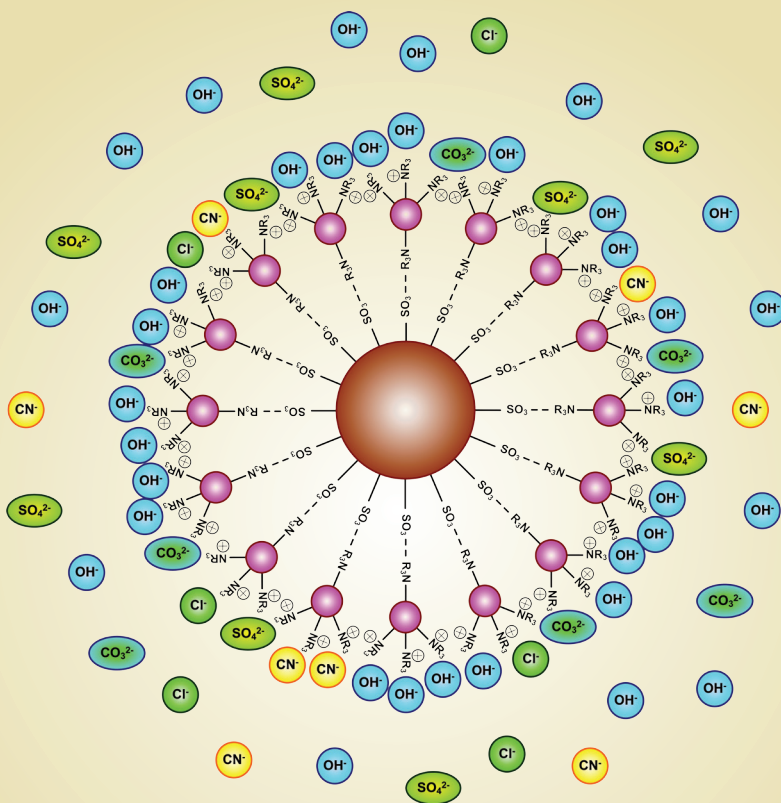




SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

TOMISLAV BOLANČA • ŠIME UKIĆ

IONSKA KROMATOGRAFIJA



UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM ZAGRABIENSIS



Copyright © 2015.
Sva prava pridržana.

Nakladnik

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

Autori

Prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
Doc. dr. sc. Šime Ukić

Recenzenti

Prof. dr. sc. Njegomir Radić
Prof. emeritus dr. sc. Marija Kaštelan-Macan
Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Crteže izradio

Doc. dr. sc. Šime Ukić

Lektura

Audentia d.o.o. za trgovinu i usluge

Senat sveučilišta u Zagrebu na temelju članka 13. i 14. Pravilnika o sveučilišnoj nastavnoj lituri Sveučilišta u Zagrebu i članka 21. Statuta Sveučilišta u Zagrebu, sukladno članku 58. Zakona o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju, na sjednici održanoj 10. ožujka 2015. odobrio je knjizi Ionska kromatografija korištenje naziva sveučilišni udžbenik (*Manualia Universitatis studiorum Zagrabiensis*)
Klasa: 032-01/14-01/45
Urbroj: 380-072/221-15-3

Knjiga je izdana u prosincu 2015.

ISBN: 978-953-6470-70-9

Tomislav Bolanča

Šime Ukić

IONSKA KROMATOGRAFIJA

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

PREDGOVOR	I
------------------------	----------

1. UVOD U IONSKU KROMATOGRAFIJU	1
1.1. Povijesni pregled razvitka ionske kromatografije	2
1.2. Ionski kromatografski sustav	4
 2. POKRETNOST FAZA	 6
2.1. Crpke	6
2.2. Prigušivač pulsova	7
2.3. Gradijentno eluiranje	9
2.4. Gradijentno miješanje eluensa	11
2.4.1. Miješanje eluensa pri visokom tlaku	11
2.4.2. Miješanje eluensa pri niskom tlaku	12
2.5. <i>Online</i> priprava eluensa	13
2.5.1. Priprava KOH eluensa	13
2.5.2. Priprava metansulfonskog eluensa	15
2.5.3. Priprava K ₂ CO ₃ eluensa	16
2.5.4. Priprava KHCO ₃ /K ₂ CO ₃ eluensa	17
2.6. Kolonske klopke	18
2.6.1. Anionska kolonska klopka	19
2.6.2. Kationska kolonska klopka	20
2.7. Otplinjač	21

3.	UZORAK	23
3.1.	Unošenje uzorka u ionski kromatografski sustav	23
3.2.	Priprema uzorka.....	24
3.2.1.	Upotreba kolona za uklanjanje nepoželjnih sastojaka matice	24
3.2.2.	Upotreba kolona za pretkoncentriranje analita	28
3.2.3.	<i>Online</i> priprema uzorka	28
4.	NEPOKRETNOST FAZA	29
4.1.	Ionski izmjenjivači	29
4.1.1.	Izmjenjivači s polimernim kosturom	30
4.1.2.	Izmjenjivači sa silikatnim kosturom.....	32
4.1.3.	Lateksni izmjenjivači.....	34
4.2.	Kapacitet.....	37
4.3.	Bubrenje i stupanj umreženosti	38
4.4.	Selektivnost	40
5.	IONSKO KROMATOGRFSKO ODJELJIVANJE ...	41
5.1.	Teorija odsječaka	51
5.2.	Teorija brzine.....	56
5.2.1.	Utjecaj efekta vrtložne difuzije.....	57
5.2.2.	Utjecaj uzdužne difuzije	60
5.2.3.	Utjecaj otpora međufaznom prijenosu.....	61
5.3.	Kapilarna ionska kromatografija	65
5.4.	Teorija linearne jakosti otapala.....	66
5.5.	Hooverova teorija	68
5.6.	Model dvaju kompeticijskih ionan eluensa	72

5.7.	Teorija višestrukih ionskih oblika eluensa i analita.....	74
5.8.	Teorija oblika kromatografske krivulje	79
6.	DETEKCIJA SIGNALA.....	86
6.1.	Povlačenje i šum signala	86
6.2.	Osjetljivost.....	87
6.3.	Linearno područje odziva	87
6.4.	Volumen protočne ćelije.....	88
6.5.	Elektrokemijske metode detekcije.....	89
6.5.1.	Konduktometrijska detekcija	89
6.5.1.1.	Ionska kromatografija bez supresora	94
6.5.1.2.	Ionska kromatografija s kemijskim supresorom.....	96
6.5.1.3.	Supresori.....	97
6.5.2.	Ampermetrijska detekcija.....	101
6.5.2.1.	Pulsna ampermetrijska detekcija	102
6.5.2.2.	Integrirana ampermetrijska detekcija	105
6.5.2.3.	Trodimenzijska ampermetrija.....	106
6.6.	UV/VIS metode detekcije.....	108
6.6.1.	Osnove UV/VIS spektrofotometrije	109
6.6.2.	Apsorbancija.....	111
6.6.3.	UV/VIS detekcija	112
6.6.4.	Detektor s nizom dioda.....	114
6.6.5.	Čistoća kromatografske krivulje.....	116
7.	RAZVOJ METODA.....	118
7.1.	Strategije razvoja ionskih kromatografskih metoda	119
7.1.1.	Metode slijednog planiranja eksperimenata	120

7.1.2.	Metode istodobnog planiranja eksperimenata	121
7.2.	Kriteriji uspješnosti odjeljivanja i vremena analize	121
7.3.	Simpleks metoda	126
7.4.	Genetički algoritmi	129
7.4.1.	Prirodni evolucijski procesi	129
7.4.2.	Genetički algoritmi	130
7.5.	Umjetne neuronske mreže	136
7.5.1.	Biološki neuron	136
7.5.2.	Umjetni neuron	138
7.5.3.	Umjetne neuronske mreže	139
8.	LITERATURA	143
9.	KAZALO POJMOVA.....	151
10.	POPIS POKRATA	161
	O AUTORIMA	163

PREDGOVOR

Iako je ionska kromatografija već duži niz godina prihvaćena kao standardna analitička tehnika (AOAC, ASTM, ISO, farmakopeja), njena popularnost i dalje raste. Razlog je tome što razvoj ionske kromatografije prati ostale tehnike tekućinske kromatografije, poput trenda umanjivanja sustava s ciljem poboljšanja kromatografske učinkovitosti te ekonomske i ekološke prihvatljivosti. Istodobno je korištenje višestruke detekcije odavno postalo nezaobilazni standard. Nadalje nekadašnju su striktnu podjelu kromatografije s obzirom na dominirajući mehanizam separacije zamijenili moderni koncepti dvodimenzijske kromatografije, poput isijecanja ili pak potpunog sprežanja. S obzirom na kompleksnost problematike danas je još važnije dobro razumjeti teoriju ionske kromatografije, usvojiti osnovna načela ionske kromatografske separacije te raspolagati znanjima o specifičnosti različitih detekcijskih metoda. Na taj je način moguće lakše i brže razvijati metode određivanja novih analita primjenom optimizacijskih postupaka. Sve navedeno dotiče ovaj sveučilišni udžbenik.

Ionska je kromatografija kao gradivo uključena u većoj ili manjoj mjeri u brojne kolegije koji se održavaju na Sveučilištu u Zagrebu. Nažalost, sveobuhvatne literature pisane hrvatskim jezikom do sada nije bilo. Stoga je nakana autora da ovo izdanje olakša praćenje nastavnih sadržaja vezanih uz ionsku kromatografiju, a po potrebi pruži i dublju teorijsku podlogu.

Autori zahvaljuju prof. dr. sc. Štefci Cerjan Stefanović što je uvela ionsku kromatografiju na Fakultet kemijskog inženjerstva i

tehnologije te dr. sc. Nebojši Avdaloviću na svesrdnoj podršci i usmjeravanju u znanstvenim aktivnostima. Također zahvaljuju recenzentima prof. emeriti dr. sc. Mariji Kaštelan Macan, prof. dr. sc. Njedomiru Radiću i prof. dr. sc. Silvani Rajić Malić na brojim prijedlozima i raspravama. Velika hvala tvrtki Thermo Fisher Scientific čije su vrijedne donacije omogućile ne samo nama, već i brojnim generacijama studenata Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije stjecanje znanja kroz rad na najmodernijoj ionskoj kromatografskoj opremi.

1. UVOD U IONSKU KROMATOGRAFIJU

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza) [1, 2]. Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, a ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi koja može, ali ne mora, sudjelovati u procesu odjeljivanja. Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju, primjerice *in situ* polimerizacijom nakon nanošenja. Za pokretnu fazu koja izlazi iz kolone nerijetko se koristi naziv eluat, dok se proces ispiranja analita s kromatografske podloge naziva eluiranjem.

Glavne su metode kromatografije frontalna kromatografija, kromatografija istisnućem i kromatografija ispiranjem. Frontalna kromatografija je postupak u kojemu se uzorak (tekućina ili plin) kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu, te se u njoj ne koristi dodatna pokretna faza. Kod kromatografija istisnućem i ispiranjem uzorak se mora unositi u sustav u ograničenoj količini. Ako pokretna faza sadrži spoj koji se na nepokretnoj fazi zadržava jače nego sastojak uzorka koji se ispituje, dolazit će do istiskivanja spomenutog uzorka i tada govorimo o kromatografiji istisnućem. U kromatografiji ispiranjem pokretna faza, koja se u ovom slučaju naziva eluens, neprekidno prolazi kroz ili uzduž kromatografske podloge. Eluens sadržava tvari koje se s ispitivanim uzorkom ravnomjerno natječu za aktivna mjesta na kromatografskoj podlozi (kompeticijske tvari).

Prema obliku kromatografske podloge kromatografija može biti kolonska (nepokretna se faza nalazi unutar cijevi odnosno kolone) i plošna (nepokretna je faza ploha ili se nanosi na plohu).

Prema fizikalnom stanju obiju faza kromatografija se dijeli na plinsko-tekućinsku, plinsko-čvrstu, tekućinsko-tekućinsku i tekućinsko-čvrstu kromatografiju, dok se prema fizikalnom stanju pokretne faze dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

Mehanizmi odjeljivanja u kromatografiji mogu biti različiti. Prema prevladavajućem mehanizmu kromatografija se dijeli na adsorpcijsku kromatografiju (odjeljivanje se temelji na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari), razdjelnu kromatografiju (kod plinske se kromatografije odjeljivanje temelji na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi), ionsku izmjenjivačku kromatografiju (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni), kromatografiju isključenjem (do odjeljivanja dolazi zbog razlika u veličini, obliku ili naboju čestica) i afinitetnu kromatografiju (kao mehanizam odjeljivanja koristi se jedinstvena biološka interakcija analita i liganda) [2].

1.1. POVIJESNI PREGLED RAZVITKA IONSKE KROMATOGRAFIJE

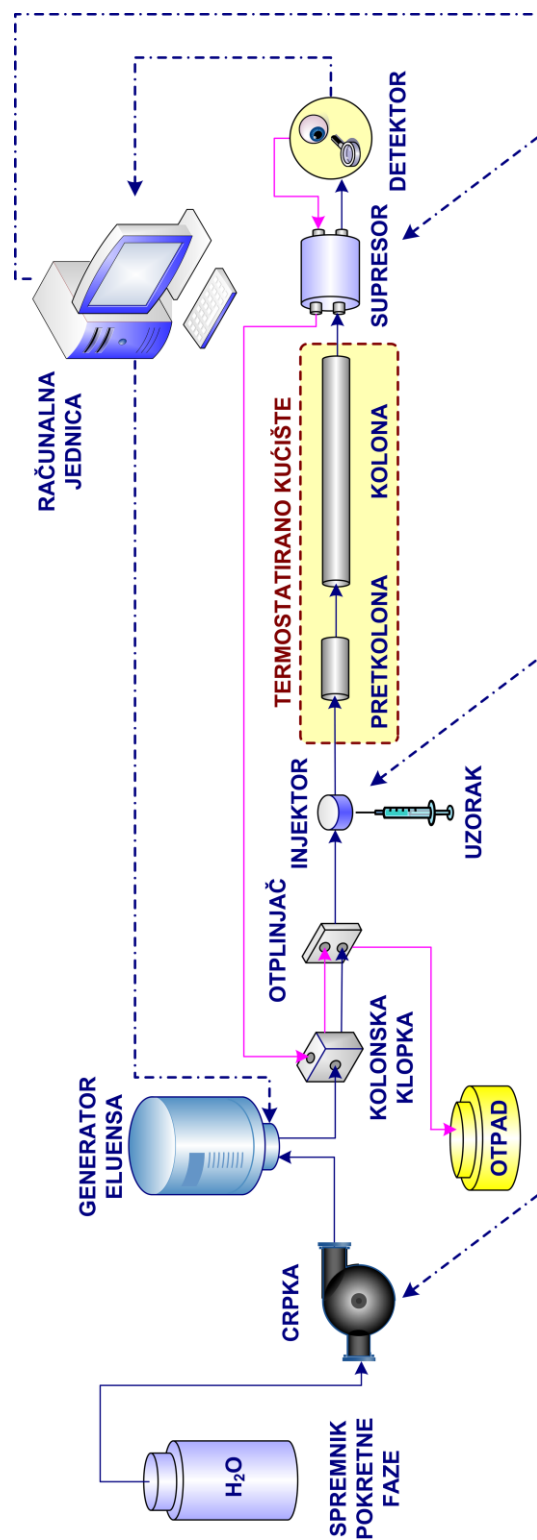
Ionsku su kromatografiju kao novu analitičku metodu prvi put predstavili Small, Stevens i Bauman [3]. Za vrlo kratko vrijeme ionska

se kromatografija razvila od postupka za određivanje nekoliko kationa i aniona u modernu tehniku za određivanje niza ionskih vrsta. Godine 1979. Fritz [4] je opisao tehniku za određivanje anorganskih aniona u kojoj je kolonu za odjeljivanje izravno vezao s konduktometrijskom ćelijom. U tom su ionskom kromatografskom sustavu nepokretnu fazu činili ionski izmjenjivači niskog kapaciteta izmjene, tako da se mogao upotrijebiti eluens niske ionske jakosti. Molarna je provodnost određivanih iona također bila niska, te samim time nije bila moguća osjetljivija detekcija analita. Koncem 1970-ih ionska je kromatografija prvi put upotrijebljena za analizu organskih iona. Zahtjevi za kromatografskom tehnikom koja bi omogućila odjeljivanje i analizu organskih kiselina doveli su do razvoja metode temeljene na mehanizmu ionskog isključivanja koju su prvi opisali Wheaton i Bauman [5]. Širina primjene ionske kromatografije uvelike se povećala uvođenjem elektrokemijskih i spektrometrijskih detektora. Pulsna ampermetrijska detekcija olakšala je analizu ugljikohidrata [6]. Primjena poslijekolonske obrade uzorka u kombinaciji s fotometrijskim detektorom omogućila je određivanje teških i prijelaznih metala. Osobitu je popularnost ionska kromatografija stekla uvođenjem segmenata za prigušivanje pozadinskog šuma, tzv. supresora: 1970-ih diskontinuirani kemijski, 1980-ih kontinuirani kemijski te 1990-ih samoregenerirajući elektrokemijski supresori.

Ovakav je razvoj ionskoj kromatografiji omogućio da se uvrsti u moderne analitičke tehnike, te da postane sastavni dio moderne anorganske i organske analize.

1.2. IONSKI KROMATOGRAFSKI SUSTAV

Na slici 1 prikazan je blokovski dijagram osnovnih sastavnica modernog ionskog kromatografa s konduktometrijskom detekcijom. Voda se kao pokretna faza iz spremnika crpi visokotlačnom crpkom s prigušivačem pulsova i potiskuje dalje kroz sustav. Eluens željene koncentracije nastaje elektrolitičkim putem u računalno kontroliranoj jedinici otkuda nastavlja dalje kroz sustav. Ako sustav sadrži jedinicu za generiranje eluensa, u pravilu se odmah iza nje mora nalaziti tzv. kolonska klopka, koja uklanja pojedine smetajuće ionske vrste te reducira trend povećanja pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon kolonske klopke iz eluensa se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. U injektorskoj jedinici dolazi do uvođenja uzorka u tok pokretne faze kojim dalje biva nošen kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu, a unutar kojih dolazi do odjeljivanja sastojaka uzorka. Pretkolona i kolona najčešće se nalaze u termostatiranom kućištu. Na izlasku iz kolone nalazi se elektrokemijski supresor koji omogućava smanjenje pozadinskog šuma i pojačanje signala analita te detektor za mjerenje signala. Signal detektora sakuplja se i obrađuje u računalnoj jedinici. Iako ionski kromatograf ne koristi izrazito visoke tlakove, poput primjerice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), izvedbeni materijali moraju biti dovoljno čvrsti. Stoga su dijelovi koji dolaze u dodir s pokretnom fazom obično izrađeni od polietereeterketona i drugih polimera te materijala poput safira, rubina ili čak keramike, a koji se koriste u glavama crpki, sigurnosnim ventilima i injektoru.



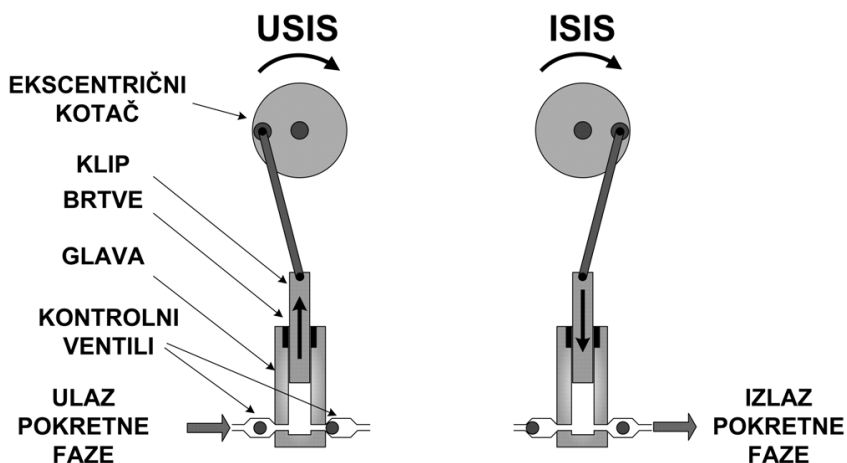
Slika 1. Shema modernog ionskog kromatografskog sustava s konduktometrijskom detekcijom.

2. POKRETNA FAZA

Pokretna se faza nalazi u spremnicima te se pomoću sustava peristaltičkih crpki unosi u ionski kromatografski sustav.

2.1. CRPKE

Ionske kromatografske crpke funkcioniraju uz pomoć ekscentričnog kotača spojenog na klip (slika 2). Rotacija motora pretvara se u linearno gibanje klipa. Par kontrolnih ventila upravlja smjerom toka kroz glavu crpke. Brtvljenje crpke okružuje tijelo klipa čime se sprječava prokapljivanje pokretne faze iz glave crpke.



Slika 2. Shematski princip radnog ciklusa crpke s jednom glavom.

U jednoglavim se klipnim crpkama pokretna faza dostavlja samo za pola crpnog ciklusa. Od izuzetnog je značaja osigurati konstantan protok eluensa kroz ionski kromatografski sustav. Zbog

toga se ugrađuju prigušivači pulsova koji ublažavaju visoku razinu tlaka na vrhuncu crpnog ciklusa i osiguravaju tok eluensa kada se crpka puni. Upotreba crpki s dvije glave dodatno smanjuje pulsiranja u protoku eluensa zato što glave rade 180° izvan faze jedna naspram druge (dok jedna glava isisava, druga usisava i obrnuto).

Na slici 2 prikazan je osnovni princip rada crpki. Tijekom usisnog hoda klip se izvlači iz glave crpke uzrokujući smještanje izlaznog kontrolnog ventila u svoje ležište, dok u isto vrijeme ulazni kontrolni ventil izlazi iz svog ležišta. Time je eluensu omogućeno da ispuní glavu crpke. Klip zatim pri isisnom hodu putuje natrag u glavu crpke. Nastali povećani tlak unutar glave crpke tjera pokretnu fazu da teče od glave crpke dalje kroz sustav.

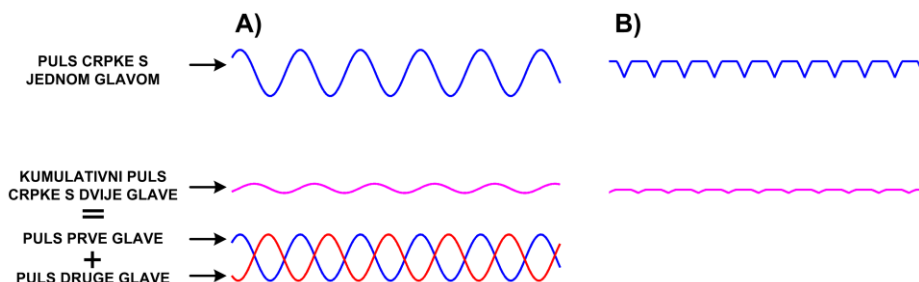
Nepravilna i/ili diskontinuirana isporuka pokretne faze posljedica je nepravilnog zatvaranja ventila, odnosno nemogućnosti ventila da potpuno sjednu u ležište. To se u većini slučajeva javlja zbog zraka zarobljenog u ventilu, a taj se problem obično rješava ispiranjem ili čišćenjem glave te korištenjem otplinjenog eluensa.

2.2. PRIGUŠIVAČ PULSOVA

Kromatografska crpka stvara seriju pulsova na koje je osjetljiva većina detektora (slika 3). Pulsovi se manifestiraju kao šum na baznoj liniji kromatograma, a pogotovo su neugodni ako se pojavljuju tijekom analize tragova. Stoga se u struju pokretne faze iza crpke ugrađuju prigušivači pulsova.

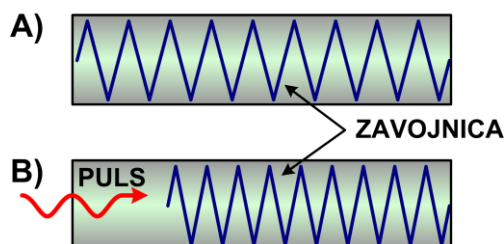
Na slici 4. prikazana je izvedba prigušivača pulsova u obliku zavojnice. U trenutku kada puls pokretne faze nagrne u zavojnicu ona

se savija i na taj način elastično preuzima višak energije omogućavajući ravnomjerniji protok. Najveći je nedostatak ove izvedbe prigušivača vrlo velik zadržani volumen.



Slika 3. Oblik pulsova uz korištenje crpki s jednom i dvije glave:

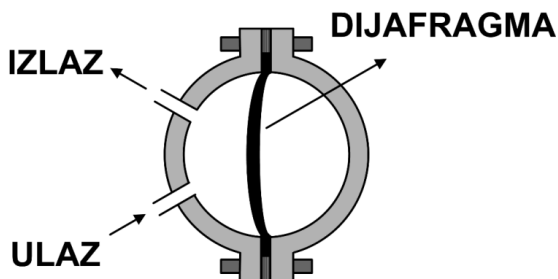
A) bez prigušivača i B) s prigušivačem.



Slika 4. Shematski prikaz prigušivača pulsova u obliku zavojnice:

A) stanje zavojnice bez pulsnog udara, B) svijanje zavojnice pod navalom pulsa.

Crvenom strelicom označen je smjer navale pulsa na zavojnicu.



Slika 5. Shematski prikaz prigušivača pulsova s dijafragmom.

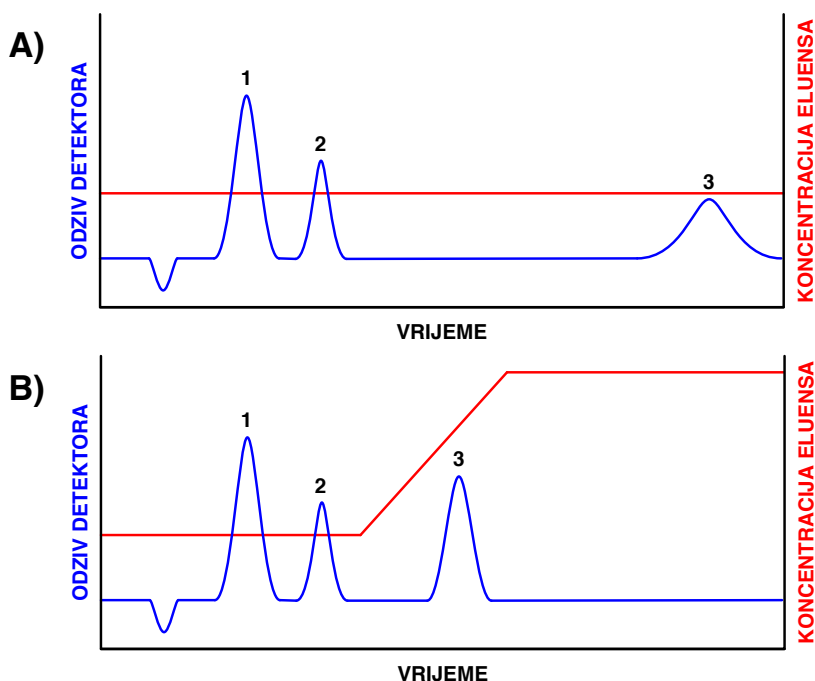
Slika 5 prikazuje prigušivač pulsova s dijafragmom. U trenutku kada pokretna faza nagrne u obliku pulsa u prigušivač, dijafragma preuzima višak energije elastično ujednačavajući puls. Ovakva izvedba prigušivača ima malen zadržani volumen, te se najčešće i koristi.

2.3. GRADIJENTNO ELUIRANJE

Kromatografsko eluiranje pri kojem sastav eluensa tijekom analize ostaje nepromijenjen naziva se *izokratnim eluiranjem* i predstavlja iskonski pristup kromatografskoj problematici (slika 6). Međutim pri ionskim kromatografskim analizama često je potrebno razdvojiti tvari čiji se afiniteti prema aktivnim mjestima nepokretne faze znatno razlikuju. U takvim je slučajevima niska koncentracija kompeticijskih iona u eluensu, koja pogoduje odjeljivanju iona slabo zadržanih na nepokretnoj fazi, obično nepogodna za analizu snažno zadržanih iona jer njihovo, pri tim uvjetima iznimno sporo eluiranje, znatno produljuje vrijeme trajanja analize. Druga pak krajnost jest eluiranje pri visokim koncentracijama kompeticijskih iona u eluensu. Takav će eluens u prihvatljivom vremenskom razdoblju eluirati snažno zadržane ione, međutim neće se postići razlučivanje slabo zadržanih iona. Rješenje je te problematike osmislio švedski kemičar Arne Tiselius sa suradnicima 50-ih godina 20. stoljeća [7]. Oni su predložili pristup u kojem koncentracija kompeticijskih iona tijekom analize prestaje biti konstantna i postaje funkcija vremena (*gradijentno eluiranje*; slika 6). Stoga gradijentno eluiranje uglavnom započinje uporabom eluensa niske moći ispiranja da bi se omogućilo kvalitetno odjeljivanje slabo zadržanih iona iz uzorka. Koncentracija se

kompeticijskih iona u eluensu potom vremenski ravnomjerno ili neravnomjerno povećava poradi bržeg ispiranja iona koji se jače vezuju na nepokretnu fazu.

Gradijentno je eluiranje problem u većini metoda detekcije. Ako je metoda detekcije osjetljiva isključivo na analit, a ne i na sastojke eluensa, moguće je ostvariti znatnije promjene u sastavu eluensa bez znatnijeg utjecaja na kvalitetu detekcije analita. Međutim ako se metoda detekcije zasniva na praćenju svojstva koje je zajedničko ionima analita i eluensa, dio signala analita može biti prikriven; uslijed gradijentne promjene sastava eluensa dolazi do znatne promjene signala bazne linije kromatograma.



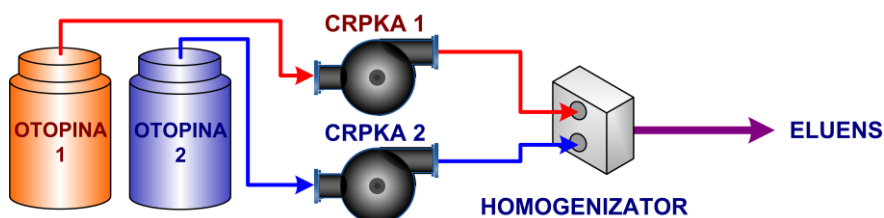
Slika 6. Shematski prikaz: A) izokratnog i B) gradijentnog eluiranja. Brojkama od 1 do 3 označena su tri analizirana sastojka iz uzorka.

2.4. GRADIJENTNO MIJEŠANJE ELUENSA

Kao što je već rečeno, gradijentno eluiranje tijekom kromatografske analize zahtijeva promjenu sastava eluensa. Postoje dva osnovna načina na koja se mogu pripremiti eluensi za gradijentno eluiranje: miješanje eluensa pri visokom tlaku i miješanje eluensa pri niskom tlaku.

2.4.1. Miješanje eluensa pri visokom tlaku

Sustavi miješanja eluensa pri visokom tlaku sastoje se od dviju zasebnih crpki koje crpe eluens iz različitih spremnika nakon čega slijedi homogeniziranje (slika 7). Gradijent se dobiva različitim brzinama rada crpki, pri čemu ukupna brzina protoka eluensa mora odgovarati željenoj brzini nakon miješanja.



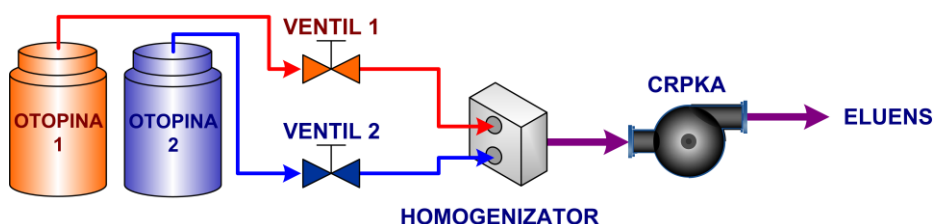
Slika 7. Sustav miješanja eluensa pri visokom tlaku.

Prednosti su korištenja sustava miješanja eluensa pri visokom tlaku visoka ponovljivost i obnovljivost pripreme pokretne faze te vrlo brz odziv promjena koncentracija. Također postoji i mogućnost korištenja jedne crpke za *online* pripremu uzorka, dok se druga u tom slučaju koristi za izokratno eluiranje. Nedostaci su korištenja ovog pristupa

nepotpuno miješanje, manja preciznost miješanja udjela manjih od 10% te, možda i najvažnije, visoka cijena spomenute konfiguracije uređaja (dvije crpke; ako je potrebna ternarna pokretna faza tada čak i tri).

2.4.2. Miješanje eluensa pri niskom tlaku

U sustavima se miješanja eluensa pri niskom tlaku (slika 8) miješanje odvija prije dolaska pokretne faze u crpku (sa strane niskog tlaka u odnosu na crpku). To znači da je ukupna brzina protoka kontrolirana samo jednom crpkom.



Slika 8. Sustav miješanja eluensa pri niskom tlaku.

Omjere sastojaka eluensa određuje otvorenost ili zatvorenost ventila smještenih između spremnika i crpke. Glavna je prednost ovakvih sustava mogućnost miješanja dvaju ili više sastojaka pokretne faze bez značajnijih financijskih investicija i troškova održavanja. To je ujedno i uzrok najčešćem korištenju upravo ovih sustava unatoč činjenici da miješanje eluensa pri visokom tlaku daje bolju preciznost u područjima iznad 10% udjela sastojaka.

2.5. ONLINE PRIPRAVA ELUENSA

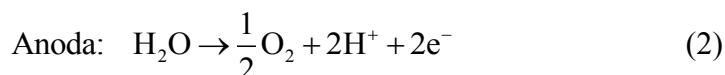
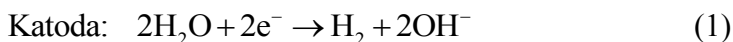
Umjesto tradicionalne *offline* priprave eluensa, danas se sve više koristi *online* pristup koji svoj procvat može zahvaliti osmišljavanju priprave eluensa elektrolitičkim putem. Ovaj je pristup donio iznimnu uštedu vremena i napora u pripremi eluensa, veću čistoću samih eluensa, a time i veću pouzdanost ionskih kromatografskih analiza. Iako danas elektrolitička priprava eluensa obuhvaća tek malen broj različitih eluensa (KOH, NaOH, LiOH, K₂CO₃, metansulfonska kiselina), ta činjenica ne sputava njenu popularnost jer spomenuti eluensi pokrivaju većinu rutinskih analiza u ionskoj kromatografiji.

2.5.1. Priprava KOH eluensa

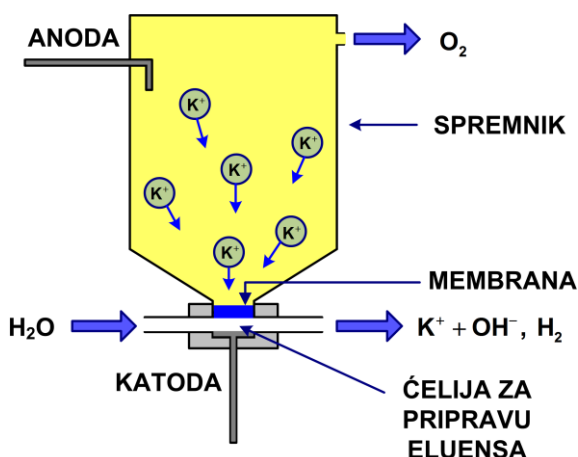
U ovom će se poglavlju opisati *online* priprava KOH eluensa elektrolitičkim putem. Način priprave NaOH i LiOH eluensa je analogan.

Generator KOH eluensa sastoji se od visokotlačne ćelije za pripravu eluensa i spremnika K⁺ elektrolita pod niskim tlakom (slika 9). Ćelija i spremnik odijeljeni su polupropusnom membranom koja omogućava isključivo prijelaz kationa kalija iz spremnika u ćeliju za pripravu eluensa. U ćeliji za pripravu nalazi se platinska katoda, dok spremnik sadrži platinsku anodu. Kao pokretna se faza u sustavu koristi deionizirana voda koja se crpkom kontinuirano doprema u ćeliju za pripravu. U trenutku priprave eluensa uspostavlja se

odgovarajući napon između katode i anode uslijed čega dolazi do elektrolize vode:



Nastanak vodikovih iona u spremniku tjera kalijeve katione kroz polupropusnu membranu u ćeliju za pripravu eluensa gdje se nalaze elektrolizom nastali hidroksidni ioni. Količina je kalijevih iona koji će prijeći membranu ekvivalentna količini nastalih vodikovih odnosno hidroksidnih iona. Time je dobiven željeni KOH eluens. Kisik nastao na anodi izlazi kroz otvor za plinove, dok je vodik s katode potrebno ukloniti otplinjačem.



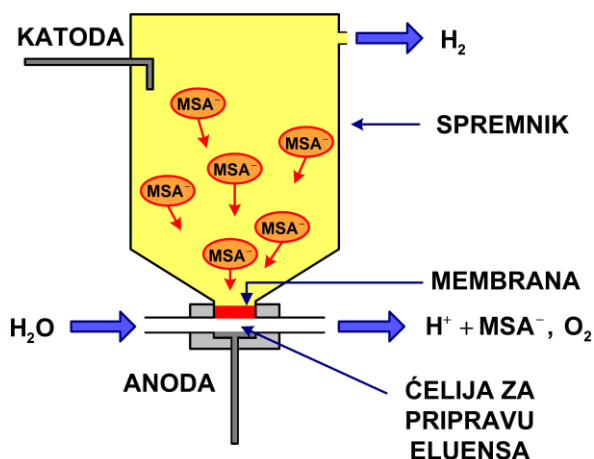
Slika 9. Online priprava KOH eluensa.

Koncentracija nastalog KOH eluensa proporcionalna je jakosti struje i obrnuto proporcionalna protoku pokretne faze. Dakle

poznavajući protok pokretne faze i uspostavljajući potreban potencijal, računalno je vrlo lako kontrolirati jakost struje elektrolize, a time i željenu koncentraciju KOH u eluensu.

2.5.2. Priprava metansulfonskog eluensa

Iako je metansulfonska kiselina (MSA), za razliku od KOH, eluens koji se upotrebljava u analizi kationa, koncept njene *online* priprave jako je sličan konceptu opisanom u prethodnom poglavlju.

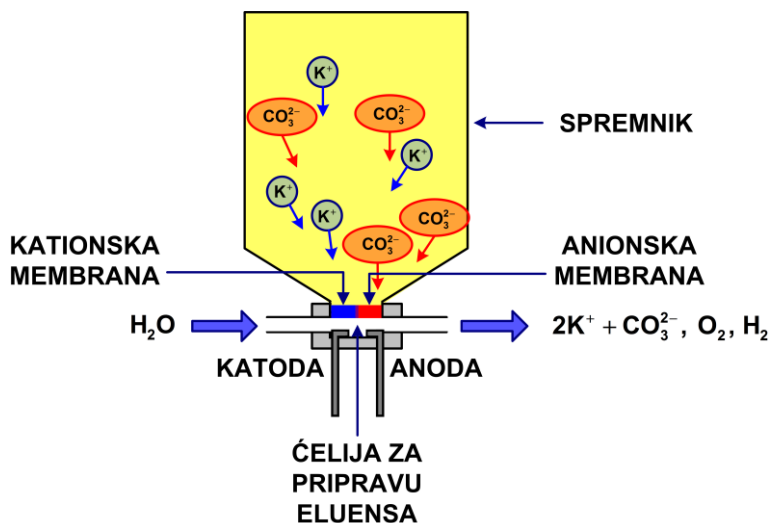


Slika 10. Online priprava MSA eluensa.

U spremniku se kao elektrolit nalazi metansulfonski ion (slika 10). Platinska je elektroda u spremniku sada katoda, dok je ona u ćeliji za pripravu eluensa anoda. Samim se time reakcije opisane izrazima (1) i (2) sada odvijaju na suprotnim mjestima. Koncentracija je nastale MSA u eluensu također ovisna o jakosti struje i protoku pokretne faze. Vodik nastao na anodi napušta sustav kroz otvor za plinove, a kisik nastao u ćeliji za pripravu eluensa uklanja se otplinjačem.

2.5.3. Priprava K_2CO_3 eluensa

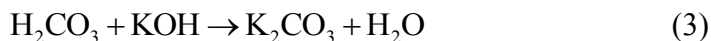
Kod *online* priprave K_2CO_3 eluensa koncept se donekle razlikuje od prethodna dva. U spremniku se kao elektrolit nalaze kalijevi i karbonatni ioni. Polupropusna je membrana, koja istovremeno i odjeljuje i povezuje visokotlačnu ćeliju za pripravu eluensa i elektrolitski spremnik, sada podijeljena na dva segmenta: segment koji isključivo dopušta izmjenu kationa i onaj koji dopušta samo izmjenu aniona (slika 11). Kationski i anionski segment membrane fizički su odijeljeni. I katoda i anoda nalaze se u ćeliji za pripravu eluensa: katoda izravno ispod membrane koja omogućava izmjenu kationa, a anoda ispod anionske membrane.



Slika 11. Online priprava K_2CO_3 eluensa.

Uslijed uspostavljenog električnog polja dolazi do elektrolize vode opisane izrazima (1) i (2). Pod utjecajem električnog polja kalijevi ioni kroz polupropusnu membranu migriraju prema hidroksidnim ionima

tvoreći KOH. Karbonatni ioni pak migriraju kroz anionsku membranu prema vodikovim ionima tvoreći ugljičnu kiselinu - H_2CO_3 . Reakcijom neutralizacije dolazi do stvaranja K_2CO_3 eluensa:



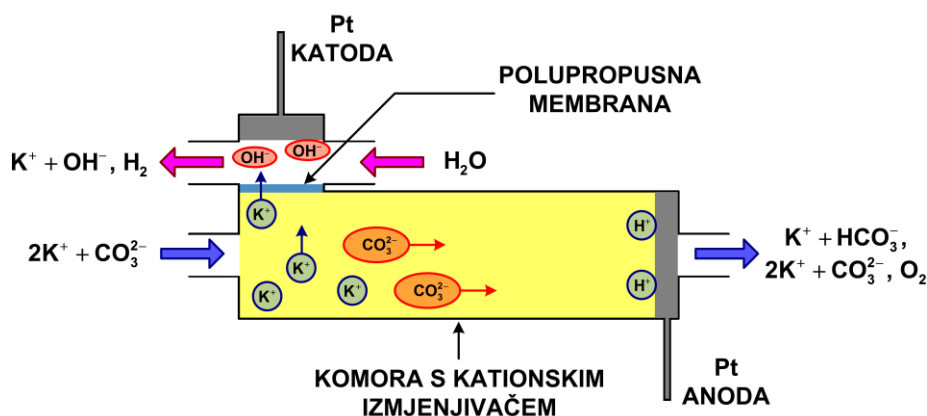
Koncentracija je nastalog K_2CO_3 eluensa također proporcionalna jakosti struje elektrolize i obrnuto proporcionalna protoku pokretne faze. Nastali se kisik i vodik iz sustava uklanjaju otplinjačem.

2.5.4. Priprava $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ eluensa

Iz karbonatnog eluensa moguće je *online* pripremiti još jedan često korišteni eluens: $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$. Međutim tada je u kromatografski sustav potrebno dodati i segment koji je u stanju mijenjati pH-vrijednost eluensa. Danas se najčešće koristi elektrolitski mjenjač pH-vrijednosti opis čijeg principa rada slijedi.

Elektrolitski mjenjač pH-vrijednosti sastoji se od komore ispunjene kationskim izmjenjivačem na čijem se izlazu nalazi anoda (slika 12). Katodni dio smješten je pri ulazu u komoru i nije sastavni dio komore, već je od nje odijeljen polupropusnom membranom selektivnom za katione. K_2CO_3 eluens, nastao prema postupku opisanom u prethodnom poglavlju, prolazi preko kationskog izmjenjivača pri čemu se ioni kalija zadržavaju na izmjenjivaču. Uspostavljanjem potencijala na elektrodama dolazi do elektrolize vode, a pod utjecajem će električnog polja određena količina iona kalija migrirati kroz polupropusnu membranu u katodno područje.

Tamo će s hidroksidnim ionima nastalima na katodi (jednadžba (1)) tvoriti otopinu KOH koja odlazi u otpad. Nestašica je kalijevih iona u eluensu kompenzirana vodikovim ionima nastalima na anodi prema jednadžbi (2). Na taj se način uz K_2CO_3 u eluensu pojavljuje i $KHCO_3$. Koncentraciju nastalog $KHCO_3$ moguće je podešavati mijenjajući jakost struje elektrolize.



Slika 12. Online priprava $KHCO_3/K_2CO_3$ eluensa.

2.6. KOLONSKE KLOPKE

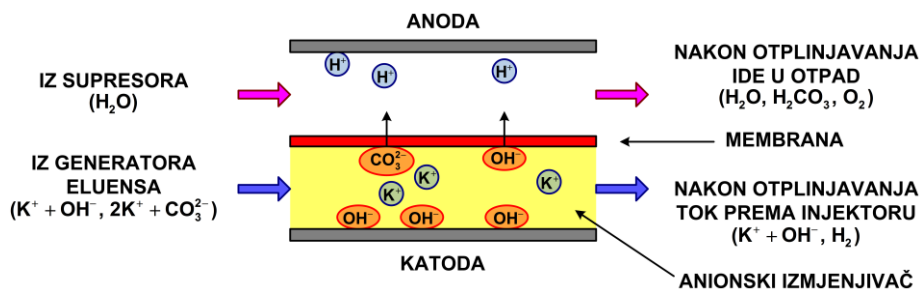
Kolonske klopke (engl. *trap column*) služe za uklanjanje smetajućih ionskih vrsta iz pokretne faze. Budući da se sastoje od ionskog izmjenjivača, u pravilu zahtijevaju regeneraciju aktivnih mjesta. Kolonske klopke danas se regeneriraju kontinuirano, elektrolitičkim putem, čime je eliminiran problem znatno složenije izvedbe *online* kemijske regeneracije. U sustavu se u pravilu smještaju iza generatora eluensa.

2.6.1. Anionska kolonska klopka

Anionska kolonska klopka služi za uklanjanje anionskih nečistoća, u prvom redu karbonata, čija je prisutnost posljedica otapanja CO₂ iz zraka u vodi:



Klopka se sastoji od komore u kojoj se nalaze katoda i anoda (slika 13). Polupropusna membrana fizički dijeli komoru na dva dijela: katodni dio, koji je ispunjen anionskim izmjenjivačem i kroz koji protječe eluens pristigao iz generatora eluensa, i anodni dio, kroz koji protječe čista voda kao povrat iz supresora. Polupropusna membrana omogućava isključivo prolaz aniona iz eluensa prema anodi.



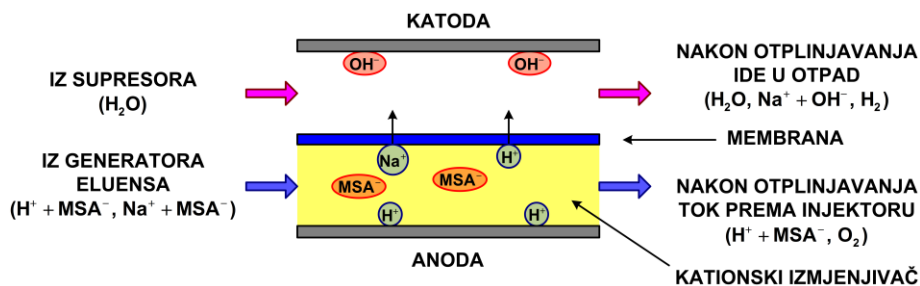
Slika 13. Princip djelovanja anionske kolonske klopke.

Eluens koji prolazi preko izmjenjivača na njemu ostavlja anionske nečistoće. Ako se na elektrodama uspostavi napon, doći će do elektrolize vode prema jednadžbama (1) i (2), a pod utjecajem će se električnog polja anionske nečistoće početi gibati kroz polupropusnu membranu u anodno područje. Njihovo će mjesto na izmjenjivaču

zauzeti hidroksidni ioni nastali elektrolizom; na taj je način omogućena kontinuirana regeneracija anionskog izmjenjivača. Kao produkt elektrolize u anodnom području nastaju kisik i ioni vodika. Reakcijom anionskih nečistoća s ionima vodika nastaju slabo disocirane vrste H_2CO_3 i H_2O .

2.6.2. Kationska kolonska klopka

Princip rada kationske kolonske klopke sličan je slučaju opisanom u prethodnom poglavlju. Komora je i dalje polupropusnom membranom odijeljena na dva dijela, no sada se radi o membrani koja propušta samo kationske nečistoće iz anodnog u katodni dio komore. U slučaju kationske kolonske klopke koristi se kationski izmjenjivač koji se sada nalazi u anodnom dijelu komore (slika 14). Eluens prolazi anodnim dijelom komore ostavljajući kationske nečistoće na izmjenjivaču. Pod utjecajem uspostavljenog električnog polja na elektrodama dolazi do elektrolize opisane jednadžbama (1) i (2), a kationske nečistoće putuju kroz polupropusnu membranu u katodni dio. Izlaskom iz kolonske klopke pročišćeni eluens nastavlja prema injektorskom dijelu sustava, a otopina s nečistoćama u otpad.



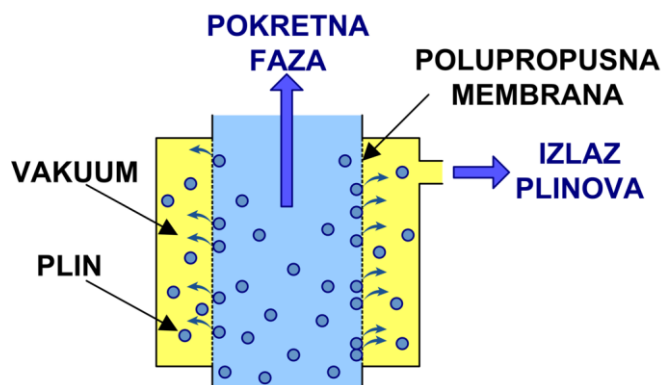
Slika 14. Princip djelovanja kationske kolonske klopke.

Kontinuirana regeneracija kationskog izmjenjivača ostvarena je vodikovim ionima koji nastaju kao produkt anodne reakcije elektrolize vode.

2.7. OTPLINJAČ

Prisutnost plinova u pokretnoj fazi može imati utjecaj na konstantnost protoka, efektivnu koncentraciju eluensa (nastanak karbonata otapanjem CO₂ iz zraka), a snažno utječe i na većinu detektora uzrokujući neravnu baznu liniju. U konačnici prisutnost plinova može dovesti do nekonzistentnosti u vremenima zadržavanja analiziranih tvari i površinama ispod njihovih kromatografskih krivulja. Stoga je poželjno da svaki ionski kromatografski sustav ima ugrađen otplinjač pokretne faze, neovisno o tome je li pokretna faza već otplinjena prije dovođenja u kromatografski sustav. Pojava mjehurića plina osobito je izgledna kod miješanja nedostatno otplinjanih eluensa pri niskim tlakovima (poglavlje 2.4.2.), u sustavima koji koriste karbonatne eluense ili u sustavima s *online* generacijom eluensa gdje plinovi nastaju kao nusprodukt elektrokemijskih reakcija (poglavlje 2.5) [8, 9].

U pravilu se otplinjavanje izvodi koristeći razliku u tlakovima. Pokretna se faza provodi kroz komore u kojima je polupropusnim membranama odijeljena od područja znatno nižeg tlaka, primjerice vakuumskog područja (slika 15). Uslijed razlike među tlakovima dolazi do dekompresije plinova koji kroz polupropusnu membranu prelaze u vakuumsko područje, dok otplinjena pokretna faza nastavlja teći dalje kroz sustav.

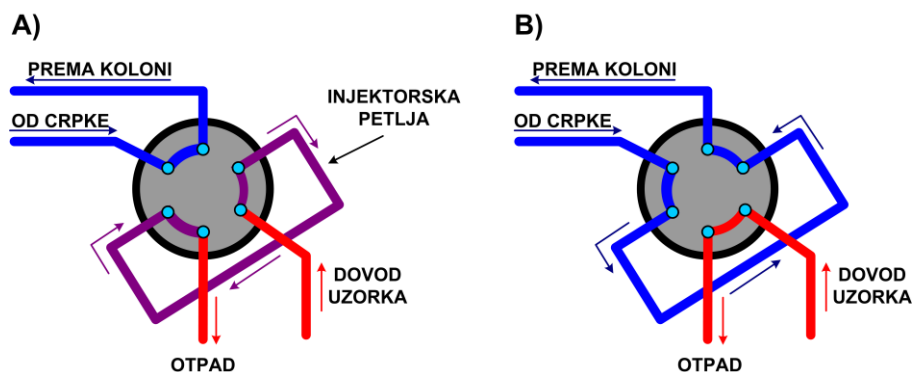


Slika 15. Shematski prikaz otplinjača.

3. UZORAK

3.1. UNOŠENJE UZORKA U IONSKI KROMATOGRAFSKI SUSTAV

Unošenje se uzorka u ionski kromatografski sustav obavlja pomoću injektora. Injektor nije ništa drugo negoli ventil koji se u svojem osnovnom sastavu sastoji od 6 mjesta za priključak. U prvoj se fazi (slika 16A) uzorak unosi kontinuiranim protokom u petlju točno definiranog volumena (injektorska petlja). Za to vrijeme eluens kontinuirano prolazi kroz kolonu, bez kontakta s injekcijskom petljom (plava linija). Zakretanjem se ventila (slika 16B) protok eluensa usmjerava na injektorsku petlju tjerajući na taj način sadržaj injektorske petlje (uzorak) dalje kroz sustav prema kromatografskoj koloni (plava linija).



Slika 16. Unošenje uzorka u ionski kromatografski sustav:

A) punjenje injektorske petlje i B) injektiranje.

3.2. PRIPREMA UZORKA

Jedan je od najvažnijih koraka u razvoju robusne ionske kromatografske metodologije mogućnost razlučivanja je li neželjeni odziv posljedica utjecaja matice ili nefunkcioniranja instrumenta. Matica može uzrokovati kraća vremena zadržavanja, širenje kromatografske krivulje i njenu asimetričnost, preklapanje krivulja, lošu obnovljivost, neravnu baznu liniju i onečišćenje detektora.

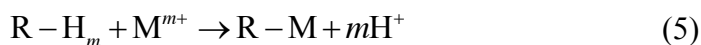
Do skraćivanja vremena zadržavanja dolazi kada matica sadrži sastojke koji se za nepokretnu fazu vežu jače od analita. Kako njih nije lako eluirati, smanjuju kapacitet kolone i time skraćuju vrijeme zadržavanja iona analita. Prisutnost velike koncentracije elektrolita može smanjiti gustoću naboja na površini nepokretne faze, te time smanjiti kapacitet kolone, a u ekstremnim ju slučajevima i preopteretiti. Rezultat je širenje kromatografske krivulje i asimetričnost. Prisutnost matice može utjecati na razlučivanje, osobito između krivulje nezadržanog sastojka i njoj slijedeće, dok je loša obnovljivost i osjetljivost najčešće posljedica onečišćenja detektora. Većina se takvih problema može riješiti i/ili pravilnim odabirom nepokretne faze te primjenom odgovarajuće metodologije pripreme uzorka.

3.2.1. Upotreba kolona za uklanjanje nepoželjnih sastojaka matice

Uz tvari koje želimo odrediti u uzorku, matica uzorka nerijetko sadrži visoke koncentracije tvari koje svojim signalom onemogućavaju

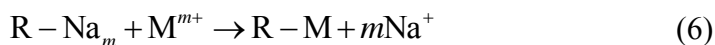
detekciju i kvantifikaciju primarno traženih sastojaka uzorka. U pravilu je ovakve tvari iz matice moguće ukloniti upotrebom kolona punjenih prikladnim ionskim izmjenjivačem. Postoji čitav niz takvih kolona, a ovdje će se ukratko opisati nekoliko najprimjenjivijih:

1. **Jako kiseli izmjenjivač u H^+ obliku** iznimno je selektivan prema viševalentnim kationima poput zemnoalkalijskih i prijelaznih metala.

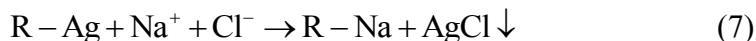


Slovom R označen je ionski izmjenjivač, dok m označava valenciju metalnog kationa. Ovaj se izmjenjivač može koristiti i za uklanjanje karbonata jer prema reakciji (4) oslobođeni vodik s ionskog izmjenjivača reagira s ionima karbonata dajući ugljičnu kiselinu, koju je onda upuhivanjem dušika ili nekog inertnog plina moguće istjerati iz sustava u vidu CO_2 .

2. **Jako kiseli izmjenjivač u Na^+ obliku** također je jako selektivan prema viševalentnim kationima poput zemnoalkalijskih i prijelaznih metala, a za razliku od izmjenjivača u H^+ obliku ne mijenja pH-vrijednost otopine. Stoga je pogodan u slučajevima kada analiziramo tvari osjetljive na promjenu pH-vrijednosti poput nitrita. Reakcija izmjene analogna je onoj kod izmjenjivača u H^+ obliku.



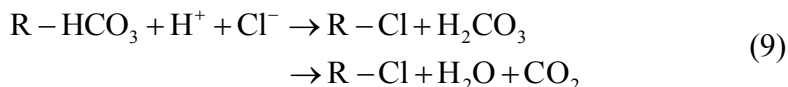
3. **Jako kiseli izmjenjivač u Ag^+ obliku** uklanja čitav niz aniona koji sa srebrovim ionima tvore teško topljiv talog: Cl^- , Br^- , I^- , AsO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , CN^- , MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SeO_3^{2-} , SeCN^- , SO_3^{2-} , S^{2-} , SCN^- i WO_3^{2-} .



4. **Jako kiseli izmjenjivač u Ba^{2+} obliku** uklanja sulfate i kromate prevodeći ih u teško topljive barijeve soli.

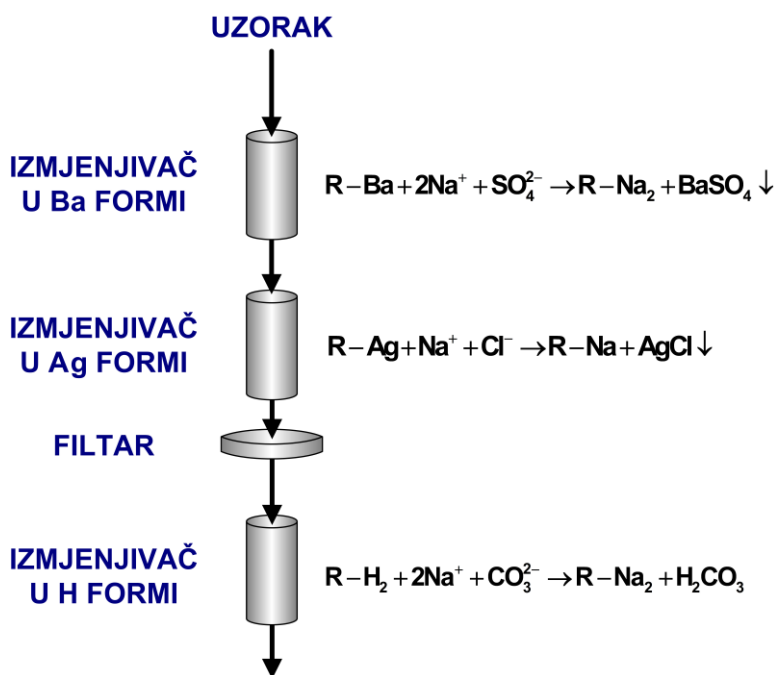


5. **Polivinilpirolidon polimer** iznimno je selektivan prema fenolima, azo tvarima, aromatskim karboksilnim kiselinama i aromatskim aldehydima.
6. **Kolona s divinilbenzenom kao reverznom fazom** ima visoku selektivnost prema hidrofobnim tvarima, osobito nezasićenim i aromatskim ugljikohidratima.
7. **Jako bazični anionski izmjenjivač u HCO_3^- obliku** selektivan je prema svim anionima, a može se koristiti i za neutralizaciju kiselih uzoraka.



8. **Iminodiacetatni izmjenjivači u amonijačnom obliku** pri pH-vrijednostima većima od 4 propuštaju alkalije i zemnoalkalije, a zadržavaju sve ostale metale.

Iako danas postoji čitav niz kolona koje već u svojem punjenju imaju različite kombinacije prethodno spomenutih izmjenjivača, te na taj način objedinjuju njihove efekte, identičan učinak može se postići i jednostavnim spajanjem niza kolona u seriju. Primjer jednog takvog spajanja prikazan je na slici 17. Umetnuti je filter (u pravilu veličine pora 0,22 μm) prikazan na slici praksa koja onemogućava daljnje napredovanje koloidnih AgCl čestica kroz sustav.



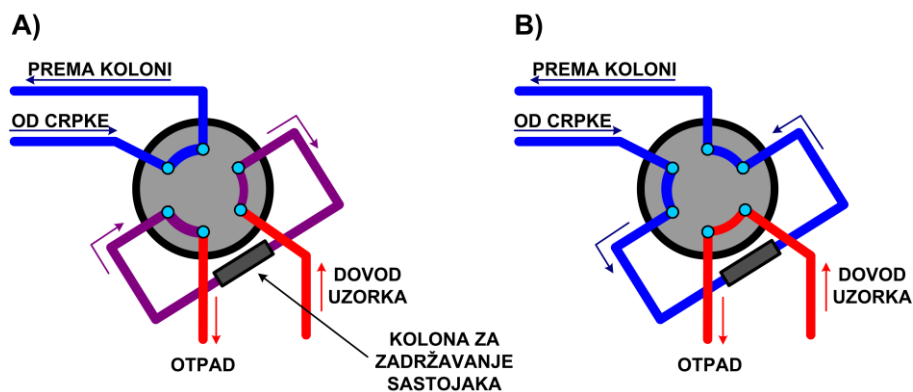
Slika 17. Uklanjanje različitih sastojaka iz matrice serijskim povezivanjem niza kolona.

3.2.2. Upotreba kolona za pretkoncentriranje analita

Osnovne principe zadržavanja uzorka na koloni, primijenjene u prethodnom poglavlju za uklanjanje smetajućih tvari iz matice, moguće je primijeniti i za pretkoncentriranje analita. Primjerice iminodiacetatni se izmjenjivači u amonijačnom obliku koriste za pretkoncentriranje metala (osim alkalija i zemnoalkalija).

3.2.3. Online priprema uzorka

Osim *offline* načinom, izdvajanje matice, ali i pretkoncentriranje, moguće je izvesti i *online* (slika 18). Postupak je iznimno sličan. Osnovna je razlika između uklanjanja matice i pretkoncentriranja sastojaka u tome što se prilikom uklanjanja matice zadržani sastojci ispuštaju u otpad, dok se kod pretkoncentriranja zadržani sastojci unose u ionski kromatografski sustav.



Slika 18. Osnovne faze *online* pretkoncentriranja analita:

- A) koncentriranje analita na koloni za zadržavanje i
- B) odvođenje koncentriranog analita prema kromatografskoj koloni.

4. NEPOKRETNOST FAZA

Od svih je segmenata ionskog kromatografskog sustava nepokretna faza vjerojatno najvažnija. Ona je ta koja određuje mehanizme odjeljivanja tvari, što u konačnici određuje izbor i sastav pokretne faze. Stoga je za što potpunije razumijevanje kromatografskog procesa bitno imati znanja o sastavu nepokretne faze.

4.1. IONSKI IZMJENJIVAČI

Ionski su izmjenjivači najčešće primjenjivana nepokretna faza u ionskoj kromatografiji. Svaki se ionski izmjenjivač sastoji od netopljivog kostura koji može biti organske ili anorganske prirode, fiksni ionski mjesta koja su dodana na kostur (često se nazivaju funkcionalnim skupinama) ili su njegov sastavni dio te ekvivalentne količine protuiona (iona naboja suprotnog naboju ionskog mjesta) vezanih na ionska mjesta poradi neutralizacije naboja izmjenjivača. Protuioni imaju sposobnost izmjene s ionima sličnog naboja ako takvi ioni postoje u otopini oko njih. Otuda i naziv ionski izmjenjivači.

Svaki ionski izmjenjivač, da bi bio primjenjiv u ionskoj kromatografiji, mora imati sljedeće karakteristike [10]:

- sposobnost brze izmjene iona,
- kemijsku postojanost unutar velikog raspona pH-vrijednosti,
- dobru mehaničku čvrstoću i otpornost prema osmotskom šoku,

- otpornost prema deformacijama pri punjenju u kolone i podređenost protoku pokretne faze.

Svojstva ionskih izmjenjivača proizlaze iz svojstava izmjenjivih iona i svojstava netopljivog kostura. Klasifikacija ionskih izmjenjivačkih kostura navedena je u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija tipova kostura u ionskoj kromatografiji.

Materijali bazirani na silikatima	Organski materijali	Anorganski materijali
funkcionalizirani silikati	sintetski polimerni izmjenjivači	alumosilikati
polimerni silikati	celuloza	netopljive soli
	dekstrani	heteropolimerne kiseline
		gline
		hidratizirani oksidi

4.1.1. Izmjenjivači s polimernim kosturom

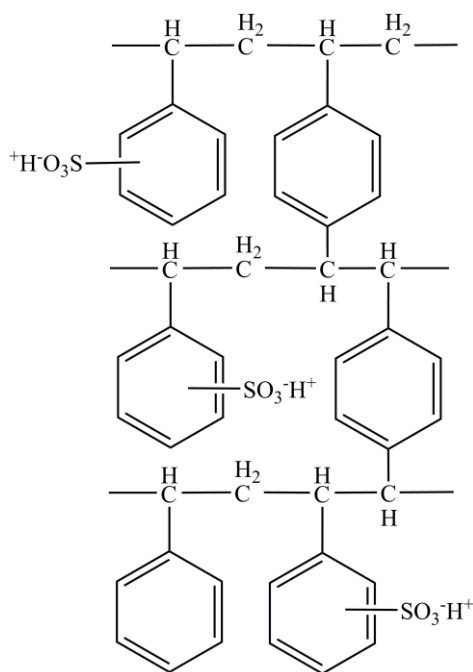
Izmjenjivači s polimernim kosturom kemijski su postojani u širokom području pH-vrijednosti, što im daje značajnu prednost pred nekim drugim izmjenjivačima poput izmjenjivača sa silikatnim kosturom.

Najprimjenjivnije su funkcionalne skupine kod kationskih izmjenjivača sulfo-skupina, karboksilna ili pak fosfonatna skupina, dok je kod anionskih to amino-skupina.

Kao polimerni kostur koriste se različite polimerne strukture. Ovdje su nabrojane samo one koje se danas najčešće koriste u ionskoj kromatografiji:

- stiren-divinilbenzenski kopolimer,
- etilvinilbenzen-divinilbenzenski kopolimer,
- polimetakrilat,
- polivinil.

Istaknut ćemo stiren-divinilbenzenski kopolimer kao vjerojatno najčešće korišten izmjenjivački kostur u ionskoj kromatografiji te ukratko kazati nešto o njemu.

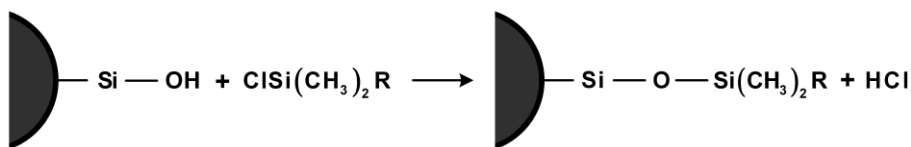


Slika 19. Struktura polistiren-divinilbenzenskog ionskog izmjenjivača s funkcionalnom sulfo-skupinom.

Kopolimerizacija stirena i divinilbenzena potrebna je poradi postizanja visoke mehaničke čvrstoće izmjenjivačkog kostura. Divinilbenzenske strukture poprečno povezuju polistirenske lance pridonoseći dodatnoj mehaničkoj stabilnosti strukture kostura. Postotak se divinilbenzena u strukturi naziva postotkom poprečnog povezivanja i o njemu ovisi poroznost samog kostura, odnosno u konačnici i izmjenjivača. Reakcijom s odgovarajućim reagensima dolazi do adicije željenih funkcionalnih skupina na površinu kostura. Ovisno o trajanju reakcije i temperaturnom režimu pri kojem se provodi adicija, nastaju izmjenjivači s različitim stupnjem adicije. Stupanj adicije određuje kapacitet ionske izmjene spomenutog izmjenjivača [9]. Shematski prikaz polistiren-divinilbenzenskog kostura s adiranom funkcionalnom sulfo-skupinom prikazan je na slici 19.

4.1.2. Izmjenjivači sa silikatnim kosturom

Nasuprot organskim polimerima, silikatni izmjenjivači nude veću kromatografsku efikasnost i mehaničku stabilnost kao i veću temperaturnu tolerantnost (postojani su do 80 °C). Ujedno fenomeni poput bubrenja ili sažimanja nisu opaženi u slučaju silikatnih izmjenjivača. Nažalost, njihova kemijska stabilnost ograničena je na vrlo uskom području pH-vrijednosti od 2 do 8. Samim time uvelike je ograničen izbor eluensa kao i analita koje je pri spomenutim uvjetima moguće odijeliti.

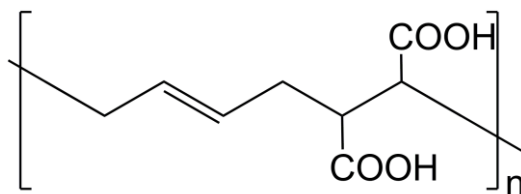


Slika 20. Silanizacija silikatnog kostura.

Većina komercijalno dostupnih izmjenjivača silikatnog tipa nastaje reakcijom odgovarajućeg organosilanskog reagensa sa silanolnim skupinama na površini silikatnog kostura (slika 20).

Želi li se dobiti anionski izmjenjivač R, skupina mora biti amino-skupina ili ugljikovodični lanac koji u sebi sadrži amino-skupinu; najčešće se radi o kvaternim amino-skupinama. Amino-skupina postaje funkcionalna skupina novonastalog izmjenjivača. Kod kationskih se izmjenjivača kao funkcionalna skupina najčešće koristi sulfo-skupina. Unatoč visokoj kromatografskoj efikasnosti, ovakvi izmjenjivači danas ipak nemaju veliku primjenu u ionskoj kromatografiji.

Znatno je veći interes prisutan za izmjenjivače sa silikatnim kosturom presvučenim polimerom. Polimerna se tvar sintetizira u zasebnom koraku, a potom nanosi na silicijev dioksidni nosač i imobilizira.



Slika 21. Kopolimer butadiena i maleinske kiseline.

Kao kationski se izmjenjivač najčešće koristi kopolimer pripravljen iz smjese butadiena i maleinske kiseline u jednakim omjerima. Kao što je vidljivo na slici 21, kopolimer sadrži dvije karboksilne skupine na kojima dolazi do kationske izmjene. Istraživanja su pokazala dvije vrijednosti konstanti disocijacija karboksilnih skupina: u prvom koraku pK vrijednost iznosi 3,4, dok disocijacija sljedeće karboksilne skupine ima pK vrijednost 7,4. Kapacitet ionske izmjene pripravljenog izmjenjivača proporcionalan je koncentraciji nanesenog kopolimera. Ovi su izmjenjivači u prvom redu prikladni za simultano određivanje alkalijskih i zemnoalkalijskih metala.

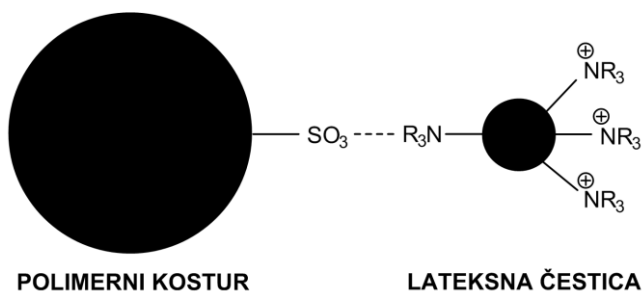
Kod anionskih se izmjenjivača sa silikatnim kosturom presvučenim polimerom kao polimerna faza koristi laurilmetakrilat.

4.1.3. Lateksni izmjenjivači [9]

Osnove lateksnog izmjenjivača prikazat ćemo strukturom anionskog lateksnog izmjenjivača. U osnovi se lateksnih izmjenjivača nalaze sitne čestice (5–25 μm) prethodno već opisanog sulfoniranog polistiren-divinilbenzenskog kopolimera (poglavlje 4.1.1.). Na njima su, baš poput kakve ovojnice, utjecajem elektrostatskih ili van der Waalsovih sila aglomerirana iznimno sitna zrnca (0,1 μm) nazvana lateksnim česticama (slika 22). Lateksne su čestice sastavljene od polivinilbenzilklorida ili polimetakrilata, a iznimno su visoke poroznosti i potpuno aminirane; funkcionalne su skupine na kojima dolazi do izmjene aniona kvaterne amino-skupine. Selektivnost je

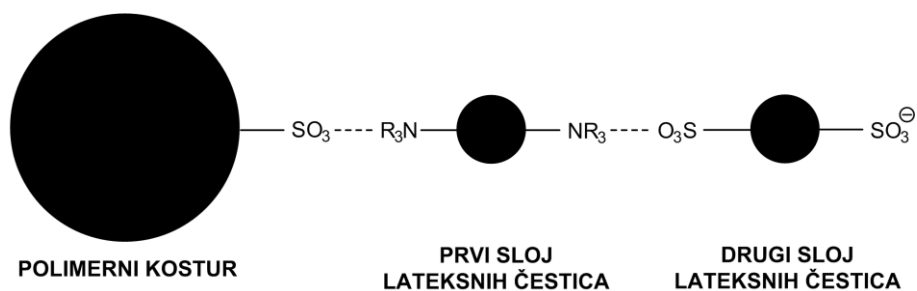
izmjenjivača u prvom redu ovisna upravo o prirodi kvaternih amino-skupina.

Dva parametra imaju snažan utjecaj na kromatografsku efikasnost opisanog izmjenjivača: stupanj sulfoniranosti polistiren-divinilbenzenskog kopolimera i veličina zrnaca lateksa. Sulfoniranost površine onemogućava difuziju anorganskih čestica u unutrašnjost nepokretne faze tako da je difuzija isključivo pod kontrolom funkcionalnih skupina na lateksnim česticama. Veličina lateksnih čestica pak određuje duljinu difuzijskih putova unutar njihove iznimno porozne strukture, a samim time i brzinu difuzije.



Slika 22. Anionski lateksni izmjenjivač.

Kationski izmjenjivač zasnovan na principu lateksa ima slabo sulfoniranu površinu kopolimernog polistiren-divinilbenzenskog središta. Sukladno situaciji kod anionskog izmjenjivača, elektrostatskim i van der Waalsovima silama, oko središnje su polistiren-divinilbenzene čestice aglomerirana potpuno aminirana zrnca lateksa. Na njih je pak vezan dodatni sloj sulfoniranih lateksnih čestica (slika 23).



Slika 23. Kationski lateksni izmjenjivač.

Funkcionalne su skupine u slučaju kationskog lateksnog izmjenjivača dakle sulfo-skupine. Trenutno se ovakvi kationski izmjenjivači koriste samo za analizu alkalijских i zemnoalkalijских kationa jer omogućavaju zadovoljavajuće visoko razlučivanje spomenutih tvari.

Opisani lateksni izmjenjivači nude nekoliko prednosti pred ostalim punilima kolona (poput izmjenjivača sa silikatnim kosturom ili izravno aminiranih izmjenjivača):

- unutarnji polistiren-divinilbenzenski dio čestice omogućava mehaničku stabilnost i ublažava utjecaj povratnog tlaka;
- malene dimenzije zrnaca lateksa omogućavaju brzu ionsku izmjenu i stoga visoku kromatografsku efikasnost kolone;
- funkcionalnost površine znatno umanjuje efekte bubrenja i sažimanja izmjenjivača.

4.2. KAPACITET [11, 12]

Kapacitet ionskog izmjenjivača mjerilo je sposobnosti izmjene iona te označava količinu iona koje određena količina izmjenjivača može izmijeniti. Ovisan je o broju raspoloživih funkcionalnih skupina ionskog izmjenjivača. Potrebno je razlikovati ukupni kapacitet od iskoristivog kapaciteta ionskog izmjenjivača.

Ukupni se kapacitet odnosi na ukupnu količinu iona (izraženu u mmol) koju jedinična količina izmjenjivača može izmijeniti. Ako se ta količina odnosi na masu suhog izmjenjivača, dobiva se njegov maseni kapacitet (mmol g^{-1}), dok se volumni kapacitet odnosi na volumen stupca nabubrenog izmjenjivača (mmol cm^{-3}). Ukupni je kapacitet konstanta karakteristična za pojedinu vrstu izmjenjivača.

Iskoristivi se kapacitet odnosi na dio ukupnog kapaciteta izmjenjivača koji se može koristiti u određenoj primjeni. Ovisan je o količini izmjenjivača i uvjetima rada te samim time nije konstantna karakteristika izmjenjivača.

U ionskoj će kromatografiji veći kapacitet ionskog izmjenjivača zahtijevati veću koncentraciju kompeticijskog iona u eluensu da bi isprao uzorak s kolone, odnosno kolone s ionskim izmjenjivačima većeg kapaciteta daju kromatograme s većim vremenima zadržavanja. S druge strane takve se kolone vrlo dobro mogu koristiti u slučajevima analiza gdje je prisutna matica složenijeg sastava (primjerice otpadne vode), zbog toga što neće doći do preopterećenja odnosno proboja kolone.

4.3. BUBRENJE I STUPANJ UMREŽENOSTI [11, 12]

Organski se kosturi ionskih izmjenjivača sastoje od polimernih lanaca povezanih umreženih poprečnim vezama. Kada takav materijal dođe u kontakt s vodom, ionske se funkcionalne skupine na polimerima solvatiziraju što dovodi do bubrenja odnosno povećanja volumena izmjenjivača, a može dovesti i do otapanja polimera. Poprečne veze unutar kostura ionskog izmjenjivača, koje određuju stupanj umreženosti izmjenjivača, sprječavaju da se polimerni lanci u potpunosti solvatiziraju i otope.

Uzrok bubrenju ionskih izmjenjivača je dvojak:

- Između otopine unutar pora izmjenjivača i vanjske otopine postoji razlika osmotskih tlakova. U porama se u relativno malom volumenu nalaze ioni koji se nastoje povezati s polarnim molekulama pokretne faze. Oni se solvatiziraju odnosno hidratiziraju ako je pokretna faza voda. Ulaženjem otapala u koncentriranu otopinu elektrolita unutar pora smanjuje se razlika osmotskih tlakova.
- Između istoimenih naboja nepokretnih iona ionskog izmjenjivača djeluju odbojne elektrostatske sile. Ulaženjem pokretne faze povećava se razmak između nepokretnih iona ionskog izmjenjivača i smanjuje odbojno djelovanje.

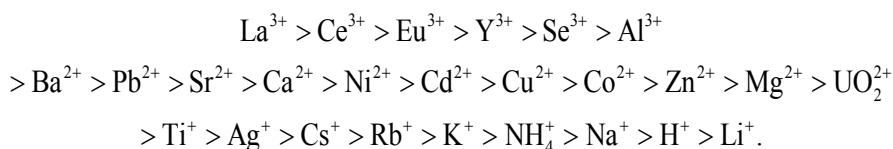
Na jačinu bubrenja utječu svi faktori koji mijenjaju razliku osmotskih tlakova i djelovanje odbojne elektrostatske sile, a to su:

- Gustoća naboja nepokretnih iona ionskog izmjenjivača (kapacitet); s povećanjem kapaciteta raste koncentracija elektrolita u porama.
- Naboj iona; zamjenom jednovalentnih iona za viševalentne smanjuje se koncentracija iona u porama ionskog izmjenjivača.
- Način vezanja iona; fiksiranjem iona pokretne faze smanjuje se osmotski tlak pokretne faze u porama jer se smanjuje aktivitet iona.
- Koncentracija elektrolita u pokretnoj fazi; niska koncentracija povećava razliku osmotskih tlakova.
- Polarnost pokretne faze; kod jače izražene polarnosti povećava se solvatacija iona.
- Stupanj umreženosti; manje umreženi ionski izmjenjivači jače bubre od intenzivnije umreženih jer im je kostur elastičniji.

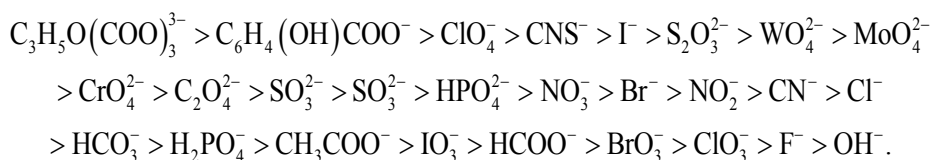
U ionskoj se kromatografiji koriste izmjenjivači s velikim stupnjem poprečnog umreženja koji su između ostalog i mehanički otporniji na povećan tlak u ionskoj kromatografskoj koloni. Stupanj umreženosti ionskog izmjenjivača u ionskoj kromatografiji utječe na selektivnost ionskog izmjenjivača budući da što više ili što manje dopušta pristup određenih iona funkcionalnim skupinama ionskog izmjenjivača.

4.4. SELEKTIVNOST [11, 12]

Selektivnost ionskog izmjenjivača prikazuje relativan afinitet vezanja izmjenjivača prema različitim ionima. Ona ovisi o prirodi iona koji se izmjenjuje, o sastavu pokretne faze i o prirodi ionskog izmjenjivača. U slučaju razrijeđene pokretne faze jače se vežu viševalentni ioni od niževalentnih (elektroselektivnost). Jače solvativirani (hidratizirani) ioni jednakog naboja vežu se slabije, odnosno selektivnost opada kako raste promjer solvativiranog iona. Selektivnost kationa prema jakom kiselom ionskom izmjenjivaču, određena stacionarnim postupkom, može se općenito prikazati u sljedećem redu:



Selektivnost aniona prema jakom bazičnom ionskom izmjenjivaču, određena stacionarnim postupkom, može se općenito prikazati sljedećim nizom:



Važno je naglasiti da su navedene selektivnosti samo aproksimativan pokazatelj relativnog afiniteta pojedinih iona prema ionskom izmjenjivaču. Selektivnost je potrebno odrediti za svaki pojedini sustav.

5. IONSKO KROMATOGRAFSKO ODJELJIVANJE

Ionsku kromatografiju karakterizira postojanje dviju faza: nepokretne faze, koja može biti u čvrstom ili gelnom obliku [10] i pokretne faze, koja je tekućina. Nepokretna faza, ionski izmjenjivač, sastoji se od tri bitna segmenta:

- nosača: netopljive matice koja po svojoj prirodi može biti organska ili anorganska tvar,
- funkcionalne skupine: ionizirane skupine vezane na maticu (ionski aktivna mjesta nepokretne faze),
- protuiona: ekvivalentne količine suprotno nabijenih iona privučenih aktivnim mjestima kako bi se očuvala elektroneutralnost sustava.

Za ionsku je kromatografiju najvažnije svojstvo izmjena protuiona s ionima koji posjeduju naboj istog predznaka, a nalaze se u otopini koja je u kontaktu s izmjenjivačem. Nakon što je ion iz otopine zamijenio na aktivnom mjestu postojeći protuion, biva zadržan na ionskom izmjenjivaču uslijed elektrostatskih sila. Ako uzorak sadrži više iona koji imaju različit afinitet prema izmjeni na nepokretnoj fazi, svaki će od njih na aktivnim mjestima biti zadržan različit vremenski period. Na taj način dolazi do njihova odjeljivanja na ionskom izmjenjivaču [10].

Uz pretpostavku da su pokretna i nepokretna faza u kontaktu dovoljno dugo da se uspostavi ravnotežno stanje procesa ionske izmjene, raspodjela se iona između dviju faza može izraziti

koeficijentom raspodjele, K_D , jednakom omjeru koncentracija razdijeljene tvari i u nepokretnoj (c_s) i pokretnoj fazi (c_m):

$$K_{D,i} = \frac{c_{s,i}}{c_{m,i}} \quad (10)$$

Velike vrijednosti K_D karakteristika su tvari s izraženim afinitetom prema nepokretnoj fazi, dok tvari koje preferiraju pokretnu fazu imaju K_D vrijednosti bliske nuli. Upravo su razlike u vrijednostima koeficijenta raspodjele pojedinih sastojaka analiziranog uzorka preduvjet koji omogućava njihovo kromatografsko odjeljivanje.

No za razliku od ovakvog hipotetskog slučaja, kada pokretna i nepokretna faza borave u kontaktu dovoljno dugo da se između njih uspješno uspostavi ravnoteža izmjene, stvarni ionski kromatografski proces jest dinamički sustav u kojem se za izmjenjive tvari neprestano stvaraju nove okolnosti izmjene. Stoga je ravnotežu bolje promatrati kao odraz vremena koje pojedina tvar provede u nepokretnoj fazi. Tvari s većim koeficijentom raspodjele zasigurno će provoditi više vremena u nepokretnoj fazi od onih čiji je koeficijent manji. Kako se tvari u uzorku kreću samo dok se nalaze u pokretnoj fazi, prve će sustav napustiti one koje u pokretnoj fazi provedu najviše vremena. Time dolazi do međusobnog odjeljivanja sastojaka analiziranog uzorka, ovisno o njihovom afinitetu prema nepokretnoj fazi [10].

Vrijeme koje pojedina tvar provede u kromatografskoj koloni naziva se *vremenom zadržavanja*, t_R , i pri identičnim je uvjetima analize karakteristika spomenute tvari. Pretpostavimo da je promatrani kromatografski sustav kolona volumena V , u kojoj nepokretna faza

zauzima volumen V_S , a pokretna V_M . Sve tvari koje se odjeljuju na koloni prolaze identičnim volumenom, jednakim umnošku vremena zadržavanja spomenute tvari i brzine njenog protoka kroz kolonu:

$$V_M = t_{R,i} \cdot v_i = t_0 \cdot v_0 \quad (11)$$

Indeksom 0 označeno je *vrijeme i brzina protoka nezadržanog sastojka* (pokretne faze). Brzina protoka tvari i kroz kolonu manja je od brzine protoka nezadržanog sastojka, ovisno o vremenu provedenom u nepokretnoj fazi:

$$v_i = v_0 \cdot \frac{t_0}{t_{R,i}} = v_0 \cdot \frac{t_0}{t_0 + t'_{R,i}} = v_0 \cdot \frac{V_M}{V_{R,i}} = v_0 \cdot \frac{V_M}{V_M + V'_R} \quad (12)$$

gdje $t'_{R,i}$ predstavlja *prilagođeno vrijeme zadržavanja*, odnosno vrijeme koje je tvar i provela u nepokretnoj fazi, $V_{R,i}$ *volumen zadržavanja tvari*, a V'_R dodatni volumen pokretne faze potreban za eluiranje tvari i uslijed njenog zadržavanja u nepokretnoj fazi (*prilagođeni volumen zadržavanja*). Iznos se dodatnog volumena pokretne faze prema izrazu (10) može povezati s volumenom nepokretne faze u koloni:

$$V'_R = K_c \cdot V_S \quad (13)$$

$$v_i = v_0 \cdot \frac{V_M}{V_M + K_D \cdot V_S} \quad (14)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (14) u jednadžbu (11) dobiva se:

$$t_{R,i} \cdot v_0 = V_M + K_D \cdot V_S \quad (15)$$

Umnožak vremena zadržavanja tvari i protoka pokretne faze jednak je volumenu zadržavanja tvari [10, 13]:

$$V_{R,i} = V_M + K_D \cdot V_S \quad (16)$$

Uzimajući umjesto omjera koncentracija tvari u dvjema fazama omjer množina (n_S za nepokretnu i n_M za pokretnu fazu), definira se još jedna bitna kromatografska veličina: *faktor zadržavanja* [9, 10, 13].

$$k_i = \frac{n_{S,i}}{n_{M,i}} \quad (17)$$

Prikazujući množine kao umnožak koncentracije i volumena dobiva se:

$$k_i = \frac{c_{S,i} \cdot V_S}{c_{M,i} \cdot V_M} \quad (18)$$

iz čega je, uvrštavajući jednadžbe (10) i (16), lako dobiti najčešće korišteni izraz za faktor zadržavanja:

$$k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} \quad (19)$$

Uz konstantnost protoka, volumni se parametri mogu prevesti u parametre vremena zadržavanja:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (20)$$

Iz izraza (20) jasno se vidi da faktor zadržavanja u biti predstavlja omjer vremena koje uzorak provede u nepokretnoj fazi i vremena provedenog u pokretnoj fazi. Za razliku od vremena zadržavanja, faktor zadržavanja ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, pa je stoga često prikladniji izraz za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Poznavanje faktora zadržavanja različitih tvari ujedno je dobar pokazatelj njihova odjeljivanja odabranom kromatografskom metodom [14]. Mjera sposobnosti odjeljivanja dviju tvari naziva se *faktorom odjeljivanja*, α , i definirana je kao omjer faktora zadržavanja spomenutih tvari, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi ona tvar koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}; \quad k_2 \geq k_1 \quad (21)$$

Faktor odjeljivanja, jednako kao i faktor zadržavanja, ovisi o sastavu nepokretne i pokretne faze, ali i o temperaturi sustava [15]. U slučaju kada faktor odjeljivanja dviju tvari poprima vrijednost 1, tvari nije moguće odijeliti jer pri provedenim uvjetima analize ne postoji kromatografski bitna razlika između ispitivanih tvari.

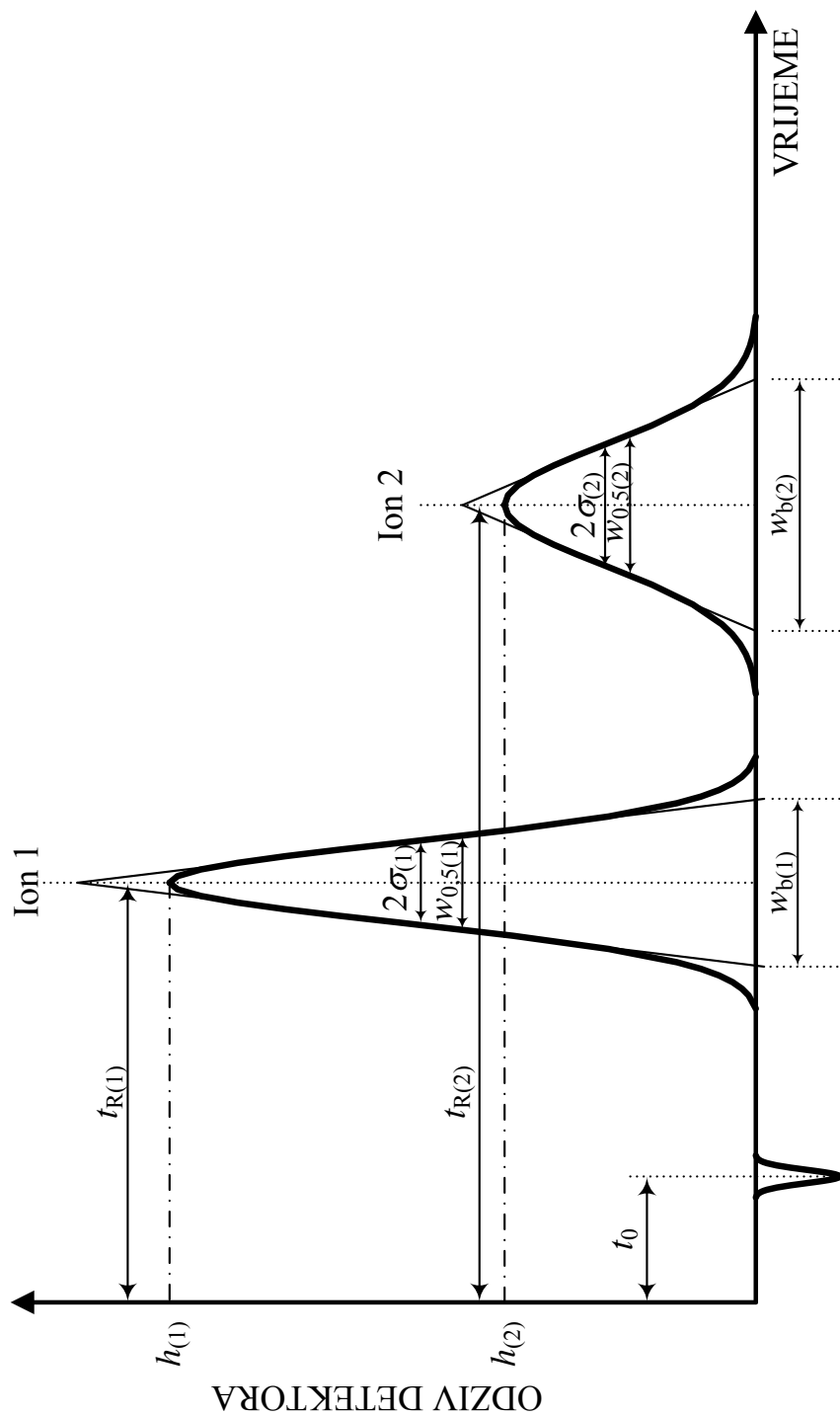
Osim faktora odjeljivanja, koji je više kvalitativna mjera odjeljivanja, kao mjera se kvantitativnog odjeljivanja koriste razlučivanje, R_S , i broj teorijskih odsječaka, N .

Putovanjem uzorka kroz kolonu dolazi do njegove raspodjele oko središnje maksimalne vrijednosti [10, 15–17]. Područje raspodjele naziva se *zonom* ili *vrpcom* te se, prema teoriji odsječaka, širi s udaljenošću analizirane tvari od ulaza u kolonu, odnosno s vremenom koje ona provede u koloni. Širina zone određuje kromatografsku djelotvornost kolone; uža zona – djelotvornija kolona. Djelotvornost se kolone pak može izraziti bilo *brojem teorijskih odsječaka* (engl. *number of theoretical plates*; N), bilo *visinom ekvivalentnom teorijskom odsječku* (engl. *height equivalent to a theoretical plate*; *HETP*). Teorijskim se odsječkom smatra hipotetska zona unutar koje dolazi do potpune ravnoteže između dviju faza [18].

Uz pretpostavku idealnog eluiranja, raspodjela unutar kromatografskih zona bit će Gaussova normalna raspodjela, a odzivi analize simetrične Gaussove funkcije. Tada se djelotvornost kolone može izraziti u terminima vremena zadržavanja analizirane tvari i standardnog odstupanja njene raspodjele oko centra zone. Broj je teorijskih odsječaka u tom slučaju jednak:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (22)$$

Standardno odstupanje Gaussove krivulje raspodjele odgovara polovici njene širine promatrane u točkama infleksije [19] (slika 24).



Slika 24. Shema odziva kod kromatografske analize s naznačenim karakterističnim veličinama.

U kromatografskoj se praksi ponekad, umjesto vrijednosti standardnog odstupanja, rabe vrijednosti širina, kako u točki infleksije tako i u nekim drugim točkama; primjerice na polovici visine kromatografske krivulje ili pak pri baznoj liniji. Uzimajući u obzir odnose tih širina i standardnog odstupanja funkcije raspodjele:

$$w_{ti} = 2\sigma \quad (23)$$

$$w_b = 4\sigma \quad (24)$$

$$w_{0,5} = 2,355\sigma \quad (25)$$

broj se teorijskih odsječaka može izraziti kao:

$$N = 4 \left(\frac{t_R}{w_{ti}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (26)$$

Simbolom w_{ti} označena je širina krivulje u točkama infleksije, w_b označava širinu krivulje pri baznoj liniji, a $w_{0,5}$ onu na polovici visine kromatografske krivulje.

Ponekad se za izračunavanje broja teorijskih odsječaka može koristiti omjer visine kromatografske krivulje, h , i površine ispod krivulje, A :

$$N = 2\pi \left(t_R \frac{h}{A} \right)^2 \quad (27)$$

Visina ekvivalentna teorijskom odsječku računa se pak kao omjer duljine kromatografske kolone, L , i broja teorijskih odsječaka:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (28)$$

Odnosno, izraženo preko standardnog odstupanja raspodjele mase analizirane tvari unutar kromatografske zone [10]:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L} \quad (29)$$

Ako se umjesto vremena zadržavanja, pri izražavanju djelotvornosti kolone koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja, t'_R , u obzir se uzima širenje zone do kojeg dolazi isključivo na nepokretnoj fazi. Tako izražen broj odsječaka naziva se *brojem efektivnih teorijskih odsječaka* (engl. *number of effective theoretical plates*; N_{ef}):

$$N_{ef} = \left(\frac{t'_R}{\sigma} \right)^2 \quad (30)$$

Odnos između broja efektivnih teorijskih odsječaka i broja teorijskih odsječaka dan je izrazom:

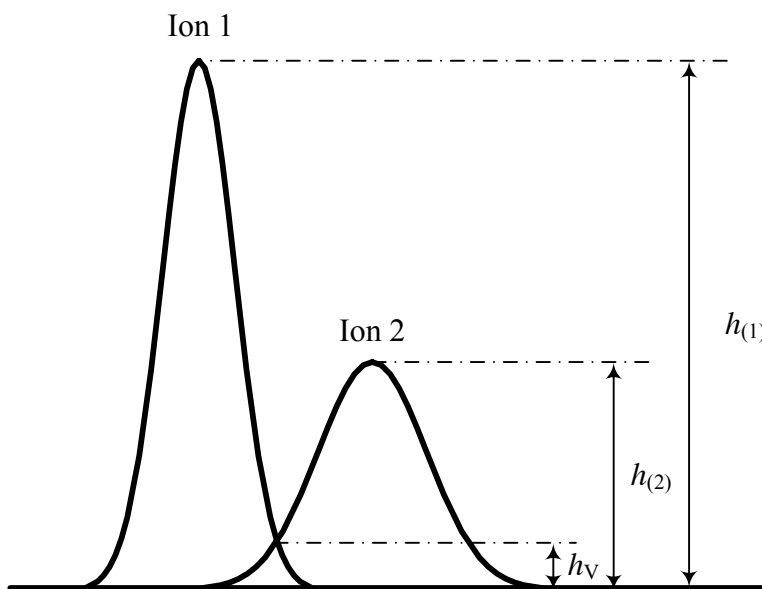
$$N_{ef} = N \left(\frac{k}{1+k} \right)^2 \quad (31)$$

Razlučivanje je pak jednako omjeru udaljenosti vremena zadržavanja dviju slijedno eluiranih tvari i dvostruke vrijednosti sume standardnih odstupanja njihovih krivulja odziva:

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (32)$$

Slično kao i kod izračuna broja teorijskih odsječaka, uvažavajući odnose u jednadžbama (23)–(25), razlučivanje se može računati preko širina krivulja odziva:

$$R_s = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{ti(1)} + w_{ti(2)}} = 1,18 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{b(1)} + w_{b(2)}} \quad (33)$$



Slika 25. Procjena razlučivanja na temelju visina susjednih krivulja i njihove preklopljenosti.

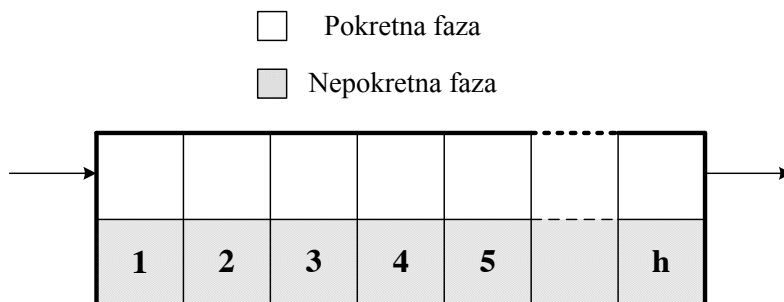
Ponekad se razlučivanje može procijeniti koristeći vrijednosti visina kromatografskih krivulja, h , i visine njihova eventualnog preklopa, h_V [13] (slika 25):

$$R_s \approx 0,1 \left(\frac{\bar{h}}{h_V} \right); \quad \bar{h} = \frac{h_1 + h_2}{2} \quad (34)$$

Većina kromatografičara smatra da je za kvalitativnu analizu uzoraka potrebno postići vrijednosti razlučivanja veće od 1,5 [20–22], dok neki za krivulje koje znatnije odstupaju od Gaussove funkcije razdiobe predlažu da minimalna potrebna vrijednost razlučivanja bude 2 [9].

5.1. TEORIJA ODSJEČAKA

Teoriju su odsječaka (teorijskih odsječaka) originalno razvili Martin i Synge [23]. Oni su stvaran kromatografski proces koji se odvija pri neravnotežnim uvjetima predložili hipotetskom kolonom sastavljenom od niza odsječaka, gdje se unutar svakog od njih uspostavljaju ravnotežni uvjeti.



Slika 26. Hipotetska kolona sastavljena od h teorijskih odsječaka.

Razmotrit će se jedna takva kolona prikazana na slici 26. Neka svaki odsječak, h , sadrži konstantni volumen pokretne, V_M , i nepokretne faze, V_S .

$$K_V = \frac{V_{S,h}}{V_{M,h}} = konst. \quad (35)$$

Zbivanja se u koloni odvijaju kroz niz koraka gdje sadržaj pokretne faze iz jednog odsječka, nakon procesa uravnoteženja, prelazi u sljedeći odsječak, dok nepokretna faza ostaje u odsječku. Pri tome se pretpostavlja da je razdioba iona unutar svakog odsječka izrazito brz i samim time potpuno uravnotežen proces te da u sustavu ne postoji aksijalna difuzija.

Koeficijent raspodjele iona između dviju faza jednak je za svaki odsječak i neovisan o koncentraciji u njemu. Jednako kao o koeficijentu raspodjele, može se govoriti i o vjerojatnosti, p , da će se ion i nakon uravnoteženja nalaziti u pokretnoj fazi:

$$p_i = \frac{n_{M,i}}{n_{uk,i}} = \frac{n_{M,i}}{n_{M,i} + n_{S,i}} \quad (36)$$

gdje n_i predstavlja množinu tvari i u pokretnoj (M) i nepokretnoj (S) fazi, odnosno u cjelovitom odsječku (uk). Uvažavajući jednadžbe (10) i (35), lako se uočava ovisnost vjerojatnosti o koeficijentu raspodjele:

$$p_i = \frac{1}{K_V \cdot K_{D,i} + 1} \quad (37)$$

Broj odsječka, M , u kojem će se ispitivani ion nakon r provedenih prijenosa iz odsječka u odsječak nalaziti u maksimalnoj količini, jednostavno se određuje množeći broj provedenih prijenosa s vjerojatnošću nalaženja iona u pokretnoj fazi:

$$M = r \cdot p \quad (38)$$

Nasuprot tome, ako je poznat broj odsječaka od kojih se sastoji kolona, Z , lako se može izračunati koliko je prijenosa potrebno izvršiti ne bi li ispitivani ion eluirao iz sustava.

$$r = \frac{Z}{p} \quad (39)$$

Volumen pokretne faze potreban da bi promatrani ion eluirao do M -tog odsječka jednak je umnošku broja izvršenih prijenosa i volumena pokretne faze u pojedinom odsječku.

$$V_E = r \cdot V_{M,n} \quad (40)$$

U slučaju kada je odsječak M jednak ukupnom broju odsječaka u koloni, Z , volumen V_E predstavlja volumen zadržavanja iona u koloni, V_R .

Teorija odsječaka daje i mogućnost predviđanja širenja kromatografske zone, no tada je potrebno promatrati i što se događa u odsječcima nakon što se dogodi prijenos pokretne faze iz jednog odsječka u drugi.

Ako p predstavlja vjerojatnost da će se ion nalaziti u pokretnoj fazi, neka q predstavlja vjerojatnost da će ostati u nepokretnoj fazi. Pogledajmo što se događa ulaskom iona u kolonu:

- Trenutak unošenja. U trenutku unošenja uzorka u kolonu vjerojatnost njegova nalaženja u prvom odsječku kolone iznosi 1.
- Prvi prijenos pokretne faze. Nakon prvog prijenosa pokretne faze u *odsječku 1* preostalo je q iona (samo ono što je ostalo u nepokretnoj fazi; novopridošla pokretna faza ne sadrži ispitivane ione). U *odsječku 2* nalazi se pak p iona (samo ono što je pristiglo pokretnom fazom; nepokretna faza *odsječka 2* ne sadrži ispitivane ione). Vjerojatnost da će se ion nalaziti u koloni jednaka je sumi vjerojatnosti da će se nalaziti u pojedinom odsječku:

$$p + q = 1 \quad (41)$$

- Drugi prijenos pokretne faze. Nakon drugog prijenosa pokretne faze u *odsječku 1* preostalo je q^2 iona, a u *odsječak 2* ih je prešlo $q \cdot p$. Iz *odsječka 2* pristiglo je u *odsječak 3* p^2 iona, a preostalo ih $p \cdot q$. Ukupno se sada u *odsječku 2* nalazi $2p \cdot q$ iona, pa iz balance tvari za kolonu slijedi da je:

$$q^2 + 2p \cdot q + p^2 = 1 \quad (42)$$

Promatrajući na identičan način sljedeće prijenose pokretne faze, dolazi se do spoznaje da se promatrani ion u koloni raspodjeljuje prema binomnoj raspodjeli:

$$(p + q)^r = 1 \quad (43)$$

Standardno odstupanje binomne razdiobe dano je kao [10]:

$$\sigma = (r \cdot p \cdot q)^2 \quad (44)$$

Kada je kolona sastavljena od velikog broja odsječaka, binomna razdioba teži Gaussovoj [10], pa se funkcijom normalne razdiobe [19] može opisati ovisnost eluirane koncentracije iona o volumenu eluiranja:

$$c = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{V - V_R}{\sigma} \right)^2} \quad (45)$$

Iako model teorijskih odsječaka na kromatografskoj koloni daje rezultate koji se odlično slažu s eksperimentom, on ima i neke ozbiljne nedostatke. Dok korektno opisuje odnos između širenja vrpce i zadržavanja iona u koloni, nije u stanju predvidjeti magnitudu razdiobe, drugim riječima visinu teorijskog odsjeka. Također model ne uzima u obzir utjecaj promjene nekih vrlo bitnih radnih varijabli, poput protoka ili veličine čestica punila. Stoga je njegova stvarna

vrijednost predviđanja mala. Možda je najveća odlika modela upravo njegova jednostavnost [10].

5.2. TEORIJA BRZINE

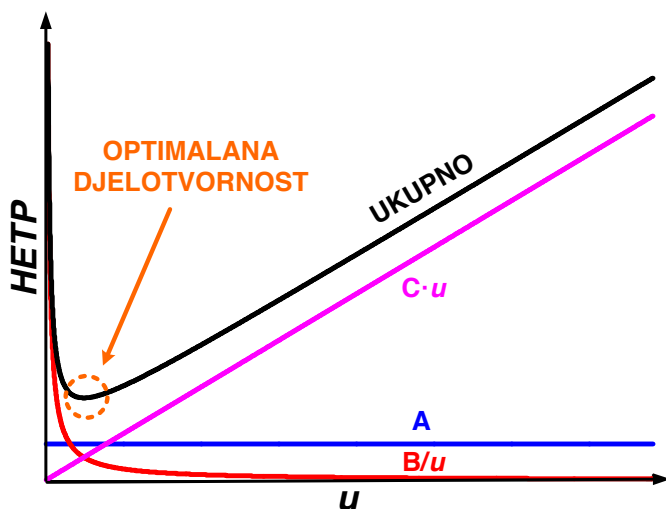
U nastojanju da se što kvalitetnije opiše širenje kromatografske zone, veliku važnost ima teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu (engl. *rate theory*). Ova se teorija postupno razvijala istraživanjima i zapažanjima niza znanstvenika tijekom duljeg vremenskog perioda te se ne može govoriti o isključivo jednom autoru [24–32]. Iako je s vremenom proširivana, teorija je svoje osnovne pretpostavke do današnjih dana očuvala nepromijenjenima.

Za razliku od teorije odsječaka, teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu uzima u obzir varijable poput protoka, veličine čestica punila, neidealnog punjenja kolona te brzine prijenosa tvari između faza. Prema Van Deemterovoj jednadžbi (46) općenit razlog nastajanja i širenja zone ili visine teorijskog odsjeka (*HETP*), pri linearnoj brzini protoka u , leži u kombiniranom djelovanju triju učinaka [10, 17]:

- vrtložnoj difuziji, A (engl. *eddy diffusion*)
- uzdužnoj difuziji, B (engl. *longitudinal diffusion*)
- otporu međufaznom prijenosu tvari, C (engl. *mass transfer resistance*)

$$HETP = A + B \cdot \frac{1}{u} + C \cdot u \quad (46)$$

Na slici 27 dan je grafički prikaz Van Deemterove jednadžbe iz kojeg je vidljivo da se najmanje širenje zone (najmanja visina teorijskog odsječka $HETP$), a time i najveća kromatografska učinkovitost, postiže u točki kada su sumarni uzroci širenju zone (A , B i C) minimalni te navedena točka određuje optimalni protok pokretne faze, u .



Slika 27. Povećanje kromatografske učinkovitosti odabirom optimalnog protoka eluensa, u .

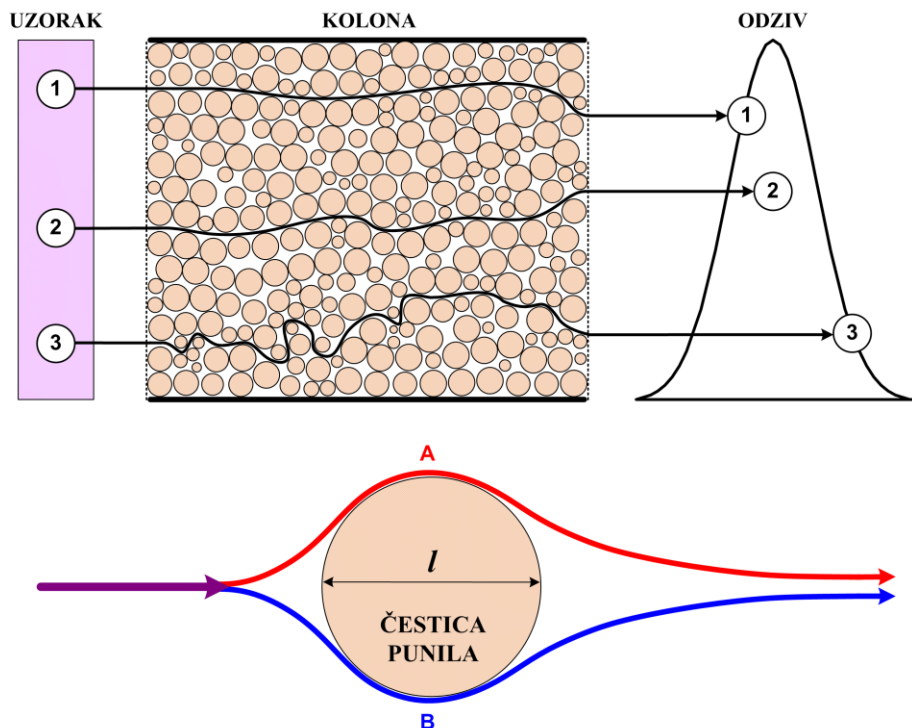
5.2.1. Utjecaj efekta vrtložne difuzije

Otopljene tvari gotovo nikad ne putuju izravno kroz sustav. Tijekom putovanja one nailaze na prepreke (čestice punila kolone) te ih zaobilaze. Načini na koje se prepreka može zaobići višestruki su, a odabir bilo kojeg načina utječe i na daljnji tijek putovanja.

Za takav *problem slučajnog hoda* (engl. *random walk problem*) teorija vjerojatnosti nudi ovisnost između standardnog odstupanja, σ_E ,

duljina svih putova kojima otopljena tvar može zaobići prepreku uzdužne dimenzije l , te broja mogućih putova, N :

$$\sigma_E = l \cdot \sqrt{N} \quad (47)$$



Slika 28. Slučajan hod.

U pojednostavljenom dvodimenzionalnom prikazu (slika 28) postoje dvije mogućnosti odabira puta (situacije A i B), što naravno nije slučaj kod realnih, trodimenzionalnih sustava.

Pretpostaviti će se da su sve čestice punila sfernog oblika, identičnih dimenzija i idealno položene unutar kolone. Duljina se prepreke na koju otopljena tvar nailazi tada može zamijeniti njenim

promjerom, D_p , dok je broj prepreka po duljini kolone jednak omjeru duljine kolone, L , i promjera prepreke:

$$\sigma_E = D_p \cdot \sqrt{\frac{L}{D_p}} = \sqrt{L \cdot D_p} \quad (48)$$

Promatrajući izraz (48) uočava se da smanjenje promjera čestica utječe na smanjenje širenja kromatografske zone, dok na ostale kromatografske veličine nema utjecaj. Logično se nameće ideja da se uporabom što sitnijeg punila minimizira efekt širenja zone. Međutim time bi se povećao tlak unutar kolone. Kod ionske je kromatografije, kao i kod ostalih metoda tekućinske kromatografije, iznimno bitna pretpostavka nestlačivosti pokretne faze. U većini slučajeva ovakva pretpostavka odgovara istini. No veliki padovi tlaka unutar kolone mogu utjecati na veličine poput koeficijenta difuzije tvari, faktora zadržavanja i visine odsječka u koloni [33]. Stoga je potrebno uvažiti oba efekta i pronaći realno prihvatljivo rješenje.

Slučaj kolone idealno ispunjene sferičnim česticama identičnih dimenzija gotovo je nemoguće postići u realnosti. Stoga unutar stvarnih kolona, zbog neidealnosti ispune, postoje kanali različitih duljina i promjera. Prema općepoznatoj jednadžbi kontinuiteta [34], brzina protoka tekućine, v , obrnuto je proporcionalna promjeru odnosno poprečnom presjeku kanala, A , kojim se kreće:

$$v \cdot A = konst. \quad (49)$$

Uvažavajući tu činjenicu jasno je da upravo neidealnosti u punjenju kolona moraju biti jedan od glavnih razloga širenju kromatografske zone.

5.2.2. Utjecaj uzdužne difuzije

Od trenutka unošenja u kromatografsku kolonu zona ispitivane tvari dolazi pod utjecaj prirodnih difuzijskih procesa. Tijekom prolaska kroz kolonu čestice tvari simetrično će difundirati oko središnje mase tvari pri čemu dolazi do gubitka oštine krivulje eluiranja. Iako taj fenomen u stvarnosti nema znatnijeg utjecaja na širenje zone u ionskoj kromatografiji, treba ga uzeti u obzir prilikom razmatranja zbivanja koja se odvijaju u unutrašnjosti kolone. Širenje zone pod utjecajem uzdužne difuzije može se izračunati na temelju Einsteinove jednadžbe [35]:

$$\sigma_L^2 = 2Dt_R \quad (50)$$

gdje D predstavlja difuzijski koeficijent tvari, a σ_L^2 varijancu uzdužne difuzije. U pokretnoj fazi tvari putuju karakterističnom brzinom, pa se vrijeme potrebno da bi napustile kolonu duljine L može izraziti iz opće definicije brzine:

$$t_R = \frac{L}{v_0} \quad (51)$$

Stoga se može pisati:

$$\sigma_L^2 = 2D \frac{L}{v_0} \quad (52)$$

5.2.3. Utjecaj otpora međufaznom prijenosu

Način na koji brzina prijenosa tvari utječe na širenje, odnosno oblik kromatografske zone, nije tako posve očit kao što je slučaj kod prethodna dva efekta. Kao i u mnogim situacijama i ovdje pomaže usporedba vladanja idealnog i realnog sustava. Idealan slučaj bio bi onaj kod kojeg se ravnoteža uspostavlja u infinitezimalno kratkom periodu. Samim time bi i period izmjene tvari u takvom slučaju bio infinitezimalno kratak.

U realnim je sustavima, uslijed inertnosti prijenosa tvari, za međufazni prijelaz ipak potrebno određeno vrijeme. Toliko dugo dok se izmjenjive tvari nalaze u koloni postoji njihova stalna preraspodjela između pokretne i nepokretne faze. Problem se može promatrati na sličan način kao i proces slučajnog hoda opisan tijekom objašnjenja utjecaja prethodnog fenomena. Put se izmjenjive tvari kroz kolonu promatra kao niz vremenskih intervala (koraka); za vrijeme svakog od njih odlučuje se hoće li u sljedećem intervalu promatrana tvar boraviti u pokretnoj ili nepokretnoj fazi. Brojnost intervala ovisi o prosječnom vremenu što ga izmjenjiva tvar provede u pojedinoj fazi; što je proces izmjene brži, veći je broj intervala za donošenje odluke.

Problem ima mnogo zajedničkog i sa slučajem hipotetske kolone, uz iznimku da se ne promatraju segmenti duljine kolone, već vremenski segmenti.

Neka je stoga slovom p označen udio vremena što ga izmjenjiva tvar provede u pokretnoj fazi:

$$p = \frac{t_0}{t_R} = \frac{t_0}{t'_R + t_0} \quad (53)$$

Vrijeme potrebno da iz kolone eluira njeno središte zone tada se može pisati kao:

$$t_R = \frac{L}{p \cdot v_0} \quad (54)$$

U skladu s time oduzimanjem vremena nezadržanog sastojka od vremena eluiranja središta zone dobije se vrijeme koje je izmjenjiva tvar provela u nepokretnoj fazi:

$$t'_R = \frac{L}{p \cdot v_0} - \frac{L}{v_0} = \frac{1-p}{p} \cdot \frac{L}{v_0} \quad (55)$$

Neka je srednja vrijednost trajanja intervala tijekom kojih je tvar boravila u nepokretnoj fazi označena sa τ_s . Tada se brojnost intervala nakon kojih je slijedilo otpuštanje tvari u pokretnu fazu, N_O , lako može prikazati kao omjer ukupnog vremena provedenog u nepokretnoj fazi (55) i srednje vrijednosti trajanja takvih intervala:

$$N_O = \frac{1-p}{p} \cdot \frac{L}{v_0 \cdot \tau_s} \quad (56)$$

Za broj intervala u kojima tvar prelazi u pokretnu fazu u sustavu mora postojati identičan broj intervala u kojima tvar prelazi u nepokretnu fazu, N_V . Stoga je ukupni broj intervala, N_U , tijekom kojih se odlučivalo o boravku izmjenjive tvari tijekom sljedećeg intervala, dvostruka vrijednost izraza (56):

$$N_U = N_O + N_V = 2 \cdot \frac{1-p}{p} \cdot \frac{L}{v_0 \cdot \tau_s} \quad (57)$$

Za određivanje standardnog odstupanja kromatografske zone uslijed otpora međufaznom prijenosu tvari, σ_T , potrebno je još poznavati duljinu odgovarajuću intervalu. Duljina odgovarajuća intervalu jest udaljenost za koju će tijekom trajanja intervala izmjenjiva tvar biti odvučena od središta zone, a kao posljedica njenog boravka u nepokretnoj fazi. Možemo ju izraziti kao:

$$l = p \cdot v_0 \cdot \tau_s \quad (58)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (57) u jednadžbu standardnog odstupanja za problem slučajnog hoda (47) dobiva se konačni izraz:

$$\sigma_T = \sqrt{2 \cdot (1-p) \cdot p \cdot L \cdot v_0 \cdot \tau_s} \quad (59)$$

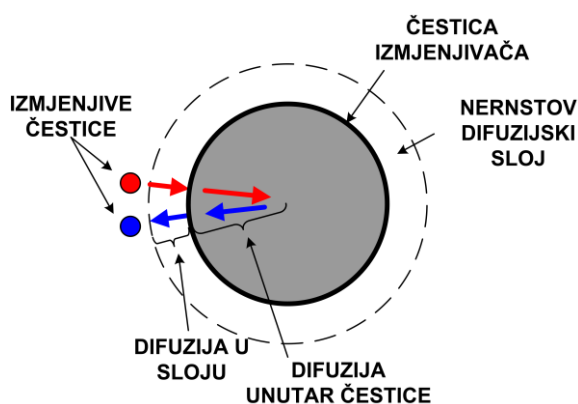
Tri se efekta mogu sumirati u zajednički utjecaj budući da je prema teoriji vjerojatnosti ukupna varijanca sustava jednaka sumi pojedinih međusobno neovisnih varijanci unutar sustava:

$$\sigma_{UK}^2 = \sigma_L^2 + \sigma_E^2 + \sigma_T^2 = 2D \cdot \frac{L}{v_0} + L \cdot D_p + 2(1-p) \cdot p \cdot L \cdot v_0 \cdot \tau_s \quad (60)$$

Uvažavajući jednadžbu (29) visina ekvivalentna teorijskom odsječku tada iznosi:

$$HETP = \frac{2D}{v_0} + D_p + 2(1-p) \cdot p \cdot v_0 \cdot \tau_s \quad (61)$$

Ovaj izraz može ukazati na to koji od triju efekata najviše utječe na širenje kromatografske zone ispitivanog sustava. No nikako se ne smije zaboraviti da i neki vanjski čimbenici poput utjecaja detektora ili kapilara sustava mogu također dovesti do širenja zone.



Slika 29. Međufazni prijenos tvari.

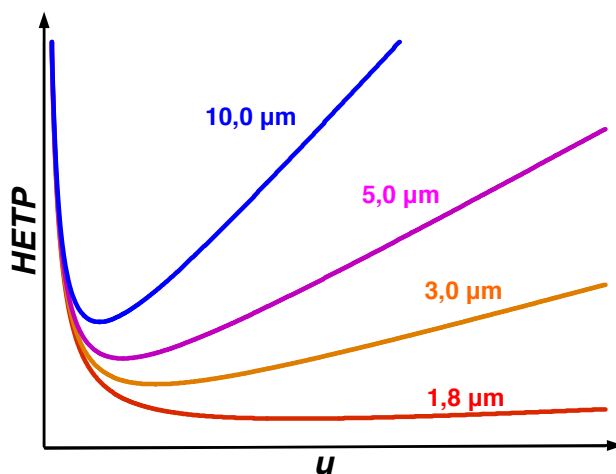
Na slici 29 prikazan je međufazni prijenos tvari. Brzina kojom se odvijaju izmjene važan je faktor upotrebe izmjenjivača, osobito za postupak u koloni. U izmjeni iona postoje tri procesa:

- difuzija iona A i B u otopini kroz difuzijski tzv. Nernstov difuzijski sloj (difuzija u filmu),

- difuzija iona A i B unutar izmjenjivača (difuzija u zrnu),
- zamjena protuiona A za ion B iz otopine.

5.3. KAPILARNA IONSKA KROMATOGRAFIJA

Kapilarna ionska kromatografija relativno je nova tehnologija koja je napravila revoluciju u području ionske kromatografije. Njezinom uporabom moguće je smanjiti vrijeme analize do 10 puta, koristiti 95% manje eluensa i stvarati 95% manje otpada što ga je kasnije potrebno zbrinuti. Navedeni faktori izravno utječu na ekonomsku isplativost analize te iako kapilarni ionski kromatografi rade na višim tlakovima (što neminovno znači da je cijena instrumenta veća) u konačnici nude bilancu s manjom cijenom koštanja pojedine analize.



Slika 30. Shematski prikaz utjecaja veličine čestica punila na djelotvornost kromatografske kolone.

Osnova kapilarne ionske kromatografije leži u smanjivanju cjelokupnog ionskog kromatografskog sustava, a što je jednostavno

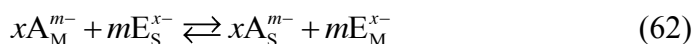
objašnjivo pomoću Van Deemterova prikaza (slika 30). Kao što je vidljivo, čestice nepokretne faze manjeg promjera omogućavaju ne samo povećanu kromatografsku učinkovitost, nego i rad pri većim protocima eluensa bez smanjivanja same učinkovitosti. Iz prethodnih su razmatranja poznate sljedeće činjenice, a evidentan je i njihov kromatografski učinak:

- *HETP* kolone obrnuto je proporcionalan veličini čestice nepokretne faze.
- *HETP* je također obrnuto proporcionalan kvadratu širine kromatografske krivulje, dok je visina krivulje obrnuto proporcionalna njenoj širini.

5.4. TEORIJA LINEARNE JAKOSTI OTAPALA

Model linearne jakosti otapala (engl. *linear solvent strength model*; LSS) prvi je i najjednostavniji teorijski model predviđanja vremena zadržavanja; u izvornom je obliku izveden za monokompetijske eluense [36]. Ovaj su model 1979. razvili L. Snyder i suradnici [37, 38], a temelji se na linearnoj ovisnosti logaritma faktora zadržavanja i logaritma koncentracije kompeticijskog iona u eluensu.

Promotrit će se ravnoteža procesa ionske izmjene dvaju hipotetskih iona A^{m-} i E^{x-} :



Neka ion A^{m-} predstavlja ispitivanu tvar, dok je E^{x-} kompeticijski ion iz eluensa. Prema zakonu o djelovanju masa, konstanta ravnoteže ionske izmjene bila bi:

$$K_{A/E} = \frac{c_S^x(A^{m-}) \cdot c_M^m(E^{x-})}{c_M^x(A^{m-}) \cdot c_S^m(E^{x-})} \quad (63)$$

U ionskoj se kromatografiji ta konstanta naziva *koeficijentom selektivnosti*.

Uzimajući u obzir da se koncentracija kompeticijskih iona vezanih na ionski izmjenjivač kolone može smatrati konstantnom i jednakom omjeru *kapaciteta proboja kolone*, Q_B , i nabojnog broja kompeticijskog iona, x , te uvrštavanjem jednadžbe (18) u jednadžbu (63) dobiva se novi izraz za faktor zadržavanja:

$$k_A = \left(\frac{V_S}{V_M} \right) \cdot (K_{A/E})^{\frac{1}{x}} \cdot \left(\frac{Q_B}{x} \right)^{\frac{m}{x}} \cdot [c_M(E^{x-})]^{-\frac{m}{x}} \quad (64)$$

Logaritmiranjem izraz poprima sljedeći oblik:

$$\log k_A = \log \left(\frac{V_S}{V_M} \right) + \frac{1}{x} \log K_{A/E} + \frac{m}{x} \log \left(\frac{Q_B}{x} \right) - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x-}) \quad (65)$$

U izrazu (65) jedini je promjenjivi dio koncentracija kompeticijskog iona u pokretnoj fazi, pa se stoga izraz može pojednostavljeno pisati:

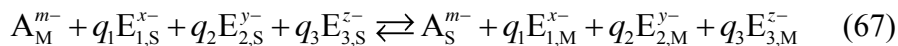
$$\log k_A = C - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x-}) \quad (66)$$

Veličina C sumarna je konstanta sviju konstantnih članova jednadžbe (65). S ciljem da se omogući primjena na eluense koji sadrže više od jednog kompeticijskog iona, LSS teorija doživjela je nekoliko modifikacija [36].

5.5. HOOVEROVA TEORIJA

Teoriju je 1982. predložio T. B. Hoover [39] i ona je za razliku od LSS teorije primjenjiva za eluense koji sadrže više kompeticijskih iona; uzima se u obzir utjecaj svih kompeticijskih iona na vrijeme zadržavanja. Za svaki se kompeticijski ion eluensa eksperimentalno određuje koeficijent selektivnosti odgovarajućeg ionskog izmjenjivačkog procesa (u otopinama u kojima se nalaze isključivo ioni koji se određuju).

Zamislit će se hipotetski proces ionske izmjene aniona analita, A^{m-} , koristeći eluens koji sadrži tri kompeticijska iona, E_1^{x-} , E_2^{y-} i E_3^{z-} :



gdje su m , x , y i z nabojni brojevi iona, a q_1 , q_2 i q_3 odgovarajući stehiometrijski koeficijenti prikazane kemijske jednadžbe. Suma koncentracija svih kompeticijskih iona vezanih na ionski izmjenjivač kolone pomnoženih s njihovim nabojnim brojem jednaka je kapacitetu proboja kolone:

$$Q_B = x \cdot c_S(E_1^{x-}) + y \cdot c_S(E_2^{y-}) + z \cdot c_S(E_3^{z-}) \quad (68)$$

Ekvivalentno prethodno napisanom izrazu za koeficijent selektivnosti (63), koeficijenti bi selektivnosti između dvaju preostalih iona prema ionu E_1^{x-} bili:

$$K_{A/E_1} = \frac{c_S^x(A^{m-}) \cdot c_M^m(E_1^{x-})}{c_M^x(A^{m-}) \cdot c_S^m(E_1^{x-})} \quad (69)$$

$$K_{E_2/E_1} = \frac{c_S^x(E_2^{y-}) \cdot c_M^y(E_1^{x-})}{c_M^x(E_2^{y-}) \cdot c_S^y(E_1^{x-})} \quad (70)$$

$$K_{E_3/E_1} = \frac{c_S^x(E_3^{z-}) \cdot c_M^z(E_1^{x-})}{c_M^x(E_3^{z-}) \cdot c_S^z(E_1^{x-})} \quad (71)$$

Koncentracije iona E_2^{y-} i E_3^{z-} vezanih na nepokretnu fazu mogu se dakle izraziti preko koncentracije E_1^{x-} iona vezanog na taj isti izmjenjivač:

$$c_S(E_2^{y-}) = c_M(E_2^{y-}) \cdot \left[K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^y(E_1^{x-})}{c_M^y(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (72)$$

$$c_S(E_3^{z-}) = c_M(E_3^{z-}) \cdot \left[K_{E_3/E_1} \cdot \frac{c_S^z(E_1^{x-})}{c_M^z(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (73)$$

Time koncentracija E_1^{x-} iona vezanog na izmjenjivač, uvažavajući jednadžbu (68), postaje nultočka funkcije:

$$Q_B = x \cdot c_S(E_1^{x-}) + y \cdot c_M(E_2^{y-}) \cdot \left[K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^y(E_1^{x-})}{c_M^y(E_1^{x-})} \right]^{1/x} + z \cdot c_M(E_3^{z-}) \cdot \left[K_{E_3/E_1} \cdot \frac{c_S^z(E_1^{x-})}{c_M^z(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (74)$$

Kako je za definirani ispitivani sustav kapacitet proboja kolone nepromjenjiv, jasno je da je koncentracija E_1^{x-} iona vezanog na izmjenjivač isključivo funkcija sastava pokretne faze:

$$c_S(E_1^{x-}) = f(c_M(E_1^{x-}), c_M(E_2^{y-}), c_M(E_3^{z-})) \quad (75)$$

Izraz (74) analitički se može riješiti samo za neke jednostavnije primjere kombinacija kompeticijskih iona u eluensu. Za ostale je slučajeve potrebno numeričko rješavanje. Hoover je u svojem izvodu pretpostavio da je sustav sastavljen od jednog dvovalentno (E_2^{2-} ; $y=2$) i dvaju jednovalentno nabijenih aniona (E_1^{-} ; $x=1$, E_3^{-} ; $z=1$), pa izraz (74) poprima konkretniji izgled:

$$Q_B = c_S(E_1^{-}) + 2c_M(E_2^{2-}) \cdot K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^2(E_1^{-})}{c_M^2(E_1^{-})} + c_M(E_3^{-}) \cdot K_{E_3/E_1} \cdot \frac{c_S(E_1^{-})}{c_M(E_1^{-})} \quad (76)$$

$$\frac{2c_M(E_2^{2-}) \cdot K_{E_2/E_1}}{c_M^2(E_1^-)} \cdot c_S^2(E_1^-) + \left[1 + \frac{c_M(E_3^-) \cdot K_{E_3/E_1}}{c_M(E_1^-)} \right] \cdot c_S(E_1^-) - Q_B = 0 \quad (77)$$

Rješavanjem kvadratne jednadžbe (77) dobiva se izraz za koncentraciju E_1^- iona vezanog na ionski izmjenjivač:

$$c_S(E_1^-) = \frac{c_M(E_1^-)}{-4c_M(E_2^{2-})K_{E_2/E_1}} \cdot \left\{ c_M(E_1^-) + c_M(E_3^-)K_{E_3/E_1} - \sqrt{\left[c_M(E_1^-) + c_M(E_3^-)K_{E_3/E_1} \right]^2 + 8c_M(E_2^{2-})K_{E_2/E_1}Q_B} \right\} \quad (78)$$

Mayer i Tompkins dokazali su da je prilagođeni volumen zadržavanja neke tvari u sustavu jednak njenom koeficijentu raspodjele [39]:

$$V_R' = V_R - V_0 = K_D \quad (79)$$

Tu je činjenicu iskoristio Hoover u svojem modelu, pa je kombinirajući jednadžbu (79) s izrazom za koeficijent selektivnosti analita A^{m-} (69) dobio ovisnost prilagođenog volumena zadržavanja analita o parametrima vezanima uz samo jedan kompeticijski ion: E_1^{x-} .

$$V_{R,A}' = K_{D,A} = \left[K_{A/E_1} \cdot \frac{c_S^m(E_1^{x-})}{c_M^m(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (80)$$

Jednadžba (80) izražena preko faktora zadržavanja (19) ima oblik:

$$k_A = \left[\frac{K_{A/E_1}}{V_M^x} \cdot \frac{c_S^m(E_1^{x-})}{c_M^m(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (81)$$

Kako je prema jednadžbi (75) $c_S(E_1^{x-})$ funkcija sastava pokretne faze, i sam izraz (81) time postaje funkcija sastava pokretne faze:

$$k_A = f\left(c_M(E_1^{x-}), c_M(E_2^{y-}), c_M(E_3^{z-})\right) \quad (82)$$

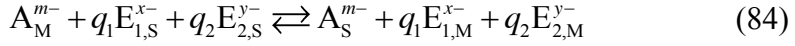
odnosno, za predloženu specifičnu kombinaciju eluensa:

$$k_A = \frac{K_{A/E_1}}{V_M} \cdot \frac{c_S^m(E_1^-)}{c_M^m(E_1^-)} \quad (83)$$

Uvrštavanjem izraza (78) u izraz za prilagođeni faktor zadržavanja analita A^{m-} (83) dobivaju se varijacije konačnih verzija Hooverova modela, naravno ovisne o nabojnom broju analita, m .

5.6. MODEL DVAJU KOMPETICIJSKIH IONA ELUENSA

Kao modifikaciju Hooverove teorije, 1984. godine Janke i Pagenkopf prezentirali su model dvaju kompeticijskih iona eluensa (engl. *dual eluent species model*, DES model) [41–43]. DES model pojednostavljuje Hooverov utoliko što reducira broj parametara koje je potrebno eksperimentalno odrediti s tri na dva: K_{A/E_1} i K_{E_2/E_1} [36].



Kako DES model nije ništa drugo doli primjena Hooverove teorije na eluens koji sadrži dva kompeticijska iona, jednađba (81) izvedena za Hooverovu teoriju u potpunosti je primjenjiva kod DES teorije. Za potpunost modela bitno je još jedino odrediti koncentraciju E_1^- iona vezanog na ionski izmjenjivač. Analogno izvodu za Hooverovu teoriju slijedi:

$$Q_B = x \cdot c_S(E_1^{x-}) + y \cdot c_S(E_2^{y-}) \quad (85)$$

$$c_S(E_2^{y-}) = c_M(E_2^{y-}) \cdot \left[K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^y(E_1^{x-})}{c_M^y(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (86)$$

$$Q_B = x \cdot c_S(E_1^{x-}) + y \cdot c_M(E_2^{y-}) \cdot \left[K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^y(E_1^{x-})}{c_M^y(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (87)$$

Jenke i Pagenkopf predložili su da se promatra sustav koji sadrži dva kompeticijska iona u eluensu, pri čemu je jedan nabijen jednovalentno (E_1^- ; $x=1$), a drugi dvovalentno (E_2^{2-} ; $y=2$). Tada jednađba (87) poprima izgled:

$$Q_B = c_S(E_1^-) + 2c_M(E_2^{2-}) \cdot K_{E_2/E_1} \cdot \frac{c_S^2(E_1^-)}{c_M^2(E_1^-)} \quad (88)$$

Rješenje jednadžbe glasi:

$$c_s(E_1^-) = \frac{\left[c_M(E_1^-) - \sqrt{c_M^2(E_1^-) - 8c_M(E_2^{2-})K_{E_2/E_1} \cdot Q_B} \right] \cdot c_M(E_1^-)}{-4c_M(E_2^{2-})K_{E_2/E_1}} \quad (89)$$

Uvrštavanjem dobivenog izraza za koncentraciju E_1^- iona vezanog na ionski izmjenjivač (89) u izraz za prilagođeni faktor zadržavanja analita A^{m-} (83), dobivaju se varijacije konačnih verzija DES modela, također ovisne o nabojnom broju analita, m .

5.7. TEORIJA VIŠESTRUKIH IONSKIH OBLIKA ELUENSA I ANALITA

Do danas su najkompleksniju od svih teorija uveli Hajós i suradnici 1995. godine [44]. Ona se naziva teorijom višestrukih ionskih oblika eluensa i analita (engl. *multiple species eluent/analyte*; MSEA) jer uzima u obzir interakcije svih kompeticijskih iona koji se nalaze u eluensu sa svim ionskim oblicima analita.

Promotrit će se ravnoteža ionske izmjene jednog od iona uzorka kompeticijskim ionima eluensa. Neka je u promatranom sustavu eluens trokomponentna otopina sastavljena od iona E_1^{x-} , E_2^{y-} , E_3^{z-} . Kemijska je jednadžba reakcije ionske izmjene odabranog iona A^{m-} na nepokretnoj fazi opisana izrazom (67), a kapacitet nepokretne faze jednadžbom (68). Označit će se udio ukupnog kapaciteta nepokretne faze koji zaposjeda pojedini kompeticijski ion sa X_1 , X_2 , odnosno X_3 :

$$X_1 = \frac{x \cdot c_s(E_1^{x-})}{x \cdot c_s(E_1^{x-}) + y \cdot c_s(E_2^{y-}) + z \cdot c_s(E_3^{z-})} = \frac{x \cdot c_s(E_1^{x-})}{Q_B} \quad (90)$$

$$X_2 = \frac{y \cdot c_s(E_2^{y-})}{x \cdot c_s(E_1^{x-}) + y \cdot c_s(E_2^{y-}) + z \cdot c_s(E_3^{z-})} = \frac{y \cdot c_s(E_2^{y-})}{Q_B} \quad (91)$$

$$X_3 = \frac{z \cdot c_s(E_3^{z-})}{x \cdot c_s(E_1^{x-}) + y \cdot c_s(E_2^{y-}) + z \cdot c_s(E_3^{z-})} = \frac{z \cdot c_s(E_3^{z-})}{Q_B} \quad (92)$$

Sukladno jednadžbi (80), a uzimajući u obzir jednadžbe (90)–(92), koeficijent bi selektivnosti izmijenjenog aniona, A^{m-} , s obzirom na pojedini kompeticijski ion, bio:

$$\begin{aligned} K_{D,A} &= \left\{ K_{A/E_1} \cdot \left[\frac{X_1 \cdot Q_B}{x \cdot c_M(E_1^{x-})} \right]^m \right\}^{1/x} \\ &= \left\{ K_{A/E_2} \cdot \left[\frac{X_2 \cdot Q_B}{y \cdot c_M(E_2^{y-})} \right]^m \right\}^{1/y} \\ &= \left\{ K_{A/E_3} \cdot \left[\frac{X_3 \cdot Q_B}{z \cdot c_M(E_3^{z-})} \right]^m \right\}^{1/z} \end{aligned} \quad (93)$$

Pretpostavit će se da osim iona A^{m-} u otopini postoje i njegovi hidratizirani ionski oblici; od $HA^{(m-1)-}$ do $H_{m-1}A^-$ koji se s ionima eluensa izmjenjuju prema jednadžbama:



...



kao i nedisocirani oblik H_mA . Oznake q_4 – q_9 predstavljaju odgovarajuće stehiometrijske koeficijente kemijskih jednažbi. Analogno izrazu (93) za preostale bi ionske oblike koeficijenti selektivnosti bili:

$$\begin{aligned} K_{D,HA} &= \left\{ K_{HA/E_1} \cdot \left[\frac{X_1 \cdot Q_B}{x \cdot c_M(E_1^{x-})} \right]^{m-1} \right\}^{1/x} \\ &= \left\{ K_{HA/E_2} \cdot \left[\frac{X_2 \cdot Q_B}{y \cdot c_M(E_2^{y-})} \right]^{m-1} \right\}^{1/y} \\ &= \left\{ K_{HA/E_3} \cdot \left[\frac{X_3 \cdot Q_B}{z \cdot c_M(E_3^{z-})} \right]^{m-1} \right\}^{1/z} \end{aligned} \quad (96)$$

$$\begin{aligned} K_{D,H_{m-1}A} &= \left\{ K_{H_{m-1}A/E_1} \cdot \left[\frac{X_1 \cdot Q_B}{x \cdot c_M(E_1^{x-})} \right] \right\}^{1/x} \\ &= \left\{ K_{H_{m-1}A/E_2} \cdot \left[\frac{X_2 \cdot Q_B}{y \cdot c_M(E_2^{y-})} \right] \right\}^{1/y} \\ &= \left\{ K_{H_{m-1}A/E_3} \cdot \left[\frac{X_3 \cdot Q_B}{z \cdot c_M(E_3^{z-})} \right] \right\}^{1/z} \end{aligned} \quad (97)$$

Ukupni koeficijent selektivnosti analita A (neovisno o obliku hidratiziranosti iona) može se pisati kao:

$$K_{D,A_{uk}} = \frac{c_S(A^{m-}) + c_S(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_S(H_{m-1}A^-)}{c_M(A^{m-}) + c_M(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_M(H_{m-1}A^-) + c_M(H_mA)} \quad (98)$$

$$= \frac{c_S(A^{m-}) + c_S(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_S(H_{m-1}A^-)}{c_M(A_{uk})}$$

Izraz $c_M(A_{uk})$ predstavlja kumulativnu koncentraciju svih ionskih oblika analita A u pokretnoj fazi. Molarni udio pojedinog oblika (i) analita A u pokretnoj će se fazi označiti grčkim slovom Φ :

$$\Phi_i = \frac{c_M(H_iA^{(m-i)-})}{c_M(A_{uk})} \quad (99)$$

Ekvivalentno izrazu (69) za preostale se hidratizirane oblike iona A^{m-} može pisati:

$$K_{HA/E_1} = \frac{c_S^x(A^{(m-1)-}) \cdot c_M^{m-1}(E_1^{x-})}{c_M^x(A^{(m-1)-}) \cdot c_S^{m-1}(E_1^{x-})} \quad (100)$$

$$K_{H_{m-1}A/E_1} = \frac{c_S^x(A^-) \cdot c_M(E_1^{x-})}{c_M^x(A^-) \cdot c_S(E_1^{x-})} \quad (101)$$

Odnosno kombinacijom izraza (98)–(101):

$$K_{D,A_{uk}} = \Phi(A^{m-}) \left[K_{A/E_1} \cdot \frac{c_s^m(E_1^{x-})}{c_M^m(E_1^{x-})} \right]^{1/x} + \dots + \Phi(H_{m-1}A^-) \left[K_{H_{m-1}A/E_1} \frac{c_s(E_1^{x-})}{c_M(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \quad (102)$$

Koristeći zapažanje Mayera i Tompkina (79) i dijeleći izraz s volumenom pokretne faze, V_M , jednačba (102) može se lako izraziti preko faktora zadržavanja:

$$\begin{aligned} k_{A_{uk}} &= \frac{\Phi(A^{m-})}{V_M} \left[K_{A/E_1} \cdot \frac{c_s^m(E_1^{x-})}{c_M^m(E_1^{x-})} \right]^{1/x} + \dots + \frac{\Phi(H_{m-1}A^-)}{V_M} \left[K_{H_{m-1}A/E_1} \frac{c_s(E_1^{x-})}{c_M(E_1^{x-})} \right]^{1/x} \\ &= \frac{\Phi(A^{m-})}{V_M} \cdot K_{D,A} + \dots + \frac{\Phi(H_{m-1}A^-)}{V_M} \cdot K_{D,H_{m-1}A} \end{aligned} \quad (103)$$

Za krajnji je izgled modela uz anion E_1^{x-} potrebno ukomponirati i preostala dva kompeticijska iona eluensa. Identično kao i prilikom izvođenja prethodno navedenih modela vremena zadržavanja, to je moguće izvesti kombinacijom izraza za koeficijente selektivnosti tih iona prema ionu E_1^{x-} (jednačbe (70) i (71)) te izraza za kapacitet nepokretnog sloja (68). Kao rezultat takve kombinacije dobiva se funkcija (74) čije je analitičko rješavanje moguće samo za jednostavnije primjere sastava eluensa. Hajós i suradnici, slično kao i Hoover, modelirali su s eluensom sastavljenim od jednog dvovalentno i dvaju jednovalentno nabijenih iona (E_1^- ; $x=1$, E_2^{2-} ; $y=2$, E_3^- ; $z=1$) te je za taj slučaj rješenje jednačbe (74) dano izrazom (78).

Uvrštenjem izraza $c_s(E_1^-)$ (78) u jednažbu (103) dobiva se konačna verzija MSEA modela:

$$k_{A_{uk}} = \frac{\Phi(A^{m-})}{V_M} K_{A/E_1} \cdot \left[\frac{\sqrt{p_1^2 + p_2} - p_1}{4c_M(E_2^{2-}) K_{E_2/E_1}} \right]^m + \dots$$

$$\dots + \frac{\Phi(H_{m-1}A^-)}{V_M} K_{H_{m-1}A/E_1} \cdot \left[\frac{\sqrt{p_1^2 + p_2} - p_1}{4c_M(E_2^{2-}) K_{E_2/E_1}} \right] \quad (104)$$

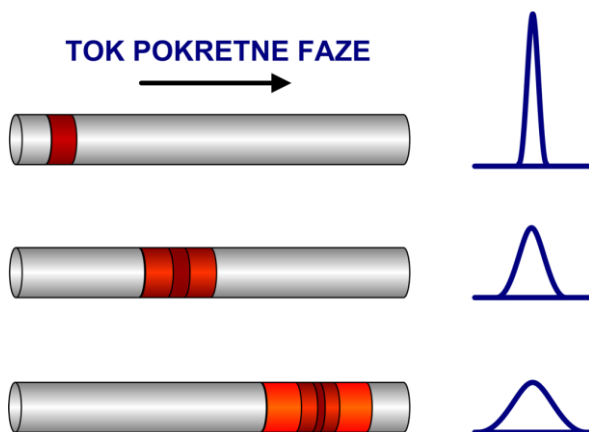
Zbog pojednostavljenja izraza uvedene su dvije nove veličine:

$$p_1 = c_M(E_1^-) + c_M(E_3^-) K_{E_3/E_1} \quad (105)$$

$$p_2 = 8c_M(E_2^{2-}) K_{E_2/E_1} Q_B \quad (106)$$

5.8. TEORIJA OBLIKA KROMATOGRFSKE KRIVULJE

Poznato je da se tvari kroz kromatografsku kolonu kreću u zonama unutar kojih se prema određenom koncentracijskom profilu raspoređuju oko njenog središta (slika 31). U idealnom slučaju koncentracijski profil odgovara Gaussovoj funkciji razdiobe (slika 32A). Svako odstupanje od idealnosti u većoj ili manjoj mjeri dovodi do deformacije kromatografske krivulje, odnosno do pojave njenog pružanja (engl. *peak fronting*; slika 32B) ili pak povlačenja (engl. *peak tailing*; slika 32C). Kromatografska veličina koja najbolje opisuje odstupanje od idealnosti naziva se *faktorom asimetričnosti*, A_s (u daljnjem tekstu pisano i kao asimetričnost).



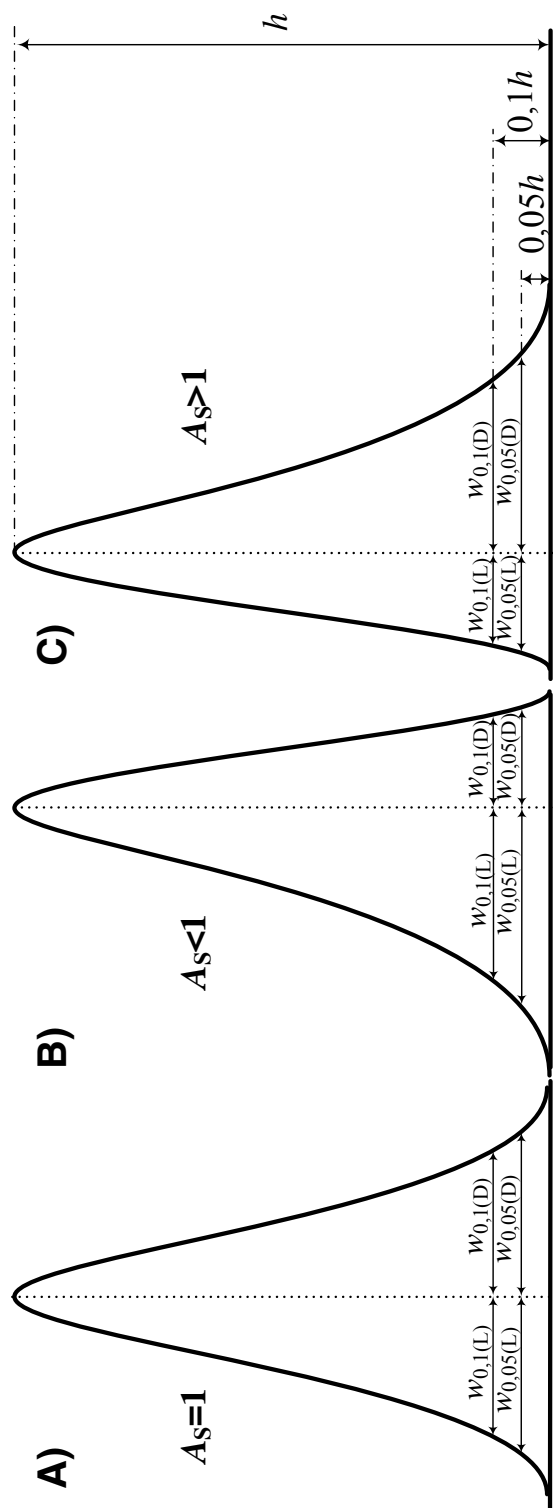
Slika 31. Širenje kromatografske zone. Crvenom bojom označena je zona uzorka unutar kromatografske kolone.

Asimetričnost je bezdimenzijska veličina definirana dvojako, ovisno o standardu koji se koristi. Prema američkoj i europskoj farmakopeji asimetričnost se računa kao omjer širine kromatografske krivulje na 5% njene visine ($w_{0,05(D)} + w_{0,05(L)}$) i dvostruke vrijednosti njene lijeve širine pri istoj visini [45]:

$$A_s = \frac{w_{0,05(D)} + w_{0,05(L)}}{2w_{0,05(L)}} \quad (107)$$

Ipak, većina kromatografičara današnjice [46–49] ravna se prema ALSSA (*Analytical and Life Science Systems Association*) standardu te asimetričnost računa kao omjer desne i lijeve širine kromatografske krivulje na 10% njene visine.

$$A_s = \frac{w_{0,1(D)}}{w_{0,1(L)}} \quad (108)$$



Slika 32. Faktor asimetričnosti kromatografske krivulje pri tri različita profila eluiranja:

A) simetrična krivulja, B) profil pružanja krivulje i

C) profil povlačenja krivulje.

U praktičnim se analizama kromatografska kolona smatra kvalitetnom ako faktor asimetričnosti poprima vrijednost u intervalu 0,9–1,2 [9].

Promatranjem s termodinamičkog stajališta mogu se usporediti situacije idealnog i neidealnog ponašanja sustava. Idealnim se smatraju sustavi u kojima kemijski potencijal svake tvari ovisi o njenoj koncentraciji prema izrazu:

$$\mu = \mu^0 + RT \ln c \quad (109)$$

gdje μ^0 predstavlja standardni kemijski potencijal (ovisan o temperaturi i tlaku sustava). U trenutku uspostavljanja ravnoteže ionske izmjene između dviju faza kromatografskog sustava, dolazi do izjednačavanja vrijednosti kemijskih potencijala izmjenjive tvari u objema fazama.

$$\mu_S^0 + RT \ln c_S = \mu_M^0 + RT \ln c_M \quad (110)$$

Jednostavnim matematičkim preoblikovanjem izraza (110) može se uočiti da je i omjer koncentracija tvari razdijeljene između nepokretne i pokretne faze sustava (koeficijent raspodjele, K_D) funkcija tlaka i temperature:

$$\frac{c_S}{c_M} = e^{\frac{\mu_M^0 - \mu_S^0}{RT}} \quad (111)$$

Pokretna i nepokretna faza sustava obično su toliko različite da, ako otopljena tvar i ima idealno ponašanje u jednoj od faza, to vjerojatno neće biti slučaj s drugom fazom. Neidealno ponašanje tvari može se opisati bilo izotermom, koja je pak ovisna o koncentracijama tvari u nepokretnoj i pokretnoj fazi, bilo zamjenom koncentracije u izrazu (109) aktivitetom, a .

$$a = \gamma \cdot c \quad (112)$$

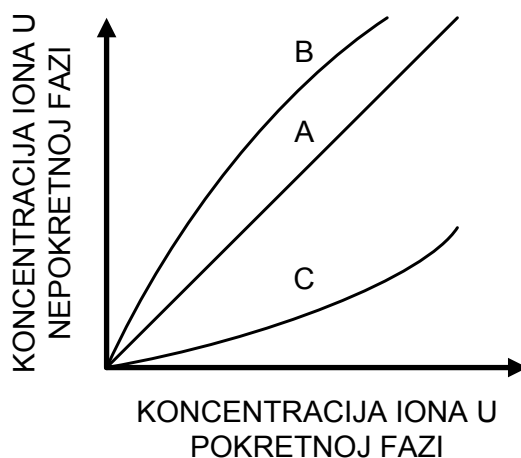
$$\mu = \mu^0 + RT \ln a \quad (113)$$

Grčkim slovom γ označen je koeficijent aktiviteta. Identično se prethodnom izvodu (jednadžbe (109)–(111)) može izraziti stvarni koeficijent raspodjele termodinamičke ravnoteže, K_D^* :

$$K_D^* = \frac{\gamma_s \cdot c_s}{\gamma_M \cdot c_M} \quad (114)$$

Izrazito malo kromatografskih sustava pokazuje idealno ponašanje (slika 33A). Znatno uobičajenija jest situacija prikazana krivuljom B, gdje nagib krivulje nije stalan, već opada s porastom koncentracije tvari u pokretnoj fazi. Upravo promatrajući takve različite oblike izotermi, može se pokušati objasniti što se to događa unutar kolone, a uvjetuje pojavu pružanja i povlačenja kromatografske krivulje. Za razliku od izoterme A, koja predstavlja konstantnost međufazne raspodjele tvari i samim time simetričan koncentracijski profil unutar zone, izoterma B jasno ukazuje da pri nižim koncentracijama

ispitivane tvari u pokretnoj fazi koeficijent raspodjele poprima znatno veće vrijednosti negoli je to slučaj za više koncentracijsko područje. Stoga će se tvari koje nadolaze unutar nove zone u većoj mjeri raspodijeliti na postojeća aktivna mjesta ionskog izmjenjivača, a za njihovo će eluiranje biti potrebna veća količina eluenta. U takvom se specifičnom slučaju maksimum eluiranja pomiče k višim vremenima zadržavanja, a krivulja eluiranja pokazuje trend početnog razvlačenja, tj. pružanja (slika 32B). Kod pružanja krivulje, područje nakon koncentracijskog maksimuma zone sadrži veću koncentraciju eluirane tvari nego što bi to bio slučaj kod simetrične raspodjele. Samim time koeficijent raspodjele (prema krivulji izoterme) ima manju vrijednost, manji je intenzitet raspodjele prema nepokretnoj fazi, te krivulja eluiranja dobiva izraženiji silazni trend. Primjenjujući sličnu logiku lako se može uočiti zašto izoterma C (slika 33) uzrokuje pojavu povlačenja kromatografske krivulje.



Slika 33. Tri različita oblika izoterme raspodjele iona između dviju faza.

Osim takvih pojava, vezanih uz prirodu tvari koja se izmjenjuje i njenih interakcija s česticama pokretne i nepokretne faze, u kompleksnim sustavima sastavljenima od više izmjenjivih tvari dolazi do njihove međusobne interakcije. Ove su interakcije, osobito u situacijama kada su tvari neadekvatno razdvojene, dodatan čimbenik koji može utjecati na oblik kromatografske krivulje.

6. DETEKCIJA SIGNALA

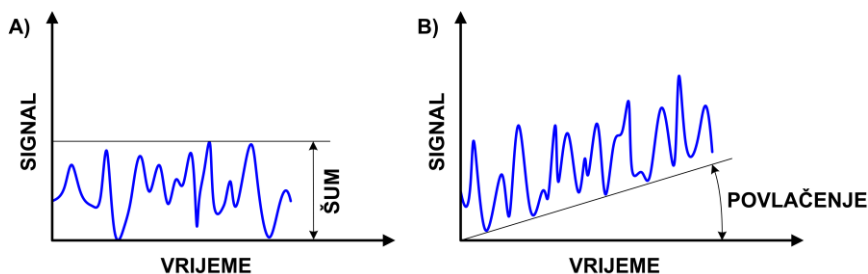
Bez obzira o kojoj se vrsti detekcije radilo, svaki dobar detektor mora se odlikovati:

- niskom razinom šuma i povlačenja signala,
- visokom osjetljivošću,
- širokim dinamičkim područjem linearnosti,
- malim mrtvim volumenom protočne ćelije.

6.1. POVLAČENJE I ŠUM SIGNALA

Šum bazne linije kratkotrajna je fluktuacija i odstupanje od ravne linije uzrokovano slučajnom pogreškom detektora: nestabilnošću električnog napajanja, elektroničkih krugova, izvora zračenja, temperature... Šum izravno utječe na osjetljivost detektora. Na slici 34 prikazan je šum i povlačenje signala.

Za razliku od šuma koji predstavlja kratkotrajnu fluktuaciju signala (visokofrekventnu), povlačenje je signala odstupanje bazne linije od horizontalnog položaja. Uzrok tome najčešće je loše uravnoteženje kromatografskog sustava odnosno nekonstantnost temperature, sastava pokretne faze ili nekog drugog faktora unutar kromatografskog sustava kroz duži vremenski period. Gradijentno eluiranje može jako utjecati na povlačenje signala zbog toga što je njegov osnovni princip zasnovan na promjeni sastava pokretne faze tijekom analize. Za rješavanje tog problema postoje različite mogućnosti.



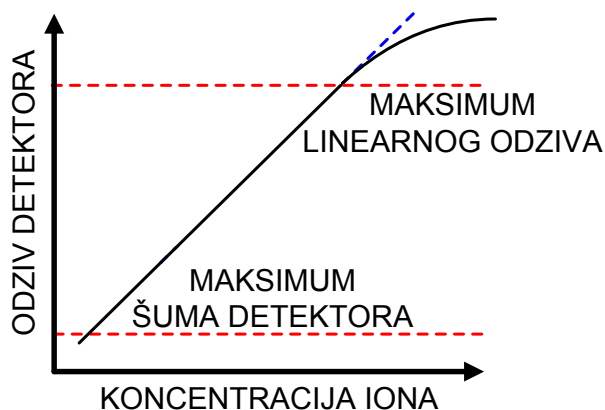
Slika 34. A) šum i B) povlačenje signala.

6.2. OSJETLJIVOST

Osjetljivost je detektora njegova mogućnost da nedvojbeno razlikuje male razlike u koncentraciji analita. Drugim riječima, to je nagib umjernog pravca (promjena koncentracije u jedinici promjene signala). Osjetljivost ovisi o standardnom odstupanju mjerenja (nasumičnoj pogrešci ili šumu). Osjetljivost detekcije metode može se izraziti kao masena ili koncentracijska osjetljivost, što treba jasno razlikovati. Primjerice pojedini detektori mogu mjeriti vrlo male volumene uzorka, samim time i vrlo male mase uzorka (masena osjetljivost), ali to nužno ne znači da je koncentracija pojedinih tvari u takvim uzorcima mala (koncentracijska osjetljivost).

6.3. LINEARNO PODRUČJE ODZIVA

Linearno područje odziva (slika 35) omeđeno je šumom i maksimalnom koncentracijom nakon koje dolazi do samoprigušenja signala, a zatim i odstupanja od linearnosti i pada osjetljivosti detektora. Sva je mjerenja potrebno izvršiti u linearnom području odziva.



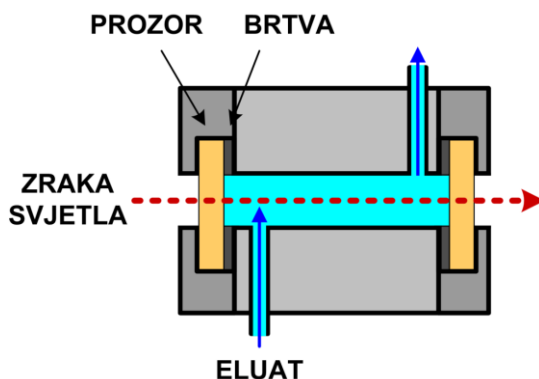
Slika 35. Linearno područje odziva.

6.4. VOLUMEN PROTOČNE ČELIJE

Protočna se ćelija (slika 36) sastoji od košare u kojoj se mjeri signal, a ovisno o vrsti detekcije košara mora imati:

- leće – omogućuju prolazak elektromagnetskog zračenja i spektrometrijska mjerenja,
- elektrode – omogućuju elektrokemijska mjerenja.

Uzorak u struji eluensa dostavlja se u košaru i odvodi u otpad (ili drugi detektor) putem kapilara malog promjera.



Slika 36. Protočna ćelija za spektrometrijska mjerenja.

Ako ćelija ima velik zadržani volumen, dolazi do nepotrebnog širenja kromatografskih zona što izravno utječe na odjeljivanje odnosno razlučivanje te osjetljivost metode (niske i široke krivulje odziva analita koje je teško razlučiti od šuma).

6.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE DETEKCIJE

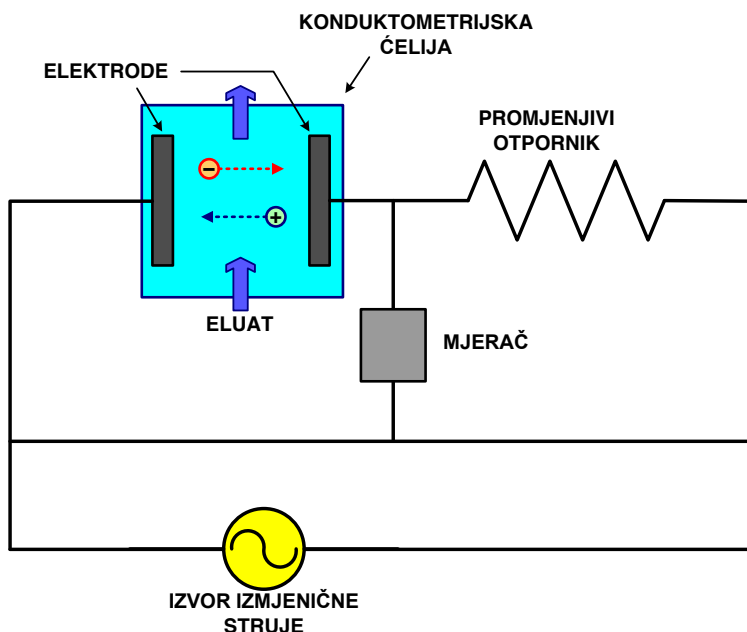
Elektrokemijske se metode detekcije u osnovi mogu podijeliti na metode u masi otopine, koje mjere svojstvo cijele otopine, i površinske metode, gdje je signal funkcija fenomena koji se događa na površini između elektrode i otopine koja je u kontaktu s elektrodom. Mjerenja provodnosti otopine, koja je proporcionalna ukupnoj koncentraciji otopljenih iona, primjer je elektrokemijske metode kod koje se mjeri svojstvo cijele otopine. Primjer površinske elektrokemijske metode nalazimo pak kod određivanja pH korištenjem pH-elektrode.

6.5.1. Konduktometrijska detekcija

Kombinacija ionske izmjenjivačke kolone i konduktometrijskog detektora predstavlja najvažniju konfiguraciju ionske kromatografije te se najčešće koristi u praksi [50]. Provodnost se definira kao mogućnost otopine elektrolita da u električnom polju, između dviju elektroda, provede struju migracijom iona; u sustavu se ne odvijaju redoks-reakcije (ampermetrija).

Konduktometrijski se detektor sastoji od konduktometrijske ćelije s dvije elektrode (slika 37) koje su sastavni dio Wheatstonova

mosta, gdje se impedancija mijenja s promjenom koncentracije iona unutar ćelije. Za mjerenje se koristi izmjenična struja jer bi istosmjerna polarizirala elektrode, a to bi uzrokovalo stvaranje plinova unutar pokretne faze, odnosno povećani šum signala.



Slika 37. Shematski prikaz konduktometrijskog detektora.

Relacija između napona i jakosti struje dana je Ohmovim zakonom:

$$R = \frac{U}{I} \quad (115)$$

gdje je R električni otpor izražen u ohmima, Ω , U električni napon u voltima, V, a I jakost struje u amperima, A. Recipročna vrijednost

otpora naziva se električnom vodljivošću, G , i ima jedinicu siemens, S, po definiciji jednaku Ω^{-1} :

$$G = \frac{1}{R} \quad (116)$$

Otpor otopine elektrolita ovisi o njegovim dimenzijama, odnosno za konkretni slučaj konduktometrijske detekcije o površini elektroda koje su u kontaktu s elektrolitom, A , i njihovoj međusobnoj udaljenosti, l .

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A} \quad (117)$$

Veličina ρ naziva se električnom otpornošću i izražava u Ω m. Omjer udaljenosti i površina elektroda je konstanta ćelije, K_C :

$$K_C = \frac{l}{A} \quad (118)$$

Konstanta ćelije u pravilu se ne određuje pomoću umjernih otopina. Recipročna vrijednost električne otpornosti predstavlja pak električnu provodnost, κ / S m⁻¹, vjerojatno najčešću varijablu u konduktometriji:

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad (119)$$

$$\kappa = G \cdot K_C \quad (120)$$

Električna provodnost ovisna je o vrsti i koncentraciji otopljenih sastojaka te se može prikazati izrazom:

$$\kappa = \Lambda \cdot c_e \quad (121)$$

pri čemu je $\Lambda / \text{S m}^2 \text{ mol}^{-1}$ molarna provodnost elektrolita, a $c_e / \text{mol dm}^{-3}$ njegova množinska koncentracija. S obzirom na brojčane vrijednosti provodnosti elektrolita, upotreba je osnovnih SI jedinica nepraktična u svakodnevnim izračunima. Uvažavajući stoga uobičajeni način izražavanja spomenutih varijabli izraz (121) najčešće se prezentira u formi:

$$\kappa / \text{S cm}^{-1} = \frac{\Lambda / \text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1} \cdot c_e / \text{mol dm}^{-3}}{1000} \quad (122)$$

Vidljivo je da električna provodnost raste linearno s porastom koncentracije elektrolita. Međutim taj linearni odnos vrijedi samo za razrijeđene otopine. Kod jakih se elektrolita molarna provodnost ponaša prema Debye-Hückel-Onsagerovu zakonu [51]:

$$\Lambda = \Lambda_{\infty} - K\sqrt{c_e} \quad (123)$$

gdje je Λ_{∞} molarna provodnost elektrolita pri beskonačnom razrjeđenju, a K Kohlrauschova konstanta.

Tablica 2. Molarne provodnosti nekih ionskih vrsta u beskonačno razrijeđenim vodenim otopinama pri 25 °C [50].

ANIONI	$\lambda_{\infty} / \text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$	KATIONI	$\lambda_{\infty} / \text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$
OH^-	198	H^+	350
F^-	54	Li^+	39
Cl^-	76	Na^+	50
Br^-	78	K^+	74
I^-	77	NH_4^+	73
NO_2^-	72	$\frac{1}{2} \text{Mg}^{2+}$	53
NO_3^-	71	$\frac{1}{2} \text{Ca}^{2+}$	45
HCO_3^-	45	$\frac{1}{2} \text{Sr}^{2+}$	59
$\frac{1}{2} \text{CO}_3^{2-}$	72	$\frac{1}{2} \text{Ba}^{2+}$	64
H_2PO_4^-	57	$\frac{1}{2} \text{Zn}^{2+}$	53
$\frac{1}{3} \text{PO}_4^{3-}$	69	$\frac{1}{2} \text{Cu}^{2+}$	55
$\frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-}$	80	$\frac{1}{2} \text{Pb}^{2+}$	71
SCN^-	66	$\frac{1}{2} \text{Co}^{2+}$	53
CH_3COO^-	41	$\frac{1}{3} \text{Fe}^{3+}$	70
$\frac{1}{2}$ ftalat	38	$\text{N}(\text{Et})_4^+$	33
propionat	36		
benzoat	32		
silikat	30		

Prema Kohlrauschovu zakonu molarna je provodnost elektrolita pri beskonačnom razrjeđenju jednaka zbroju molarnih provodnosti njegovih kationa i aniona, λ_{∞} . Primjerice za elektrolit K_kA_a koji disocira prema izrazu:



molarna bi provodnost bila:

$$\Lambda_{\infty} = k \cdot \lambda_{\infty}(K^{a+}) + a \cdot \lambda_{\infty}(A^{k-}) \quad (125)$$

Molarne provodnosti aniona i kationa obično su između 35 i 80 S cm² mol⁻¹. Iznimka su H⁺ i OH⁻ ioni koji zbog svoje izuzetne pokretljivosti imaju 350 odnosno 198 S cm² mol⁻¹. Uz pomoć tabeliranih vrijednosti za molarne provodnosti iona i molarnu provodnost čistog otapala, moguće je sa zadovoljavajućom točnošću izračunati molarnu provodnost otopine. Osim ionske vrste i njezine koncentracije, na provodnost jako utječu temperatura i polarnost otapala.

6.5.1.1. Ionska kromatografija bez supresora

U ionskoj kromatografiji bez kemijskog supresora (izravna ionska kromatografija) veliki su zahtjevi postavljeni pred konduktometrijski detektor, a zbog velike pozadinske provodnosti u odnosu na mjereni signal. Kako električna provodnost ovisi o

temperaturi, potrebno je osigurati konstantnost temperature u konduktometrijskoj ćeliji (gradijent temperature mora biti manji od 0,01 °C). Osjetljivost konduktometrijskih mjerenja ovisi o razlici u molarnoj provodnosti između analita i eluensa:

$$\kappa \propto c_e \cdot (\Lambda_{\text{analita}} - \Lambda_{\text{eluensa}}) \quad (126)$$

Kada se izravna ionska kromatografija koristi za određivanja aniona, kao eluensi se najčešće koriste soli ftalne, silicijeve ili benzojeve kiseline zato što one imaju malu provodnost (tablica 2). Dakle ako se u ćeliji detektora pojavi uzorak veće molarne provodnosti od eluensa, nastaje pozitivan odziv detektora (pozitivna kromatografska krivulja). Nasuprot tome negativna kromatografska krivulja nastaje ako je molarna provodnost uzorka manja od molarne provodnosti iona eluensa. Primjer dobivanja negativne krivulje analiza je fosfata u ftalnoj kiselini. Naime u 2 mmol dm⁻³ ftalne kiseline pri pH = 5,0 fosfat je prisutan u obliku H₂PO₄⁻. Kako je provodnost dihidrogenfosfata (Λ_∞(H₂PO₄⁻) = 33) manja od provodnosti ftalata (Λ_∞(ftalat) = 38), pri tim se uvjetima dobiva negativna kromatografska krivulja. Kada se određivanje provodi pri pH-vrijednostima većima od 5,0 dolazi do pojavljivanja pozitivne krivulje jer se fosfat nalazi u obliku hidrogenfosfata (Λ_∞(HPO₄²⁻) = 57).

Kod određivanja se alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa kao eluens najčešće koristi 2 mmol dm⁻³ HNO₃. Kako proton ima iznimno visoku molarnu provodnost, što je rezultat njegova specifična mehanizma pokretljivosti, provodnost drastično opada čim se vodikov

ion zamjeni ionom uzorka. To dovodi do pojavljivanja negativne kromatografske krivulje [50].

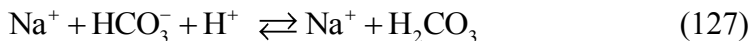
6.5.1.2. Ionska kromatografija s kemijskim supresorom

Prigušivanje pozadinskog šuma u ionskoj je kromatografiji potrebno uvijek kada velika provodnost eluensa onemogućava detekciju [50].

Kemijska se supresija zasniva na uporabi soli slabo disociranih kiselina kao eluensa (primjerice NaHCO_3). Svi supresori imaju isti zadatak, a to je poboljšanje detekcije analita. Potrebno je uočiti razliku između dvaju učinaka supresorskih reakcija:

- visoku provodnost eluensa potrebno je što više smanjiti,
- ioni analita trebaju se prevesti u ionske vrste s većom molarnom provodnosti.

Kada se kod analize aniona kao eluens koristi elektrolit natrijev karbonat/natrijev hidrogenkarbonat, u supresoru dolazi do ionske izmjene kationa s vodikovim ionom: u prvom se redu izmjenjuje natrij pri čemu dolazi do stvaranja slabo disocirane ugljične kiseline (127).

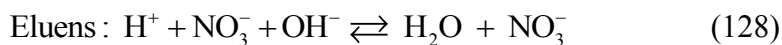


Ova reakcija dovodi do smanjivanja provodnosti eluensa (prvi učinak supresora).

Rečeno je da se pri supresiji svi kationi zamjenjuju protonom. Kako proton ima veću molarnu provodnost od ostalih kationa, ta reakcija omogućuje bolju osjetljivost sustava (drugi učinak supresora).

Primjerice molarna provodnost otopine NaCl iznosi oko $126 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (suma molarnih provodnosti Na^+ i Cl^- ; tablica 2). Ako se Na^+ ion zamijeni protonom, u otopini imamo elektrolit HCl čija je molarna provodnost znatno veća od ishodišne soli i iznosi oko $426 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Naravno, ovaj efekt osobito dolazi do izražaja kod jakih kiselina. Za srednje jake i slabe kiseline povećanje je osjetljivosti znatno manje.

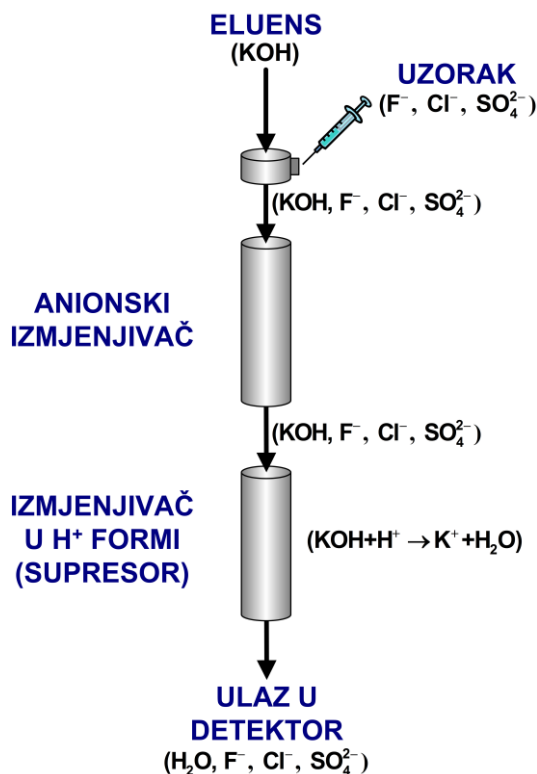
Pri analizi kationa se tijekom supresije anioni elektrolita zamjenjuju hidroksidnim ionima. Promotrimo slučaj kada se kao eluens koristi dušična kiselina, a kao analit je prisutan natrijev klorid. Tada dolazi do sljedećih reakcija:



U ovom slučaju možemo kazati da je uglavnom ispunjen prvi kriterij uporabe supresora (smanjenje provodnosti eluensa). Povećanje osjetljivosti uslijed izmjene svih anionskih vrsta hidroksidnim ionima ipak je znatno manje izražen efekt negoli je to bio u slučaju analize aniona.

6.5.1.3. Supresori

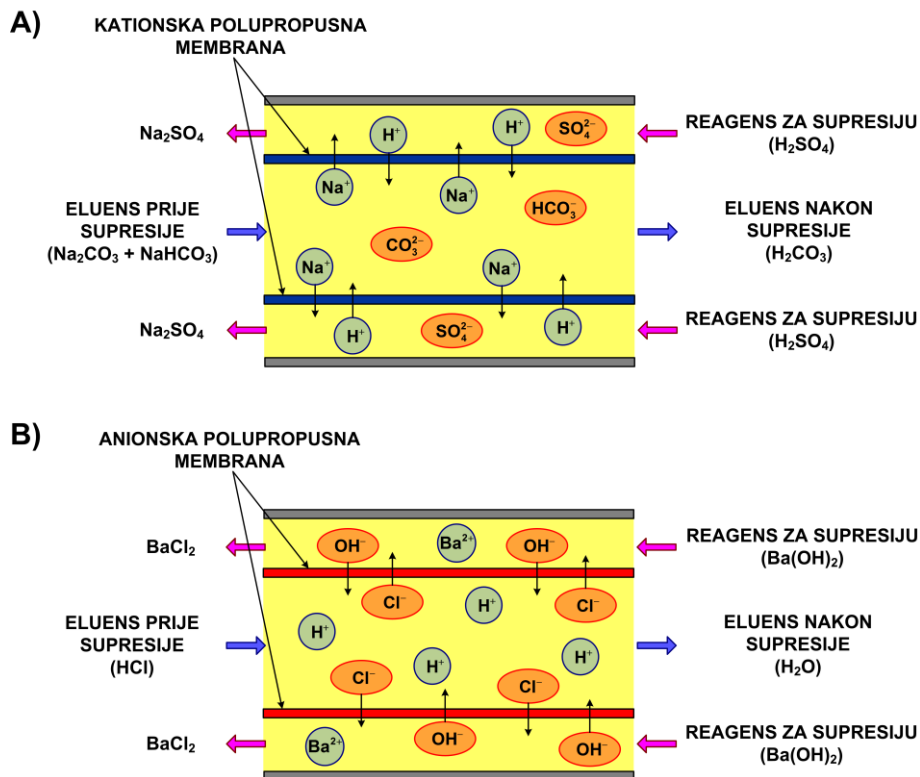
Supresori se mogu podijeliti na diskontinuirano i kontinuirano obnovljive. Kao diskontinuirano obnovljivi supresori (slika 38) koriste se ionske izmjenjivačke kolone. Nedostatak je ovakvih supresorskih kolona taj što se nakon nekoliko sati rada istroše te se moraju obnoviti.



Slika 38. Kolonski diskontinuirano obnovljivi supresor.

Svi kontinuirano obnovljivi supresori (slika 39) sadrže ionskoizmjenjivačka vlakna ili membranu te rade na protustrujnom principu. Kod vlaknastih su supresora vlakna uronjena u agens za obnavljanje, npr. razrijeđenu sumpornu kiselinu. Eluens i analit protječu kroz vlakna te kroz njih dolazi do ionske izmjene iona eluensa i analita s protonima. Membranski je supresor konstruiran na principu sendviča. Eluens i analit protječu kroz film između dviju membrana, a otopina za obnavljanje smještena je ispod i iznad tih membrana. Prednost je membranskih i vlaknastih supresora u kontinuiranosti

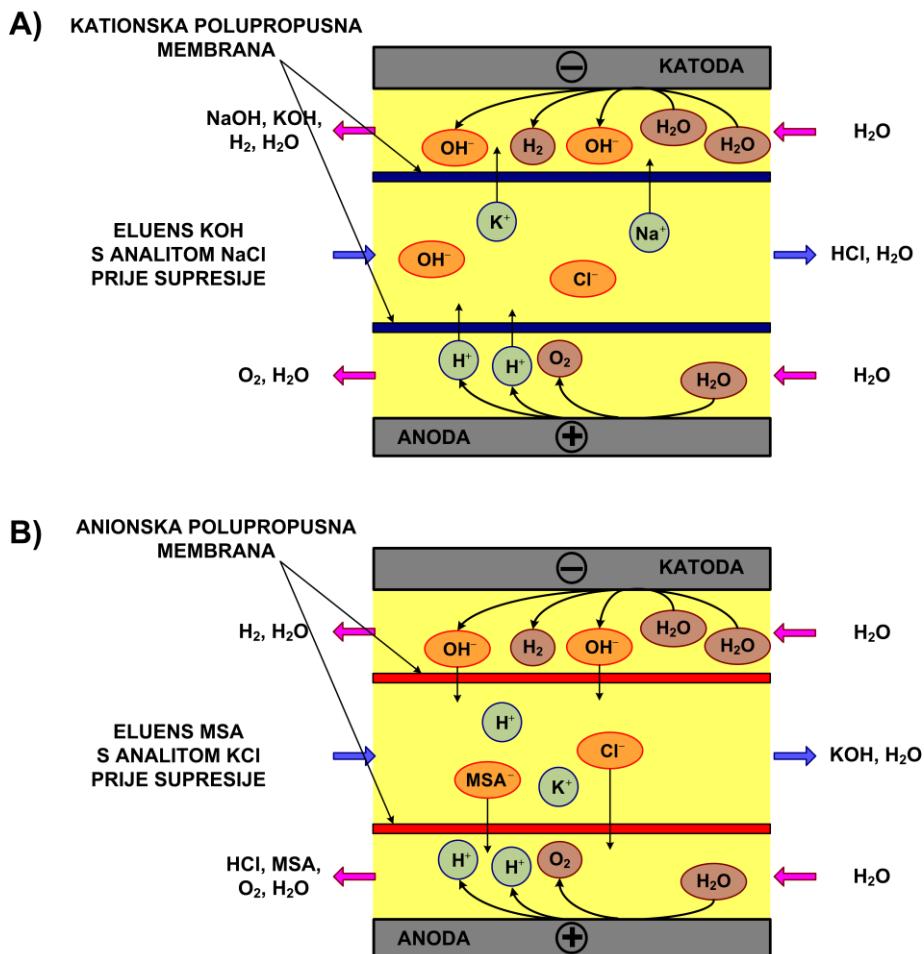
obnavljanja, a mana osjetljivost na tlak i difuziju iona otopine za obnavljanje u eluens.



Slika 39. Shematski prikaz membranski kontinuirano obnovljivih supresora:

A) pri analizi aniona i B) pri analizi kationa.

Supresiju signala moguće je raditi i elektrolitičkim supresorom koji H^+ i OH^- ione, potrebne za supresiju, dobiva elektrolizom vode (slika 40).



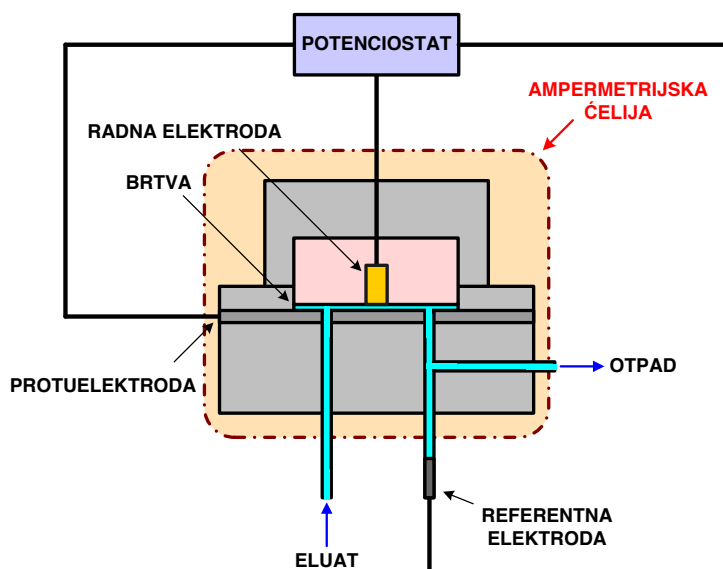
Slika 40. Shematski prikaz elektrolitičkog supresora:

A) pri analizi aniona i B) pri analizi kationa.

Elektrolitičke supresore moguće je spojiti da rade u kontinuiranom regeneracijskom modu (slika 1), gdje se voda potrebna za elektrolizu i stvaranje H^+ i OH^- iona dobiva iz razrijeđene otopine eluensa, poslije detekcije, a prije negoli se eluens ispust u otpad.

6.5.2. Ampermetrijska detekcija

Ampermetrijska se detekcija općenito koristi za analize otopina tvari s pK vrijednostima iznad 7 koje se zahvaljujući maloj disocijaciji teško ili gotovo nikako ne detektiraju primjenom konduktometrijske detekcije uz supresor. Konvencionalni ampermetrijski detektori koriste troelektrodnú detektorsku ćeliju koja se sastoji od radne elektrode, referentne elektrode i protuelektrode (slika 41).



Slika 41. Ampermetrijski detektor.

Između referentne i radne elektrode uspostavlja se razlika potencijala uslijed čega na površini radne elektrode dolazi do redoks-reakcije. Struja elektrona (Faradayeva struja), koja nastaje kao produkt redoks-reakcije, uravnotežuje se sa strujom koja u suprotnom smjeru teče na protuelektrodi. Jakost struje elektrokemijske reakcije čini signal

detektora, a potencijal izmjeren na referentnoj elektrodi služi za korekciju uspostavljene razlike potencijala.

Tablica 3. Elektroaktivni spojevi te odgovarajuće radne elektrode i potencijali.

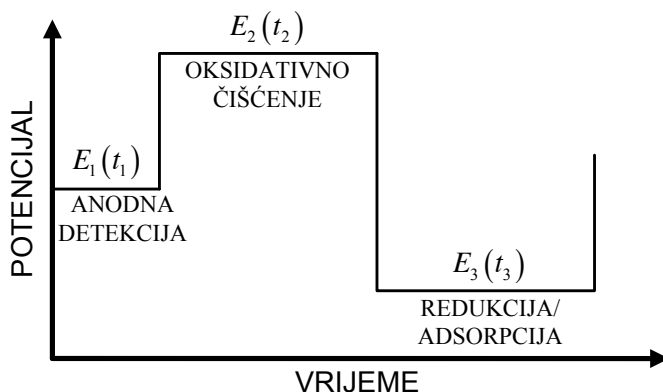
Analit	Radna elektroda	Radni potencijal / V
HS^- , CN^-	Ag	0,0
Br^- , I^- , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	Ag	0,2
SO_3^{2-}	Pt	0,7
OCl^-	Pt	0,2
AsO_2^-	Pt	0,85
N_2H_4	Pt	0,5

Ampermetrijski se detektori koriste za analiziranje mnoštva anorganskih i organskih iona poput sulfida i cijanida, arsena (III), halogenida i oksihalogenida, nitrita, tiosulfata, hidrazina, fenola itd. Ovisno o kemijskim i elektrokemijskim svojstvima analita primjenjuju se različite radne elektrode i protuelektrode kao i različiti radni potencijali. Pregled nekih elektrokemijski aktivnih tvari te odgovarajućih radnih elektroda i potencijala dan je u tablici 3.

6.5.2.1. Pulsna ampermetrijska detekcija

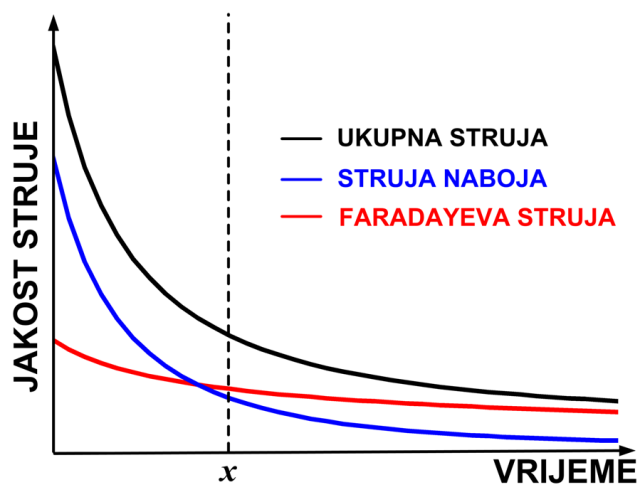
Gubitak aktivnosti elektroda od plemenitog metala, uzrokovan apsorpcijom organskih spojeva, mučio je elektroanalitičare još od početka voltametrije na čvrstim elektrodama [52]. Rješenje tog problema nađeno je u pulsnoj ampermetrijskoj detekciji. Pulsna

ampermetrijska detekcija, za razliku od prethodno opisane detekcije, u principu koristi tri različita radna potencijala, E_1 , E_2 i E_3 , koji su primijenjeni za vremena t_1 , t_2 i t_3 na radnoj elektrodi za mjerenje jedne točke na kromatogramu (u jedinici vremena eluiranja). Posljedična jakost struje mjeri se (integrira) samo u kratkim vremenskim intervalima ukupnog pulsa. Primjenom dodatnih potencijala (pozitivnijih ili negativnijih od integriranih), oksidirane i reducirane adsorbirane tvari mogu biti uklonjene s elektrodne površine reverznom redoks-reakcijom (slika 42).



Slika 42. Oblik pulsa potencijala u ampermetrijskoj detekciji.

Dvije se vrste struje pojavljuju tijekom oksidacije; struja naboja i Faradayeva struja. Struja naboja rezultat je nabijanja granice faza između elektrode i mase otopine koja se ponaša kao kondenzator. Faradayeva struja predstavlja prijenos elektrona pri oksidaciji analita. Pad struje naboja slijedi zakon eksponencijalnog vremena kao što je prikazano na slici 43.



Slika 43. Pad jakosti struje unutar primijenjenog pulsa.

Pad Faradayeve struje s vremenom opisan je Cottrellovom jednažbom:

$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot c_0 \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t}} \quad (130)$$

gdje je I jakost struje, n broj izmijenjenih elektrona, A površina elektrode, D difuzijski koeficijent analita, c_0 početna koncentracija reducirajućeg analita, a t vrijeme. Prema izrazu (130) jakost struje je funkcija $t^{-1/2}$, a postoji i izravna proporcionalnost s koncentracijom analita. Mjerena ukupna jakost struje zbroj je obiju jakosti struja. Zbog toga što je jakost struje naboja puno veća od Faradayeve struje, mjerenje ukupne jakosti struje mora se odgoditi za otprilike x ms nakon primjene pulsa (slika 43; mjerenje je odgođeno za kraj pulsa E_1). Tijekom tog mjerenja omjer je Faradayeve struje prema struji

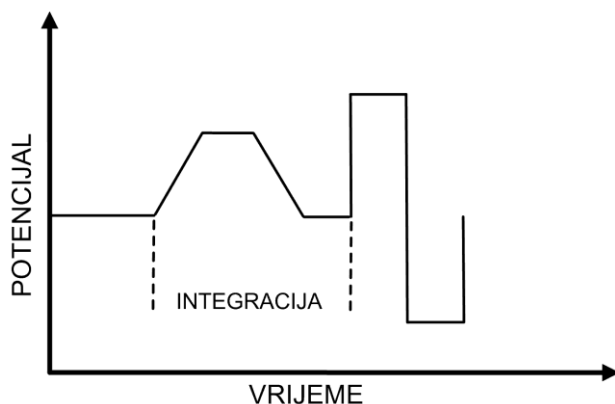
naboja povećan s obzirom na to da struja naboja pada mnogo brže u jedinici vremena.

6.5.2.2. Integrirana ampermetrijska detekcija

Integrirana ampermetrija drugi je oblik pulsne ampermetrije. Koristi se uglavnom za detekciju aminokiselina, amina i sumpornih organskih spojeva. U pulsnoj se ampermetriji rezultirajuća jakost struje iz oksidacijske reakcije mjeri pri konstantnom oksidacijskom potencijalu, nakon primjene pulsa i pada struje naboja. U integriranoj se ampermetriji potencijal E_1 ne drži konstantnim, već je naizmjeničan. Prema tome oksidacija se analita i metala radne elektrode odvija istovremeno pri visokom potencijalu. Metalni se oksid stvoren pri tom potencijalu odmah zatim ponovno reducira pri nižem potencijalu. Zbog toga što je oksidacija elektrodne površine reverzibilan proces, a oksidacija analita nije, rezultirajući je signal uglavnom karakteriziran strujnim doprinosom od oksidacije analita. Integracijom se jakosti struje tijekom ovakvog ciklusa dobiva ukupni signal za odgovarajući analit, a metoda je puno osjetljivija. Pozitivan i negativan potencijal čišćenja radne elektrode dio su pulsnog niza koji slijedi nakon integracijskog koraka. Shematski primjer takvog niza prikazan je na slici 44.

Prednost integrirane ampermetrije leži u kulometrijskoj kompenzaciji naboja koji su rezultat stvaranja i naknadne redukcije metalnog oksida. Prema tome osnovni pomak i osnovni poremećaji, izazvani malim varijacijama sastava pokretne faze, eliminirani su. Cijeli je sustav manje osjetljiv na promjene pH-vrijednosti koje utječu

i na njegove potencijale za stvaranje i redukciju metalnog oksida. Potencijal pri kojem je metalna elektrodna površina oksidirana smanjuje se povećanjem pH-vrijednosti.

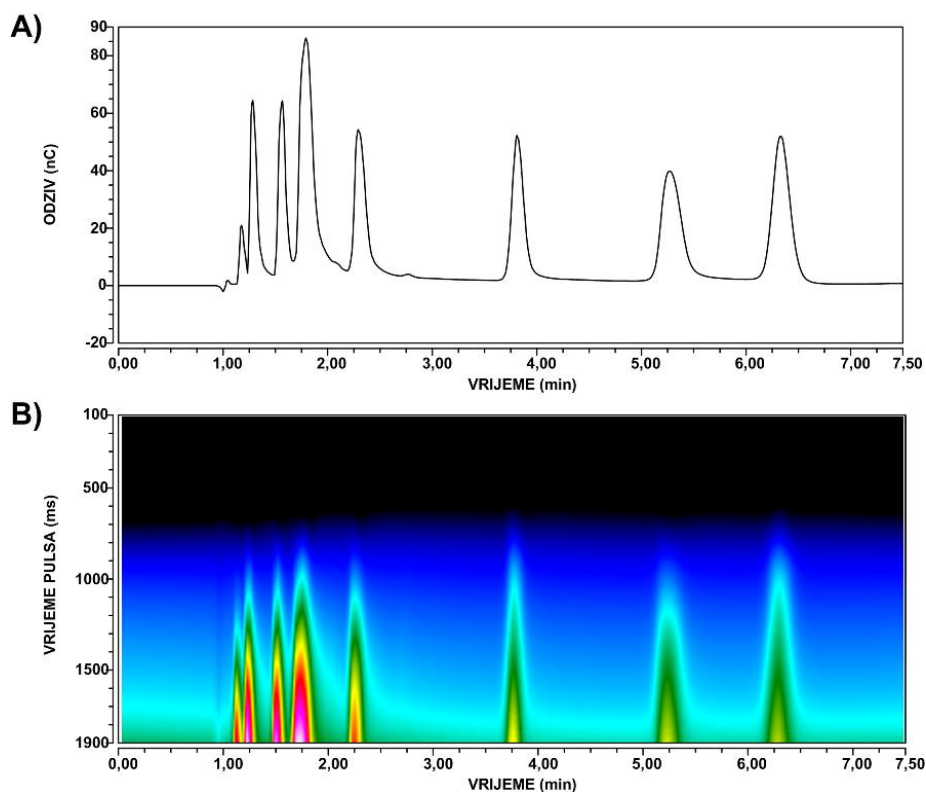


Slika 44. Puls u integriranoj amperometriji.

6.5.2.3. Trodimenzionalna amperetrija

Uobičajenom se ampermetrijom kroz unaprijed određeni vremenski period prikupljaju podaci o jakosti struje nastale kao posljedica uspostavljenog potencijala. Trodimenzionalna amperetrija proširuje uobičajenu ampermetriju tako da omogućuje kontinuirano mjerenje jakosti struje u cijelom periodu valnog oblika (slika 45), tj. jakost je struje integrirana. Kako različiti kemijski spojevi oksidiraju pri različitim potencijalima, male razlike u iznosu jakosti struje, nastale tijekom pulsnog vala, mogu dati dodatne informacije o identitetu i čistoći tvari koje se analiziraju. Te se razlike mogu mjeriti usporedbom površina kromatografskih krivulja dobivenih integracijom struje kroz različite vremenske periode unutar pulsnog vala. Omjer površina krivulja za različite integracijske periode omogućuje usporedbu

nepoznatog i standardnog analita. Nepoznati se analit može identificirati kada je omjer površina njegovih kromatografskih krivulja, promatranih u različitim integracijskim periodima, brojčano isti kao i onaj standarda (uz, naravno, isto vrijeme zadržavanja). Stupanj je odstupanja između tih omjera mjera čistoće kromatografske krivulje. Odnos trodimenzionalne i uobičajene ampermetrije na neki je način sličan odnosu u kojem se detekcija s nizom dioda (PDA) nalazi s UV/VIS apsorpcijskom detekcijom pri jednoj valnoj duljini.



Slika 45. Amperometrijska detekcija: A) uobičajena amperetrija i B) trodimenzionalna amperetrija (treća dimenzija prikazana je obojenjem).

6.6. UV/VIS METODE DETEKCIJE

UV/VIS metode detekcije pripadaju spektroskopskim ili preciznije spektrometrijskim odnosno spektrofotometrijskim metodama.

Spektroskopija

Spektroskopija izučava interakcije između tvari i elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje može imati različite oblike: rendgenske zrake, mikrovalovi, UV/VIS zrake, IR zrake, radiovalovi... Rezultat je spektroskopske analize spektar utjecaja intenziteta zračenja na analiziranu tvar ovisno o frekvenciji fotona ili valnoj duljini zračenja. Spektroskopija proučava spektre apsorpcije zračenja, emisije zračenja i nasumično nastale spektre.

Spektrometrija

Spektrometrija proučava spektre koji nisu nužno rezultat interakcije tvari s elektromagnetskim zračenjem, a rezultat analize nije nužno spektar ovisnosti snage zračenja o valnoj duljini zračenja. Primjerice rezultat analize spektrometrije masa spektar je snage zračenja u odnosu na masu čestica.

Spektrofotometrija

Spektrofotometrija se odnosi na kvantitativna mjerenja reflektiranog ili transmitiranog elektromagnetskog zračenja materijala kao funkciju valne duljine upadnog zračenja.

6.6.1. Osnove UV/VIS spektrofotometrije

Energija zračenja predstavlja skup elementarnih kvanta energije – fotona. Povezanost se valne i čestične prirode energije zračenja prema njemačkom fizičaru Maxu Plancku može izraziti jednačinom:

$$E = h \cdot \nu \quad (131)$$

gdje je E energija kvanta, h Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J s), a ν frekvencija zračenja. Zračenje se može opisati i pomoću njegove valne duljine λ . Frekvencija zračenja i valna duljina povezuju se jednačinom:

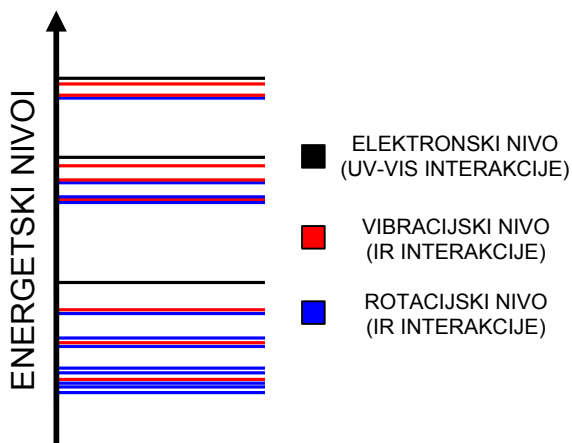
$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (132)$$

gdje je c brzina svjetlosti ($2,998 \cdot 10^8$ m s⁻¹). Do apsorpcije fotona dolazi kada je frekvencija svjetlosti ν , tj. energija fotona E , jednaka energiji pobuđivanja atoma; u suprotnom se foton ne apsorbira.

Kada zračenje, koje dolazi iz nekog pogodnog izvora, prolazi kroz uzorak, koji može biti čvrst, tekuć ili plinovit, energija se zračenja prenosi na uzorak uzrokujući elektronske prijelaze na više energetske razine, tj. u pobuđeno stanje. Promjena unutarnje energije atoma, iona ili molekule u pobuđenom stanju, sukladno jednačini (131), jednaka je $\Delta E = h \cdot \nu$. Višak se energije oslobađa emisijom zračenja ako je

pobuđeno stanje nestabilno. Dio energije zračenja bit će apsorbiran ako je više energetska stanje stabilno.

UV/VIS spektrofotometrija zasniva se na mjerenju apsorpcije elektromagnetskog zračenja u području valnih duljina od 10 do 800 nm. Molekule (molekulska spektrometrija) apsorbiraju UV/VIS zračenje koje uzrokuje pobuđivanje vanjskih, valentnih elektrona. Kod organskih se spojeva najčešće radi o prijelazu elektrona između orbitala n i π^* te π i π^* . Apsorpcija UV/VIS zračenja upotrebljava se i za kvantitativnu analizu anorganskih spojeva, posebno kompleksa iona metala. Kod kompleksa iona metala do apsorpcije dolazi uslijed pobuđivanja kompleksa i prijenosa naboja s liganda na ion metala. Prijelazi elektrona odvijaju se u ligandnom polju, a karakteristični su za aktinide, lantanide te prijelazne elemente. Takve prijelaze mogu ostvariti kompleksni spojevi u kojima ion metala i ligandi, s obzirom na elektrone, imaju različita svojstva: ligand elektron-donorska, a metal elektron-akceptorska (slobodne d orbitale).



Slika 46. Energetski prijelazi u molekularnoj spektrofotometriji.

Primjenom IR zračenja također dolazi do apsorpcije elektromagnetskog zračenja na molekulama, ali zbog manje energije IR zračenja ono uzrokuje samo rotacije i vibracije molekula, a ne i elektronske prijelaze kao prilikom UV/VIS zračenja (prilikom UV/VIS zračenja događaju se i vibracije i rotacije, no one su prekrivene jakim signalom elektronskih prijelaza); slika 46.

6.6.2. Apsorbancija

Spektrofotometrijske metode zasnivaju se na Lambert-Beerovu zakonu koji opisuje karakterističnu apsorpciju upadnog snopa zračenja u homogenoj sredini. Zakon kaže da promjena snage zračenja pri prolazu kroz neku otopinu ovisi o debljini sloja te otopine i koncentraciji tvari koja je u stanju apsorbirati dio ulaznog zračenja. Lambert-Beerov zakon može se izraziti matematički:

$$\log \frac{P}{P_0} = -a \cdot b \cdot c \quad (133)$$

gdje je P snaga propuštenog zračenja, P_0 snaga upadnog zračenja, b debljina sloja, c koncentracija molekula koje apsorbiraju i a apsorpcijski koeficijent koji karakterizira vjerojatnost da čestica apsorbira upadni kvant zračenja. Odnos snage izlaznog i ulaznog zračenja naziva se transmitancija, T , i izražava se u postocima:

$$T = \frac{P}{P_0} \cdot 100 \% \quad (134)$$

Transmitancija jest dio snage upadne zrake koji je prošao kroz uzorak. Apsorbancija, A , računa se kao negativan logaritam transmitancije:

$$A = -\log T \quad (135)$$

pa se Lambert-Beerov zakon može pojednostavljeno pisati:

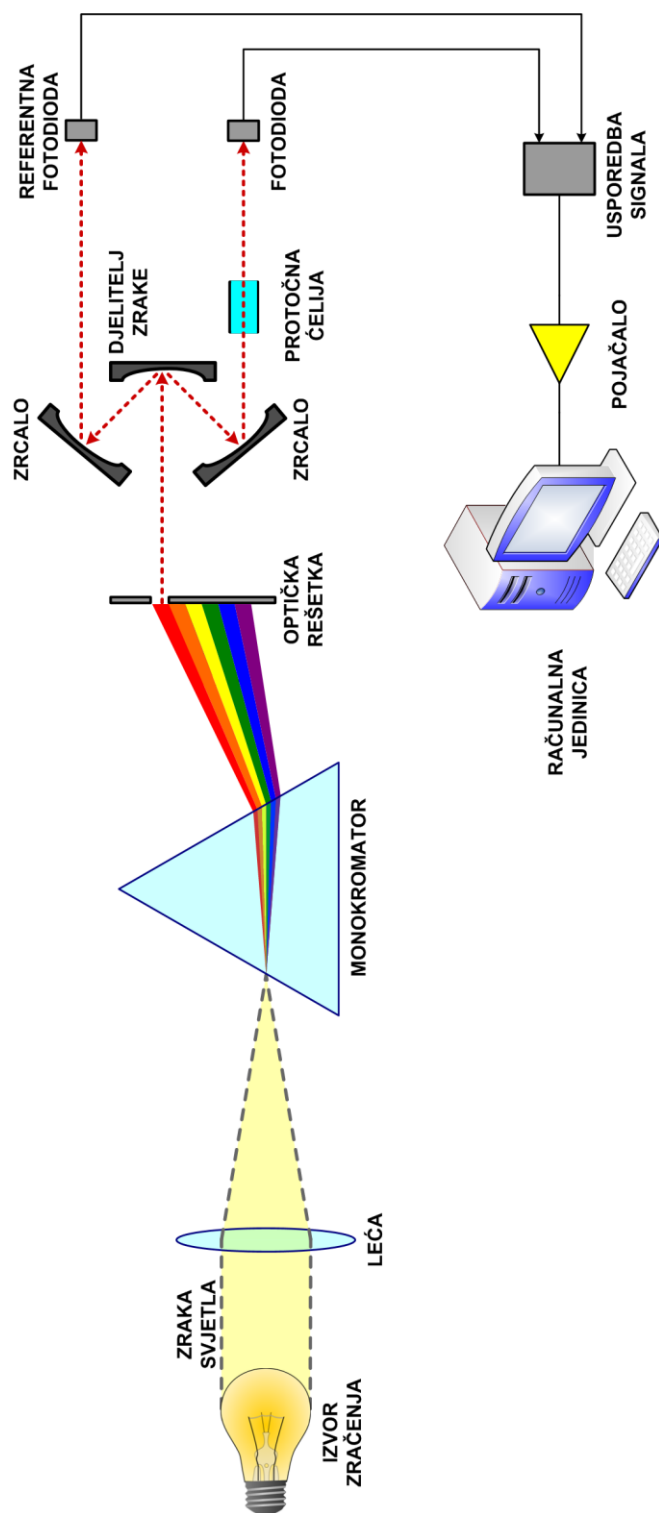
$$A = a \cdot b \cdot c \quad (136)$$

Prema Lambert-Beerovu zakonu dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji molekula koje apsorbiraju trebao bi dati pravac s koeficijentom smjera $a \cdot b$ koji prolazi kroz ishodište. Moguća su odstupanja od linearnosti, tj. umjerna je krivulja nelinearna ako nisu zadovoljeni npr. sljedeći uvjeti::

- da apsorpcija bude jedini mehanizam interakcije elektromagnetskog zračenja i analita,
- da apsorpcija bude ograničena na uzorak jednolika presjeka,
- da se primjenjuje monokromatsko zračenje,
- da otopljene kemijske vrste koje apsorbiraju djeluju neovisno jedna o drugoj [53, 54].

6.6.3. UV/VIS detekcija

UV/VIS detektori koji ne dopuštaju promjenu valne duljine, iako ekonomski vrlo prihvatljivi, danas zbog svoje zastarjele



Slika 47. UV/VIS detekcija pri različitim valnim duljinama.

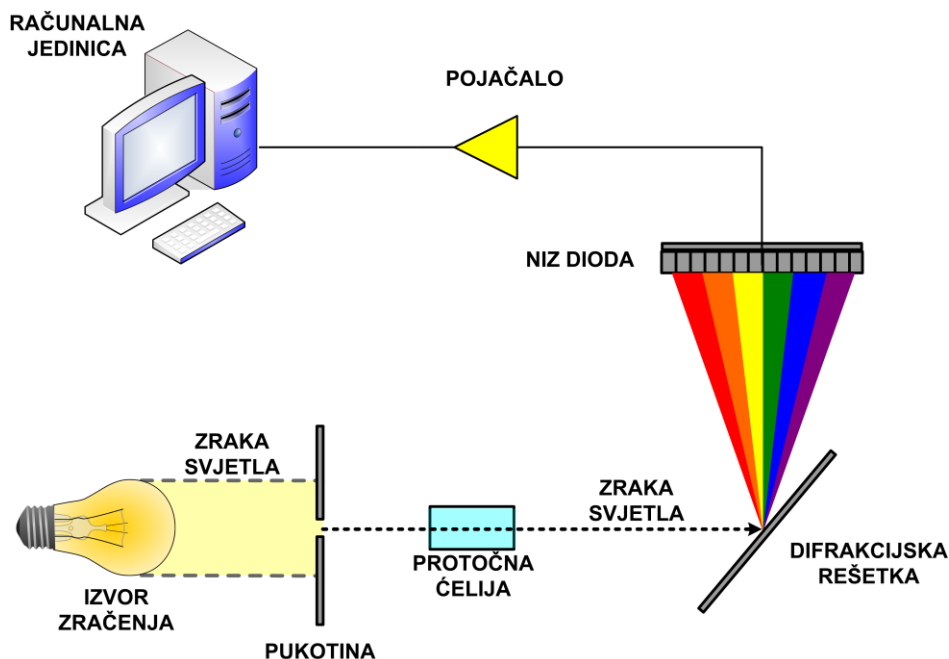
konstrukcije i niza ograničenja ne nalaze primjenu u ionskoj kromatografiji. Moderni detektori omogućavaju detekciju pri više valnih duljina, a kao sredstvo dobivanja monokromatske svjetlosti različitih valnih duljina rabe monokromator (slika 47). Također, u pravilu, imaju sustav za dijeljenje zrake svjetlosti na mjerenu i referentnu. Prilagođavanjem valne duljine svakom od sastojaka uzorka, u realnom je vremenu njegova prolaska kroz protočnu ćeliju za detekciju signala moguće povećati:

- osjetljivost – mjerenje pri maksimumu apsorpcije sastojka i
- selektivnost – ako spojevi koji se ne mogu razdvojiti na kromatografskoj koloni apsorbiraju zračenja različitih valnih duljina.

6.6.4. Detektor s nizom dioda

Detektor s nizom dioda (engl. *photo diode array detector*, PDA) dodao je novu dimenziju odzivu ionske kromatografske analize, prvenstveno jer omogućava dobivanje dodatnih kvalitativnih informacija. Drugim riječima, u svakoj se snimljenoj točki eluiranja (za svako vrijeme zadržavanja) dobiva cjelokupni snimljeni UV/VIS spektar (ne samo apsorbancija za maksimum apsorpcije). U procesu mjerenja polikromatsko elektromagnetsko zračenje prolazi kroz uzorak gdje se odvijaju interakcije pri svim valnim duljinama, a zatim se simultano mjeri apsorbancija pri svim valnim duljinama upotrebom detektora s nizom dioda (slika 48). Svaka je od dioda zadužena za mjerenje apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, a najčešće ih je oko

1000 (za razliku od UV/VIS detektora koji ima jednu mjernu i jednu referentnu diodu).



Slika 48. UV/VIS detekcija s nizom dioda.

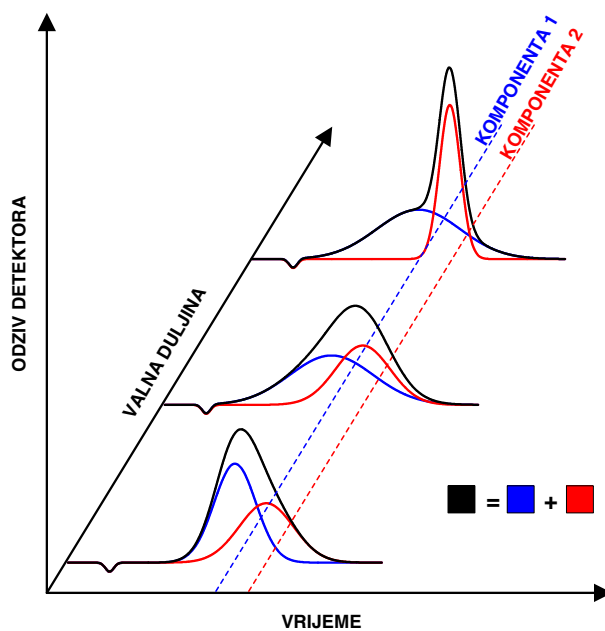
Postoje dvije glavne prednosti upotrebe PDA detektora:

- Moguće je snimiti cjelokupan spektar svakog od prisutnih (i kromatografski razdvojenih) sastojaka uzorka zasebno te odrediti pripadne maksimume apsorpcije što pri kvantitativnom određivanju povećava osjetljivost metode.
- Rješava se problem čistoće kromatografske krivulje. Vrlo često nije moguće iz oblika kromatografske krivulje vidjeti jesu li sastojci uzorka istovremeno eluirali iz kolone. U tom je slučaju, dovodeći u omjer apsorpcije pri različitim valnim duljima,

moguće odrediti sastoji li se ionska kromatografska krivulja od jedne ili više eluiranih tvari.

6.6.5. Čistoća kromatografske krivulje

Čistoća kromatografske krivulje izražava se kao postotak podudarnosti signala kromatografskog eluata snimljenih pri nekoj drugoj dimenziji (veličini) koja nije vrijeme kromatografske analize. Kod trodimenzionalne ampermetrijske detekcije ta je dodatna dimenzija napon, a kod spektrofotometrijske valna duljina.



Slika 49. Koncept utvrđivanja čistoće kromatografske krivulje u ionskoj kromatografiji sa spektrofotometrijskom detekcijom.

Uzmimo za primjer spektrofotometrijsku detekciju. Da bi se signali tvari mogli uspoređivati, potrebno ih je normalizirati. Signali se

možu normalizirati s obzirom na maksimalnu površinu kromatografske krivulje (usporedba kromatograma) ili s obzirom na maksimalnu apsorbanciju (usporedba spektara). Potencijalna nepodudarnost odziva indikator je istovremene elucije dviju ili više tvari (slika 49).

Analogno vrijedi i za analizu čistoće kromatografske krivulje u trodimenzionalnoj ampermetriji.

Kromatografski programski paketi koji služe za upravljanje i obradu podataka ionskih kromatografskih sustava s PDA detekcijom u pravilu imaju bazu u koju se pohranjuju (i/ili je proizvođač pohranio) spektri čistih spojeva. Na taj način, uspoređujući signal realnog uzorka sa signalima iz baze, moguće je dobiti još konkretnije informacije o kvalitativnom sastavu i čistoći kromatografske krivulje.

7. RAZVOJ METODA

Razvoj metode u ionskoj kromatografskoj analizi predstavlja skup logičkih eksperimenata i matematičkih radnji kojima je cilj postići rezultate koji zadovoljavaju ili su najbliži postavljenim zahtjevima. Ciljevi razvoja metode ovise o ionskom kromatografskom problemu što ga je potrebno rješavati. Na ciljeve razvoja metode utječe i odluka o tome u kojoj će se mjeri koristiti ionska kromatografija u cjelokupnom analitičkom procesu. Budući da se svaka analitička metoda razvija po etapama, postoje etapni ciljevi. Jedan je od najčešćih etapnih ciljeva u ionskoj kromatografiji postići potpuno odjeljivanje određenih sastojka analiziranog uzorka od ostalih sastojaka koji bi smetali u daljnjoj analizi. Ostali su najčešći ciljevi u razvoju ionskih kromatografskih metoda:

- postići što kraće vrijeme kromatografske analize uz istovremeno zadovoljavanje danih zahtjeva,
- povećati osjetljivost metode,
- ostvariti mogućnost dokazivanja i određivanja što manjih količina nekog sastojka,
- postići što veću preciznost u kvantitativnoj kromatografskoj analizi,
- dobiti što veći broj korisnih kvalitativnih informacija o izdvojenom sastojku.

Parametri u ionskoj kromatografskoj analizi čijim se pravilnim odabirom mogu ostvariti ciljevi razvoja metode su primjerice:

- izbor materijala nepokretne faze,
- izbor sastava pokretne faze,

- temperatura odjeljivanja,
- dimenzije ionske kromatografske kolone za odjeljivanje,
- brzina protoka pokretne faze,
- količina analita koja se unosi u ionski kromatografski sustav,
- način detekcije i parametri detekcijskog instrumenta,
- parametri pripreme uzorka,
- reagensi za poslijekolonsku derivatizaciju.

Razvoj se ionske kromatografske metode generalno sastoji od triju koraka: definiranja kriterija, definiranja domene parametara i logičkog postupka. Kod definiranja kriterija potrebno je odabrati onaj kriterij koji najbolje opisuje realne zahtjeve stavljene pred ionski kromatografski sustav, dok se domena parametara izabire prema postavljenim zahtjevima analitičkog određivanja i ograničenjima ionskog kromatografskog sustava. Logički postupak ili metode mogu biti različiti, a najčešće se koriste računalno potpomognute metode.

7.1. STRATEGIJE RAZVOJA IONSKIH KROMATOGRAFSKIH METODA

Da bi se ostvarili ciljevi razvoja metode, potrebno je provesti eksperimente i optimirati ionski kromatografski sustav. Eksperimentalni rad i optimizacija mogu se provesti koristeći metode slijednog (engl. *sequential design*) i istodobnog (engl. *simultaneous design*) planiranja eksperimenata.

7.1.1. Metode slijednog planiranja eksperimenata

Metode slijednog planiranja eksperimenata mogu se podijeliti u metode izviđanja i metode interpretacije.

Kod metoda izviđanja mali se broj eksperimenata provede koristeći početni skup parametara. Nakon toga se uz kriterije uspješnosti primjenjuje pogodan algoritam pomoću kojeg se definiraju novi početni parametri koji određuju novi eksperiment. Novi početni parametri određuju sustav bliže optimalnim uvjetima od prethodnog skupa početnih parametara. Postupak se ponavlja dok se ne pronađu optimalni uvjeti. Jedna od najpoznatijih metoda izviđanja je simpleks metoda.

Kod metode interpretacije glavna je razlika u broju eksperimenata provedenih prije modeliranja i obliku informacije koja se očekuje od eksperimenata. U pravilu su kod slijednog planiranja eksperimenata svi eksperimenti provedeni prije matematičkog modeliranja, dok se u metodama interpretacije manji dio eksperimenta provodi prije matematičke obrade. Dodatni se eksperimenti provode tamo gdje dolazi do velikog odstupanja modela od eksperimentalnih podataka te se ponavlja matematička obrada. Tehnike interpretacije najčešće koriste teorijske modele vremena zadržavanja, a naknadno neku od metoda traženja optimuma (Gauss-Newtonova metoda, Levenberg-Marquardtova metoda, genetički algoritam...) uz kriterije uspješnosti.

7.1.2. Metode istodobnog planiranja eksperimenata

Kod metoda istodobnog planiranja eksperimenata svi se eksperimenti provode prije matematičkog postupka optimiranja. Stoga je vrlo važno dobro isplanirati eksperiment primjenom neke od tehnika planiranja. To omogućava pokrivanje cijele domene parametara eksperimentalnim podacima te reprezentativno uzorkovanje mjerenih podataka koji se koriste za izradu modela. Za njihovu se izradu najčešće koriste: višestruka linearna regresija, regresija parcijalnih kvadrata i umjetne neuronske mreže, dok se za pronalaženje optimuma osim analitičkih koriste: metoda najstrmijeg spusta, Gauss-Newtonova metoda, Levenberg-Marquardtova metoda i genetički algoritmi.

7.2. KRITERIJI USPJEŠNOSTI ODJELJIVANJA I VREMENA ANALIZE

Da bi se procijenilo odjeljivanje kromatografskih krivulja i vrijeme analize, koriste se funkcije kriterija uspješnosti. Koristeći funkcije kriterija uspješnosti, moguće je optimirati parametre ionskog kromatografskog sustava te dobiti optimalni kromatogram. Kod optimalne ionske kromatografske analize svi su sastojci uzorka potpuno razdvojeni uz kratko trajanje analize (kratko vrijeme zadržavanja posljednjeg izlazećeg sastojka analita iz kolone). Da bi se ostvarili navedeni zahtjevi, za optimalnu su ionsku kromatografsku analizu predložene različite funkcije kriterija uspješnosti, kako po svojoj matematičkoj formulaciji tako i po svojoj kromatografskoj interpretaciji, od kojih su najjednostavnije navedene u nastavku teksta.

$$\Delta t_{R \min} = |t_{RF i} - t_{RF j}| \quad (137)$$

Jednadžba (137) prikazuje funkciju kriterija uspješnosti minimalne razlike vremena zadržavanja $\Delta t_{R \min}$, gdje su $t_{RF i}$ i $t_{RF j}$ funkcije ovisnosti nekih (onih koje je potrebno optimirati) ionskih kromatografskih parametara o vremenu zadržavanja. Vidljivo je da $\Delta t_{R \min}$ daje odziv za svaki susjedni par eluiranih tvari zasebno. To je prednost zbog toga što je moguće pojedinačno vidjeti kako parametri ionskog kromatografskog sustava utječu na odjeljivanje svih pojedinih kromatografskih krivulja, ali i mana jer se ne dobiva informacija o ionskom kromatografskom sustavu u cjelini te globalni optimum. U točki se maksimuma funkcije $\Delta t_{R \min}$, za par kromatografskih krivulja koji je najmanje razdvojen, nalaze optimalni uvjeti za ionsko kromatografsko određivanje. Njegova je glavna mana nemogućnost kontrole ukupnog trajanja kromatografske analize, pa se može dogoditi da pri optimalnim uvjetima kromatografska analiza traje predugo te da su kromatografske krivulje velikih širina (otežana integracija).

$$\sum \Delta t_R = \sum_{i=1}^n \Delta t_{RF i} \quad (138)$$

Jednadžba (138) prikazuje sumu razlika vremena zadržavanja. Kao što je vidljivo iz jednadžbe, dobiva se jedan odziv za cijeli ionski kromatografski sustav, što je i prednost ovog kriterija, jer sagledava odjeljivanje u cjelini, ali i mana jer se ne dobivaju informacije o svakom pojedinom odjeljivanju. Na odziv $\sum \Delta t_R$ najviše utječe par

kromatografskih krivulja koje su najviše razdvojene, dok najmanje utječe par najmanje razdvojenih kromatografskih krivulja. To rezultira ograničavanjem vremena potrebnog za kromatografsku analizu, međutim može se dogoditi da u točki optimuma svi sastojci uzorka nisu potpuno razdvojeni.

$$\prod \Delta t_R = \prod_{i=1}^n \Delta t_{RF\ i} \quad (139)$$

Jednadžba (139) prikazuje produkt razlika vremena zadržavanja. Njegova je glavna prednost što na vrijednost kriterija najviše utječe razlika vremena zadržavanja između dvaju najmanje razdvojenih sastojaka u uzorku. To je prednost jer su svi sastojci uzorka pri optimalnim uvjetima razdvojeni, međutim vrijeme trajanja analize pri optimalnim uvjetima kao i širine kromatografskih krivulja mogu biti nerazumno veliki.

$$D = \sum_{i=1}^n \Delta t_{RF\ i}^2 \quad (140)$$

$$CRF = \sum_{i=1}^n \ln \Delta t_{RF\ i} \quad (141)$$

Jednadžba (140) prikazuje kriterij granične udaljenosti (D), a (141) kriterij kromatografske funkcije odziva. Na vrijednost obaju kriterija jednako utječe razlika između vremena zadržavanja svih međusobno susjednih sastojaka analita. To je prednost zbog toga što se kontrolira odjeljivanje dvaju najslabije razdvojenih sastojaka uzorka i

jer se u isto vrijeme kontrolira ukupno vrijeme trajanja analize. Nedostatak je ovih kriterija to što u jednadžbama ne postoje posebni faktori koji kontroliraju odjeljivanje dvaju najslabije razdvojenih sastojaka kao ni faktori koji kontroliraju ukupno vrijeme trajanja analize. Drugim riječima, ovdje se ukupno vrijeme trajanja analize kontrolira preko odjeljivanja svih sastojaka te nije posebno izdvojeno.

$$S = \frac{\prod_{i=1}^n \Delta t_{\text{RF } i}}{t_{\text{RF maks}} - t_{\text{RF mim}}} \quad (142)$$

Jednadžbu (142) mogli bismo nazvati kriterijem faktora odjeljivanja. Kao što je vidljivo iz jednadžbe, faktor u brojniku odgovoran je za odjeljivanje dvaju najslabije razdvojenih sastojaka, dok je faktor u nazivniku odgovoran za maksimalno skraćivanje vremena analize. U slučaju da se razlika vremena zadržavanja dvaju najslabije razdvojenih sastojaka poveća, vrijednost kriterija raste, dok povećanjem razlike vremena zadržavanja dvaju najbolje razdvojenih sastojaka vrijednost kriterija pada. Vidljivo je da nazivnik uključuje i vrijeme zadržavanja najmanje zadržanog sastojka uzorka te se ta vrijednost oduzima od maksimalnog vremena zadržavanja. Nedostatak je ovog kriterija taj što se, u slučaju da dođe do pomicanja vremena zadržavanja svih sastojaka uzorka prema većim vremenima zadržavanja, nazivnik neće povećavati, pa je moguće da cijela kromatografska analiza traje dulje nego što je potrebno.

$$CRF = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta t_{RF\ i}}{t_{RF\ maks}} \quad (143)$$

Jednadžba (143) predstavlja kriterij kromatografske funkcije odziva. Kao što je vidljivo, ona se značajno razlikuje od jednadžbe (141) koja ima isto ime. U literaturi je poznato mnogo različitih CRF kriterija. Faktor jednadžbe (140), koji se nalazi ispred sume, odgovoran je za vrijeme trajanja analize i obrnuto je proporcionalan vremenu zadržavanja sastojka uzorka koji posljednji izlazi iz kolone. Faktor sume odgovoran je za odjeljivanje sastojaka. U slučaju da se razlika vremena zadržavanja dvaju najslabije razdvojenih sastojaka poveća, vrijednost kriterija raste. Ovaj kriterij u nazivniku nema razliku vremena zadržavanja sastojaka analita koji posljednji i prvi izlaze iz kolone, već samo ovisi o sastojku analita koji posljednji izlazi iz kolone. Na taj je način umanjena mogućnost pomicanja vremena zadržavanja svih sastojaka analita prema većim vrijednostima vremena zadržavanja.

$$CEF = \left\{ \left[\left(\sum_{i=1}^{n-1} 1 - e^{a(\Delta t_{RF\ opt} - \Delta t_{RF\ i})} \right) + 1 \right] \right\} \left[1 + \frac{t_{RF}}{t_{RF\ maks}} \right] \quad (144)$$

Jednadžba (144) predstavlja kriterij kromatografske eksponencijalne funkcije. Iz jednadžbe je vidljivo da funkcija ima tri konstante koje je potrebno iskustveno odrediti. Konstanta $\Delta t_{RF\ opt}$ predstavlja željenu razliku vremena zadržavanja koja vrijedi za odjeljivanje svih sastojaka uzorka. U slučaju da razlika između

vremena zadržavanja dvije susjedne kromatografske krivulje bude veća od željene razlike vremena zadržavanja, faktor u eksponentu poprima negativnu vrijednost i vrijednost se kriterija CEF smanjuje. Konstanta a pokazuje koliko će na vrijednost kriterija utjecati odjeljivanje između kromatografskih krivulja, za što je odgovoran preostali izraz u eksponentu. Konstanta t_{RF} prikazuje željeno trajanje kromatografske analize. Povećanjem maksimalnog vremena zadržavanja iznad vrijednosti željenog vremena zadržavanja smanjuje se vrijednost razlomku u drugom faktoru kriterija što utječe na vrijednost CEF funkcije.

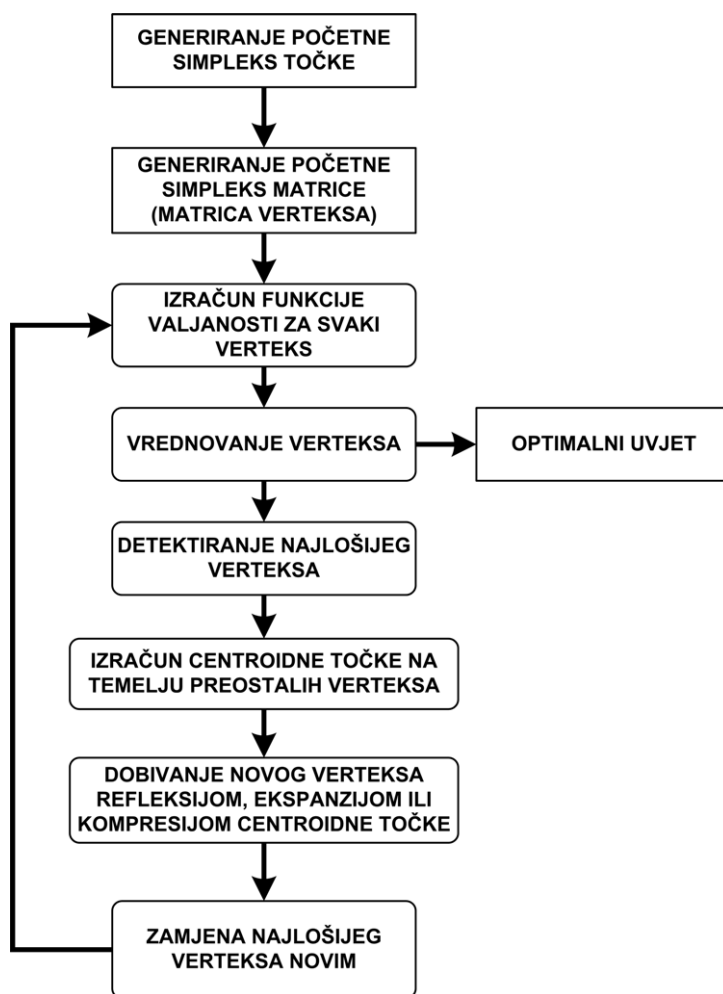
Potrebno je naglasiti da ne postoje preporuke za koje konkretne slučajeve razvoja kromatografske metode treba koristiti koje funkcije kriterija za optimizaciju. U literaturi se samo može pronaći koji je kriterij korišten pri razvoju konkretne kromatografske metode te prednosti i nedostaci svakog od opisanih kriterija [55–57]. Kako je kromatografski sustav vrlo kompleksan, generalno se predlaže da se za svaku optimizaciju koristi više funkcija kriterija uspješnosti [58–60].

7.3. SIMPLEKS METODA

Simpleks metodu su 1962. uveli Spendley i suradnici [61] te se ona ubrzo počela primjenjivati i u kromatografiji. Simpleks metoda temelji se na principu kretanja korak po korak prema cilju, uz promjenu nekoliko varijabli [62–65].

Princip optimiranja pomoću simpleks metode možemo objasniti na primjeru traženja metode gradijentnog eluiranja koja će za neki ionski kromatografski uzorak producirati optimalno odjeljivanje

njegovih izmjenjivih tvari. Najprije se određuju kriteriji na temelju kojih će se vrednovati eluiranje tvari (funkcija valjanosti) te vremenski interval unutar kojeg su moguće varijacije u sastavu eluensa (gradijent). Spomenuti se interval dijeli na ograničen broj vremenskih točaka u kojima je potrebno odrediti optimalnu koncentraciju eluensa. Promjena se koncentracije od jedne do druge točke najčešće uzima linearnom, no to nije pravilo.



Slika 50. Shematski prikaz funkcioniranja simpleks algoritma.

Sukladno shematskom prikazu funkcioniranja simpleks algoritma (slika 50), odabire se proizvoljni početni profil koncentracije eluensa (središnja simpleks točka); najjednostavnije je uzeti izokratni koncentracijski profil. Varirajući koncentracije u definiranim vremenskim točkama oko središnje se simpleks točke generira matrica različitih gradijentnih profila koji zajedno sa središnjom točkom čine objekt u $N+1$ dimenzijskom prostoru nazvan simpleks. Bitno je istaknuti da je N broj varijabli, odnosno za konkretni slučaj broj vremenskih točaka u kojima optimiramo koncentraciju eluensa. Svaki je od $N+1$ gradijentnih uvjeta u matrici gradijenata zapravo jedna od kutnih točaka nastalog simpleksa i naziva se verteks. Odabir početnih verteksa (početne matrice gradijentnih profila) najčešće se rješava primjenom prikladne metode planiranja eksperimenata. Kao jednu od najčešće primjenjivanih metoda planiranja u simpleks optimiranju spomenut ćemo Doehlertov dizajn [66,67] čija je karakteristika generiranje verteksa ravnomjerno raspoređenih oko središnje simpleks točke.

Za svaki se od početnih verteksa provodi eksperiment i na temelju funkcije vrijednosti vrednuje eksperimentalno dobiveno odjeljivanje. Odabire se verteks s najnepogodnijom vrijednosti funkcije (najlošije odjeljivanje), a na temelju koordinata preostalih N točaka određuje se centroid. Refleksijom centroida kroz plohu definiranu koordinatama spomenutih N točaka dobiva se novi verteks. Ovisno o potrebama, novi se verteks može dodatno udaljiti od refleksijske plohe (ekspanzija) ili joj se približiti (kontrakcija). Novi verteks u matrici gradijenata mijenja dotad najnepogodniji verteks te na taj način nastaje novi simpleks.

Ponavljanjem postupka simpleks se metoda kreće prema optimalnom rješenju. Optimiranje prestaje kada suma razlika iznosa optimiranih parametara (u konkretnom slučaju koncentracija eluensa) za dva slijedna simpleks ciklusa postane manja od granične vrijednosti, definirane na početku proračuna.

7.4. GENETIČKI ALGORITMI

7.4.1. Prirodni evolucijski procesi

Evolucija je neprekidan proces prilagođavanja živih bića na svoju okolinu. U prirodi vlada borba za opstanak u kojoj slabe jedinke, odnosno jedinke koje imaju loša svojstva, imaju malu vjerojatnost preživljavanja u borbi za opstanak te će najvjerojatnije odumrijeti, a zajedno s njima i loša svojstva. Dobra svojstva imaju veću vjerojatnost nasljeđivanja, odnosno prenošenja na sljedeću generaciju. Da bi neka vrsta tijekom evolucije opstala, mora se prilagođavati uvjetima i okolini u kojoj živi jer se i uvjeti i okolina mijenjaju. Svaka sljedeća generacija neke vrste mora pamtit i dobra svojstva prethodne generacije, pronalaziti i mijenjati ta svojstva tako da ostanu dobra u novim uvjetima.

Danas se zna da su sva svojstva jedinke zapisana u kromosomima, tj. lančastim tvorevinama koje se nalaze u jezgri svake stanice. Skup informacija koje karakteriziraju jedno svojstvo zapisan je u dijelu kromosoma nazvanom gen. Kromosomi uvijek dolaze u parovima tako da je jedan kromosom naslijeđen od oca, a drugi od majke. Dakle za svako svojstvo postoje dva gena ili dvije informacije.

U genetskom paru geni mogu biti ravnopravni ili neravnopravni u smislu da je jedan dominantan, a drugi recesivan. U neravnopravnom paru dominantni gen određuje konačno svojstvo, dok se uz ravnopravni par gena dobiva svojstvo koje je negdje između svojstava oca i majke.

Kemijsku strukturu prisutnu u kromosomima otkrili su Watson i Crick 1953. godine [68]. Molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNA) nalazi se u obliku dvije spirale građene od fosforne kiseline i šećera, a mostovi između spiralnih niti građeni su od dušičnih baza i to: adenina (A), gvanina (G), timina (T) i citozina (C). Dušične su baze međusobno povezane vodikovim vezama tako da se adenin povezuje s timinom i gvanin s citozinom. Jedan kromosom sastoji se od dvije komplementarne niti DNA, a takva struktura dviju spiralnih niti DNA omogućava prenošenje informacije dijeljenjem kromosoma pri diobi stanice. Naime kada se stanica treba podijeliti, kromosomske se niti razmotaju. Budući da u jezgri stanice ima mnoštvo slobodnih baza, te se baze vežu na svoje parove na nitima DNA. Proces izmjene pojedinih segmenata kromosomskih niti između unutrašnjih niti (rjeđe i vanjskih) naziva se križanje.

7.4.2. Genetički algoritmi

Kopirajući mehanizme prirodne selekcije J. R. Koza 1990. godine razvija novu vrstu evolucijskih algoritama koje je nazvao genetičkim programiranjem [69]. Genetički su algoritmi danas najpoznatiji i najčešće korišteni oblik evolucijskih algoritama.

Evolucija je, kako je već istaknuto, prirodni proces traženja najbolje i najprilagodljivije jedinke na okolinu i uvjete u prirodi. Dakle sama evolucija jest metoda optimiranja. Genetički algoritmi oponašaju biološku evoluciju u postupku optimizacije vrlo složenih problema, a njihova je najvažnija karakteristika da koriste populaciju potencijalnih rješenja. Za evolucijski proces kao i za genetski algoritam može se ustanoviti sljedeće:

- postoji populacija jedinki,
- neke su jedinke bolje (bolje prilagođene okolini),
- bolje jedinke imaju veću vjerojatnost preživljavanja i reprodukcije,
- svojstva jedinki zapisana su u kromosomima pomoću genetskog koda,
- djeca nasljeđuju svojstva roditelja,
- može doći do mutacija jedinki.

Kromosom je u populaciji niz znakova i on predstavlja apstraktan prikaz rješenja. Znakovi se nazivaju genima, a svaki niz gena naziva se kromosom. Početna se populacija obično stvara slučajnim uzorkovanjem prostora pretraživanja sa što više kromosoma. Uobičajena je praksa da se u početnu populaciju ubace i neka dobra rješenja [70].

Rješenje određenog problema uz uporabu genetičkog algoritma započinje izborom načina prikaza rješenja. Budući da su genetički algoritmi nastali na prirodnim principima, način je prikazivanja također kopiran iz prirode. Svi su podaci koji obilježavaju jednu jedinku zapisani u jednom kromosomu, a za genetski je algoritam

značajno da kromosom predstavlja moguće rješenje zadanog problema. Neki od mogućih načina prikazivanja su:

- binarni,
- permutacijski,
- prikaz nizom znakova.

U praksi se najčešće koristi binarni prikaz u kojem je svaki kromosom sastavljen od bitova, 0 i 1 [71, 72]. Pokazalo se da binarni prikaz u većini primjena daje najbolje rezultate.

Funkcija valjanosti, odnosno funkcija čiji maksimum ili minimum tražimo, koristi se za procjenu valjanosti pojedinih kromosoma u populaciji. Ona predstavlja ključan dio selekcije i stoga je za neki optimizacijski proces vrlo važno dobro modelirati funkciju valjanosti. Na temelju vrijednosti funkcije valjanosti odabiru se bolji kromosomi i oni sudjeluju u novoj generaciji. Što bolju vrijednost funkcija valjanosti ima, jedinka ima veću vjerojatnost preživljavanja i križanja.

Izmjena gena koja nastaje pri reprodukciji u genetskim algoritmima naziva se, kao i u prirodnom procesu, križanje. Dobra valjanost roditelja povezana je s dijelovima njihova genetičkog materijala, a križanje tog materijala dat će veću funkciju valjanosti. Osim križanja, uočava se još jedna pojava, ali u znatno manjem opsegu. Riječ je o slučajnom mijenjanju genetskog materijala koje nastaje pod djelovanjem vanjskih uzroka, a naziva se mutacija. I dok se križanjem izmjenjuje genetički materijal između dvaju kromosoma u cilju stvaranja potomaka koji su kombinacija svojih roditelja, mutiranjem se mijenja samo mali dio kromosoma. Iako se mutiranjem

osigurava ponovno uvođenje genetičke raznolikosti, preveliko mutiranje pretvara genetički algoritam u slučajno pretraživanje. Kako bi se spriječilo da sva rješenja u populaciji ostanu u lokalnom optimumu, mutiranje uvijek slijedi nakon križanja. Križanje se i mutacija kod genetskih algoritama nazivaju genetskim operatorima, a proces izdvajanja najsposobnijih jedinki unutar svake generacije odabirom (selekcijom). Selekcijom se određuju kromosomi na kojima će se primijeniti genetički operatori križanja i mutiranja pri čemu nastaju njihovi potomci. Svrha je selekcije čuvanje i prenošenje dobrih svojstava na sljedeću generaciju jedinki. Stvoreni se potomci zatim natječu sa starim kromosomima na temelju svojih valjanosti i stvaraju novu generaciju. Taj se proces ponavlja dok se ne dostigne kriterij zaustavljanja. Najčešće korišteni kriteriji zaustavljanja su vrijeme ili maksimalan broj generacija. Ipak, u praksi se pokazalo da je nešto bolji kriterij stagnacija funkcije valjanosti najboljeg kromosoma u populaciji kroz određeni broj ciklusa parenja. U samom postupku selekcije niti jedan kromosom nema jamstvo da će biti izabran. Međutim na temelju funkcije valjanosti postoji veća ili manja vjerojatnost njegova izbora. Roditeljski kromosomi mogu se odabrati na mnogo načina, ali osnovni je princip da se izabiru bolji kromosomi koji bi mogli dati bolje potomke. Da bi se izbjegao gubitak najboljih kromosoma iz populacije stvaranjem nove, koristi se elitizam. Elitizam je naziv za metodu koja prvo kopira najbolji kromosom (ili nekoliko njih) u novu populaciju. Na taj se način jako može poboljšati izvođenje genetičkih algoritama jer se sprječava gubitak najboljih rješenja [73].

Stvoreni se potomci moraju umetnuti u staru populaciju, a sheme umetanja su [74]:

- *čisto umetanje* – stvara se onoliko potomaka koliko je i roditelja i svi se roditelji zamjenjuju potomcima,
- *jednoliko umetanje* – stvara se manje potomaka nego što ima roditelja i roditelji se jednoliko zamjenjuju potomcima,
- *elitističko umetanje* – stvara se manje potomaka nego što je potrebno za umetanje i najlošiji se roditelji zamjenjuju,
- *umetanje na temelju podobnosti* – stvara se više potomaka nego što je potrebno za umetanje i umeću se samo najbolji potomci.

Primjena genetičkih algoritama za rješavanje različitih problema zahtijeva:

- izbor načina prikaza rješenja,
- definiranje funkcije valjanosti,
- definiranje mehanizma izbora,
- izbor genetičkih operatora (križanje, mutiranje),
- određivanje genetičkih parametara kao što su veličina populacije, broj generacija, vjerojatnost križanja i vjerojatnost mutiranja,
- definiranje kriterija za zaustavljanje genetičkih algoritama.

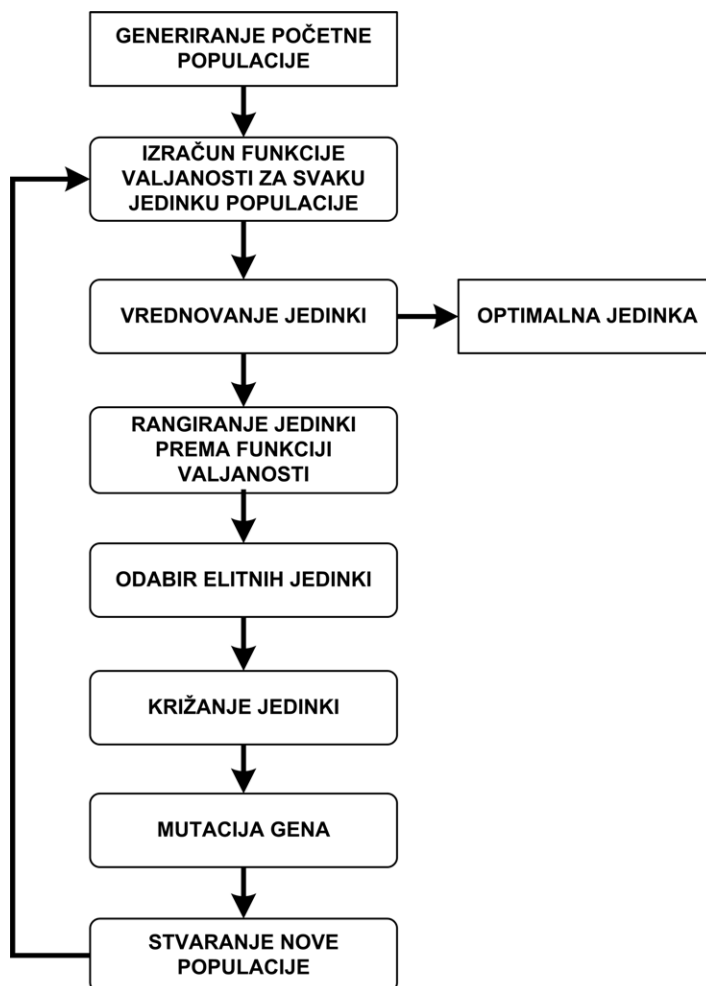
Svaka od navedenih stavki znatno utječe na izvođenje genetičkog algoritma. Ne postoji opća teorija koja će opisati parametre genetičkog algoritma za neki problem, ali na temelju empirijskog proučavanja

genetičkih algoritama, neke od preporuka za izvođenje genetičkog algoritma su:

- vjerojatnost križanja bi u većini slučajeva trebala biti visoka, od 80–90%, iako se pokazalo da je za neke probleme najbolja vjerojatnost križanja od 60%,
- vjerojatnost mutiranja trebala bi biti mala, od 0,5–5%,
- u slučaju malih populacija, genetički algoritam ima samo nekoliko mogućnosti za izvođenje križanja i istražuje se samo mali dio područja pretraživanja. Vrlo velike populacije obično ne poboljšavaju izvođenje genetičkog algoritma u smislu brzine pronalaska rješenja. Pokazalo se da je dobra veličina populacije oko 20–30 kromosoma, ali ponekad populacija od 50–100 kromosoma može dati najbolje rezultate. Istraživanja su pokazala da nakon određene granice nije korisno poboljšavati veličinu populacije jer se problem neće brže riješiti,
- u selekciji se može koristiti princip "kola sreće" u kojem se kromosomi izabiru slučajno, ali ponekad je izbor prema redoslijedu bolji.

Kao i kod svih "slučajnih" algoritama eksperimentalna analiza zahtijeva višestruko pokretanje algoritma, računanje prosječne vrijednosti i standardnih odstupanja. Za optimizaciju je obavezna dobra prosječna vrijednost i malo standardno odstupanje.

Shematski prikaz genetičkog algoritma dan je na slici 51.

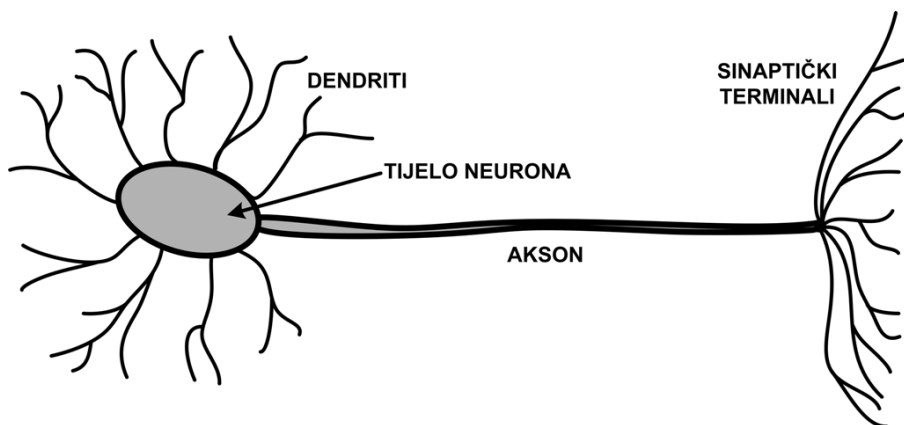


Slika 51. Shematski prikaz funkcioniranja genetičkog algoritma.

7.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

7.5.1. Biološki neuron

Pojednostavljeno gledano, biološki se neuron sastoji od tijela, aksona i mnoštva dendrita koji okružuju tijelo neurona (slika 52).



Slika 52. Grafički prikaz biološkog neurona.

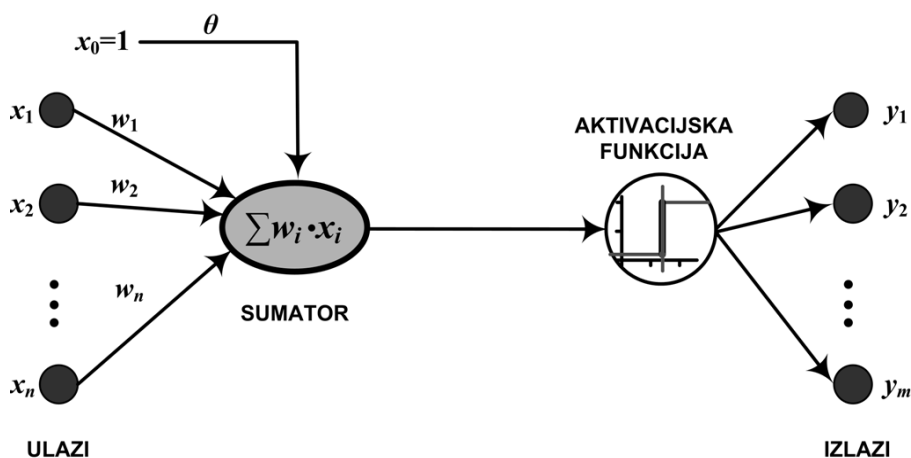
Akson se može zamisliti kao tanka cjevčica čiji je jedan kraj povezan na tijelo neurona, a drugi se dijeli na niz grana. Krajevi ovih grana završavaju malim zadebljanjima koja najčešće dodiruju dendrite, a rjeđe tijelo neurona. Mali razmak između završetka aksona prethodnog neurona i dendrita ili tijela sljedećeg neurona naziva se sinapsa. Akson jednog neurona formira sinaptičke veze s mnoštvom drugih neurona. Impulsi (izlazi) neurona putuju kroz akson do sinapsi odakle se signali različitog intenziteta (različito otežani signali) šalju kroz dendrite ili izravno na tijelo drugih neurona. Intenzitet ovih signala određen je efikasnošću svakog pojedinog sinaptičkog prijenosa.

Neki će neuron poslati impuls ako je doveden u stanje dovoljne uzbude, realizirano njegovim trenutačnim (početnim) stanjem te utjecajem signala od ostalih neurona preko njegovih dendrita ili njegova tijela u kratkom vremenskom intervalu. Signali koje prenose dendriti mogu biti ili smirujući ili pobuđujući. Matematički gledano suprotnog su predznaka. Neuron šalje impuls kroz svoj akson ako je

njegova pobuda veća od smirujućeg utjecaja za kritični iznos, koji predstavlja prag osjetljivosti neurona.

7.5.2. Umjetni neuron

Umjetni neuron (slika 53) dizajniran je s idejom oponašanja osnovnih funkcija biološkog neurona.

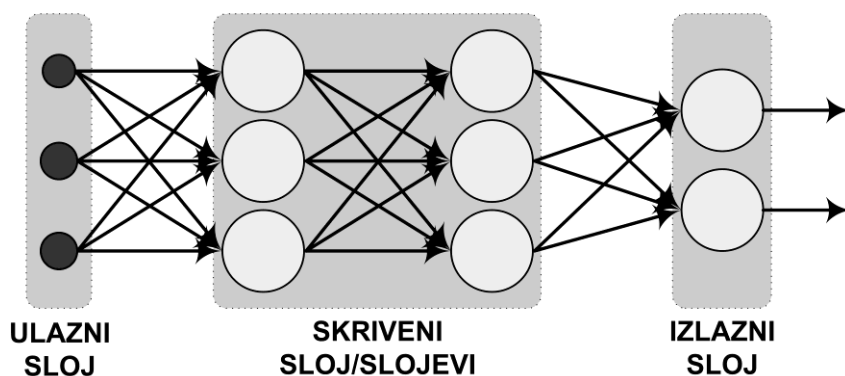


Slika 53. Grafički prikaz umjetnog neurona.

Tijelo biološkog neurona zamjenjuje se sumatorom, ulogu dendrita preuzimaju ulazi u sumator, izlaz sumatora je akson umjetnog neurona, a uloga praga osjetljivosti bioloških neurona preslikava se na tzv. aktivacijske funkcije. Funkcijske sinaptičke veze biološkog neurona s njegovom okolinom preslikavaju se na težine, preko kojih se i ostvaruje veza umjetnog neurona s njegovom okolinom.

7.5.3. Umjetne neuronske mreže

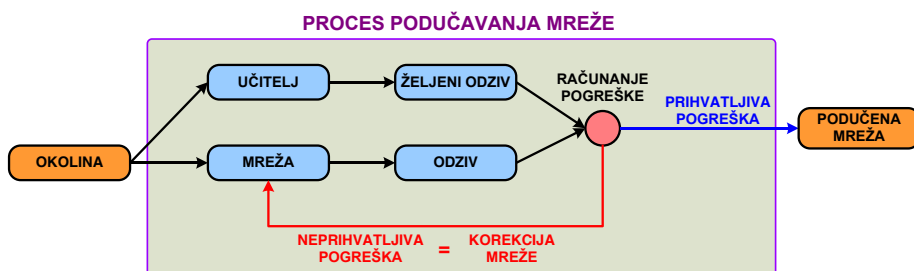
Paralelno složen skup neurona gradi jedan sloj neuronske mreže, pa shodno tome neuronske mreže mogu biti jednoslojne i višeslojne (slika 54). Uobičajeno je da višeslojne neuronske mreže imaju ulazni i izlazni sloj, a između njih su tzv. skriveni slojevi.



Slika 54. Shematski prikaz unaprijedne višeslojne umjetne neuronske mreže.

Postoje dva različita principa na kojima se temelji podučavanje (treniranje) neuronskih mreža i to nadgledano podučavanje (uz nadzor) i nenadgledano podučavanje (bez nadzora). Nadgledano podučavanje (slika 55) zahtijeva vanjskog “učitelja” neuronske mreže koji promatra ponašanje mreže korigirajući je dok se ne dobije željeno ponašanje mreže. Kod ovog načina podučavanja najprije se usvaja određena struktura (topologija) neuronske mreže (broj ulaza, broj izlaza, broj neurona u skrivenom sloju). Početne težine mreže najčešće se usvajaju pomoću generatora slučajnih brojeva. Zatim se na ulaz mreže dovodi skup ulaznih varijabli (rezultata eksperimentalnog mjerenja), a mreža producira odgovarajući skup izlaznih varijabli. Skup dobivenih

(stvarnih) izlaznih varijabli uspoređuje se sa skupom željenih izlaznih varijabli (rezultati eksperimentalnog mjerenja). Razlika željenih i stvarnih izlaza neuronske mreže čini pogrešku neuronske mreže, koja se koristi za računanje novih težina preko određenog usvojenog algoritma. Cijeli se postupak ponavlja iteracijski dok pogreška mreže ne bude manja od unaprijed zadanog iznosa. Pritom se po potrebi mijenja struktura mreže (broj neurona, broj slojeva). Nakon procesa podučavanja (treninga) slijedi proces vrednovanja neuronske mreže. To se radi s novim skupom ulaza neuronske mreže (eksperimentalnih rezultata mjerenja) koji nije bio sadržan u ulaznom skupu za vrijeme podučavanja mreže. Stvarni se izlazi neuronske mreže tada uspoređuju sa željenim izlazima (rezultatima mjerenja). Pritom se ne mijenjaju parametri mreže (struktura i težine). Iznos pogreške mreže u procesu testiranja služi za ocjenu generalizacijskih svojstava mreže, odnosno za ocjenu sposobnosti mreže da daje zadovoljavajuće izlaze i za skup ulaza kojima nije bila podučavana.



Slika 55. Shematski prikaz nadgledanog podučavanja umjetne neuronske mreže.

Da bi se izradio model neuronskih mreža koji može dobro predviđati, potrebno je pronaći optimalan broj neurona u skrivenom sloju i optimalan broj iteracijskih koraka. Kada model neuronskih

mreža sadrži premali broj neurona u skrivenom sloju i/ili je neuronska mreža trenirana s premalo iteracija, doći će do nemogućnosti predviđanja nelinearnih ovisnosti što se očituje kao odstupanje treningom dobivene funkcijske ovisnosti od eksperimentalnih podataka korištenih za treniranje. Kada model neuronskih mreža sadrži prevelik broj neurona u skrivenom sloju i/ili je neuronska mreža trenirana s previše iteracija, doći će do nemogućnosti generalizacije (mogućnost predviđanja stvarnih događaja opada), iako će se odstupanje treningom dobivene funkcijske ovisnosti od podataka korištenih pri treniranju smanjiti i biti zadovoljavajuće. Ova se pojava naziva pretreniranje mreže. Cilj je postavljanja svakog modela dobra generalizacija stvarnih pojava koje se modeliraju. Zbog toga mogućnost generalizacije modela određuje broj neurona u skrivenom sloju i broj iteracija korištenih za treniranje mreže. U praksi se optimizacija modela neuronskih mreža provodi koristeći testiranje neuronske mreže s vanjskim skupom eksperimentalnih podataka (podaci koji nisu korišteni za trening). Na taj se način direktno ispituje mogućnost generalizacije testiranog modela.

Podjela eksperimentalnih podataka na skup za trening i skup za testiranje od ključnog je značaja pri postavljanju modela neuronskim mrežama. Eksperimentalni podaci i u skupu za trening i u skupu za testiranje moraju predstavljati reprezentativan uzorak cijelog skupa eksperimentalnih podataka. U suprotnom će model neuronskih mreža loše predviđati u području koje nije bilo zastupljeno s eksperimentalnim podacima u trening-skupu. Veličina skupa za trening utječe na konvergenciju. U pravilu je potrebno izabrati minimalan broj eksperimentalnih podataka za skup za trening s kojim se može razviti

model umjetnih neuronskih mreža sa zadovoljavajućom mogućnošću predviđanja.

Kod nenadgledanog podučavanja ne postoji vanjski “učitelj”. Mreži su dostupni samo ulazni podaci, a sustav organizira sam sebe prema unutarnjim kriterijima i lokalnim informacijama nastalima u mreži.

8. LITERATURA

1. L. S. Ettre: Nomenclature for chromatography (IUPAC recommendations 1993), *Pure & Appl. Chem.* **65** (1993) 819–872.
2. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina: Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998, HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
3. H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman: Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection, *Anal. Chem.* **47** (1975) 1801–1809.
4. D. T. Gjerde, J. S. Fritz, G. Schmuckler: Anion chromatography with low-conductivity eluents, *J. Chromatogr.* **186** (1979) 509–519.
5. R. M. Wheaton, W. C. Bauman: Ion exclusion - A unit operation utilizing ion exchange materials, *Ind. Eng. Chem.* **45** (1953) 228–233.
6. R. D. Rocklin, C. A. Pohl: Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Liq. Chromatogr.* **6** (1983) 1577–1590.
7. R. S. Alm, R. J. P. Williams, A. Tiselius: Gradient elution analysis. I. A general treatment, *Acta Chem. Scand.* **6** (1952) 826–836.
8. J. S. Fritz, D. T. Gjerde: Ion chromatography, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
9. J. Weiss: Handbook of ion chromatography, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
10. H. Small: Ion chromatography, Plenum Press, New York, 1989.

11. M. Ogrizek-Gyiketta: Ionski izmjenjivači u analitičkoj kemiji, u I. Filipović, P. Sabioncello (ur.): Laboratorijski priručnik: I. dio – knjiga druga, 2. izd., Tehnička knjiga, Zagreb, 1978.
12. P. R. Haddad, P. E. Jackson, Ion chromatography principles and applications, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1990.
13. A. Braithwaite, F. J. Smith: Chromatographic methods, 5. izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
14. Š. Cerjan-Stefanović: Principi i primjena ionske kromatografije, *Kem. Ind.* **41** (1992) 227–231.
15. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch: Practical HPLC method development, 2. izd., Wiley, New York, 1997.
16. C. F. Poole, S. K. Poole: Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991.
17. C. F. Poole: The essence of chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
18. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler: Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
19. I. N. Bronshtein, K. A. Semendyayev, G. Musiol, H. Muehlig: Handbook of mathematics, 5. izd., Springer Verlag, Berlin–Heidelberg, 2007.
20. D. Blanco Gomis, N. Sánchez Núñez, E. Andrés García, P. Arias Abrodo, M. Bayod Jasanada, M.D. Gutiérrez Álvarez: High speed liquid chromatography for in-process control of rifabutin, *Anal. Chim. Acta* **531** (2005) 105–110.
21. H. Schmidt-Traub: Preparative chromatography of fine chemicals and farmaceutical agents, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

22. R. Tijssen: The Mechanisms and Importance of Zone-Spreading, u
E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (ur.): Handbook
of HPLC, Vol. 78, Marcel Dekker, New York–Basel, 1998.
23. A. J. P. Martin, R. L. M. Synge: A new form of chromatogram
employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2.
Application to the micro-determination of the higher monoamino-
acids in proteins, *Biochem. J.* **35** (1941) 1358–1368.
24. L. Lapidus, N. R. Amundson: Mathematics of adsorption in beds.
VI. The effect of longitudinal diffusion in ion exchange and
chromatographic columns, *J. Phys. Chem.* **56** (1952) 984–988.
25. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg: Longitudinal
diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in
chromatography, *Chem. Eng. Sci.* **5** (1956) 271–289.
26. A. Klinkenberg: Heat transfer in cross-flow heat exchanger and
packed beds. Evaluation of equations for penetration of heat or
solutes, *Ind. Eng. Chem.* **46** (1954) 2285–2289.
27. B. H. Ketelle, G. E. Boyd: The exchange adsorption of ions from
aqueous solutions by organic zeolites. IV. The separation of the
yttrium group rare elements, *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2800–
2812.
28. G. E. Boyd, A. W. Adamson, L. S. Myers (Jr.): The exchange
adsorption of ions from aqueous solution by organic zeolites. III.
Performance of deep adsorbent beds under non-equilibrium
conditions, *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2849–2859.
29. K. Ogan, R. P. W. Scott: Optimization of capillary parameters for
gas chromatography, *J. High Res. Chromatogr.* (1984) 382–388.

30. J. C. Giddings, H. Eyring: A molecular dynamic theory of chromatography, *J. Phys. Chem.* **59** (1955) 416–421.
31. J. C. Giddings: Stochastic consideration on chromatographic dispersion, *J. Chem. Phys.* **26** (1957) 169–173.
32. J. Cazes, R. P. W. Scott: Chromatography theory, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
33. K. Grob (Jr.), K. Grob: Evaluation of capillary columns by separation number or plate number, *J. Chromatogr.* **207** (1981) 291–297.
34. P. Kulišić: Mehanika i toplina, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
35. M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina: Plošna kromatografija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006.
36. J. E. Madden, P. R. Haddad: Critical comparison of retention models for optimisation of the separation of anions in ion chromatography. I. Non-suppressed anion chromatography using phthalate eluents and three different stationary phases, *J. Chrom. A* **829** (1998) 65–80.
37. L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Gant: Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *J. Chrom. A* **165** (1979) 3–30.
38. L. R. Snyder: Gradient elution, u Cs. Horváth (ur.): High-performance liquid chromatography, Vol. 1, Academic Press, New York, 1980.
39. T. B. Hoover: Multiple eluent and pH effects on ion chromatography of phosphate and arsenate, *Sep. Sci. Technol.* **17** (1982) 295–305.

40. S. W. Mayer, E. R. Tompkins: Ion exchange as a separation method. IV. A theoretical analysis of column separation process, *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2866–2874.
41. D. R. Jenke, G. K. Pagenkopf: Optimization of anion separation by nonsuppressed ion chromatography, *Anal. Chem.* **56** (1984) 85–88.
42. D. R. Jenke, G. K. Pagenkopf: Models for prediction of retention in nonsuppressed ion chromatography, *Anal. Chem.* **56** (1984) 88–91.
43. D. R. Jenke: Modeling of analyte behavior in indirect photometric chromatography, *Anal. Chem.* **56** (1984) 2674–2681.
44. P. Hajós, O. Horváth, V. Denke: Prediction of retention for halide anions and oxoanions in suppressed ion chromatography using multiple species eluent, *Anal. Chem.* **67** (1995) 434–441.
45. H. Schmidt-Traub: Preparative chromatography of fine chemicals and farmaceutical agents, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
46. J. M. Miller: Chromatography, concepts and contrasts, II izd., Wiley, New Jersey, 2005.
47. Zs. Pápai, T. L. Pap: Analysis of peak asymmetry in chromatography, *J. Chrom. A* **953** (2002) 31–38.
48. W. J. Lough, I. W. Wainer: High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice, Chapman & Hall, London, 1995.
49. D. Y. Choi, K. H. Row: Theoretical analysis of chromatographic peak asymmetry and sharpness by the moment method using two peptides, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9** (2004) 495–499.
50. H. Schäfer, M. Läubli, R. Dörig: Ion chromatography, Metrohm, Herisau, 1998.

51. P. W. Atkins: The elements of physical chemistry, Oxford University Press, Oxford, 2001.
52. S. Hughes, P. L. Meschi, D. C. Johnson: Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes, *Anal. Chim. Acta* **132** (1981) 1–10.
53. G. Schwedt: The essential guide to analytical chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1997.
54. H. H. Willard, L. L. Merritt, F. A. Settle: Instrumental methods of analysis, 7. izd., Wadsworth, Belmont, 1988.
55. A. M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu: Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chrom. A* **892** (2000) 75–106.
56. E. J. Klein, S. L. Rivera: A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separation, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (2000) 2097–2121.
57. S. Carda-Broch, J. R. Torres-Lapasio, M. C. Garcia-Alvarez-Coque: Evaluation of several global resolution functions for liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* **396** (1999) 61–74.
58. Š. Cerjan-Stefanović, T. Bolanča, L. Ćurković: Selection of criteria for comparing and evaluating the optimization of separation in ion chromatography, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (2000) 2169–2179.
59. Š. Cerjan-Stefanović, T. Bolanča, L. Ćurković: Simultaneous determination of six inorganic anions in drinking water by non-suppressed ion chromatography, *J. Chrom. A* **918** (2001) 325–334.

60. G. Vivo-Truyols, J. R. Torres-Lapasio, M. C. Garcia-Alvarez-Coque: Complementary mobile-phase optimisation for resolution enhancement in high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A* **876** (2000) 17–35.
61. W. Spendley, G. R. Hext, F. R. Himsworth: Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation, *Technometrics* **4** (1962) 441–461.
62. J. Živko-Babić, J. Pandurić, V. Alan, T. Ivaniš, D. Ivanković: Identifikacija kobalta i kroma u protetskim radovima primjenom tankoslojne kromatografije, *Acta Stomatol. Croat.* **34** (2000) 41–45.
63. J. Živko-Babić, M. Medić-Šarić, A. Mornar, M. Jakovac, I. Jasprica, S. Turina: Anodic sampling of titanium (Ti) by thin layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.* **16** (2003) 63–65.
64. A. M. J. Horvat, D. Ivanković, S. Babić, J. Živko-Babić, M. Kaštelan-Macan: Anodic sampling and TLC detection of dental alloys, u N. Šegudović (ur.): 6th International Symposium New Achievements in Chromatography: Book of Abstracts, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb, 2000.
65. S. Turina: Hot-plate application of samples for thin-layer chromatography, *Anal. Chem.* **48** (1976) 2038–2039.
66. R. E. Bruns, I. S. Scarminio, B. de Barros Neto: Statistical design – Chemometrics, Elsevier, Amsterdam, 2006.
67. D. H. Doehlert: Uniform shell designs, *Appl. Stat.* **19** (1970) 231–239.
68. J. D. Watson, F.H.C. Crick: A structure of deoxyribose nucleic acid, *Nature* **171** (1953) 737–738.

69. J. R. Koza: Genetic programming: a paradigm for genetically breeding populations of computer programs to solve problems, Tech. Rep. STAN-CS-90-1314, Stanford University, Stanford 1990.
70. P. Cong, T. Li: Numeric genetic algorithm. Part I. Theory, algorithm and simulated experiments, *Anal. Chim. Acta* **293** (1994) 191–203.
71. W. Banzhaf, P. Nordin, R. E. Keller, F. D. Francone: Genetic programming: An Introduction, Morgan Kaufmann Publishers, San Francisco, 1998.
72. P. K. Menon, V. H. L. Cheng, T. Lam, L. S. Crawford, G. D. Sweriduk, L. D. Dewell: Genetic search toolbox, Optimal Synthesis Inc., Los Altos, 1998.
73. D. Whitley: An overview of evolutionary algorithms: Practical issues and common pitfalls, *Inform. Software Tech.* **43** (2001) 817–831.
74. H. Youssef, S. M. Sait, H. Adiche: Evolutionary algorithms, simulated annealing and tabu search: a comparative study, *Eng. Appl. Artif. Intell.* **14** (2001) 167–181.

9. KAZALO POJMOVA

A

- akson · 137
- aktivacijska funkcija · 138
- ampermetrijska detekcija · 101
 - integrirana · 105
 - pulsna · 102, 105
 - trodimenzionalna ampermetrija · 106
- apsorbancija · 111
- apsorpcijski koeficijent · 111
- asimetričnost · 79

B

- biološki neuron · 136
- broj efektivnih teorijskih odsječaka · 49
- brzina protoka nezadržanog sastojka · 43
- bubrenje izmjenjivača · 38

C

- Cottrellova jednadžba · 104
- crpke · 6

Č

- čisto umetanje jedinki · 134

D

Debye-Hückel-Onsagerov zakon · 92

dendriti · 136

detekcija signala · 86

Doehlertov dizajn · 128

E

električna otpornost · 91

električna provodnost · 91

električna vodljivost · 91

elektrokemijske metode detekcije · 89

elitističko umetanje jedinki · 134

elitizam · 133

eluat · 1

eluens · 1

eluiranje · 1, 9

 gradijentno · 9, 11

 izokratno · 9, 11

energija zračenja · 109

F

faktor odjeljivanja · 45

faktor zadržavanja · 44

Faradayeva struja · 101, 103

funkcije kriterija uspješnosti · 121
 kriterij faktora odjeljivanja · 124
 kriterij granične udaljenosti · 123
 kriterij kromatografske eksponencijalne funkcije · 125
 kriterij kromatografske funkcije odziva · 123, 125
 kriterij minimalne razlike vremena zadržavanja · 122
 kriterij produkta razlika vremena zadržavanja · 123
 kriterij sume razlika vremena zadržavanja · 122
funkcionalne skupine · 41

G

generator eluensa · 13
 K_2CO_3 eluens · 16
 $KHCO_3/K_2CO_3$ eluens · 17
 KOH eluens · 13
 MSA eluens · 15

H

Hooverova teorija · 68

I

injektor · 23
injektorska petlja · 23
ionska kromatografija s kemijskim supresorom · 96
ionski izmjenjivači · 29, 30
 funkcionalne skupine · 29, 30, 32

kapacitet · 37
ionski izmjenjivački kosturi · 30
lateksni · 34
polimerni · 30, 31
silikatni · 32
ionski kromatograf · 4
izravna ionska kromatografija · 94

J

jednoliko umetanje jedinki · 134

K

kapacitet izmjenjivača · 37
iskoristivi · 37
ukupni · 37
kapacitet proboja kolone · 67
koeficijent aktiviteta · 83
koeficijent raspodjele · 42
koeficijent selektivnosti · 67
Kohlrauschov zakon · 94
kolone za pretkoncentraciju analita · 28
kolone za uklanjanje nepoželjnih sastojaka matice · 24
kolonska klopka · 4, 19
anionska · 19
kationska · 20
kompeticijske tvari · 1, 9

konduktometrijska detekcija · 89
konstanta konduktometrijske ćelije · 91
kriteriji uspješnosti odjeljivanja i vremena analize · 121
križanje jedinki · 132
kromatografija · 1
 adsorpcijska · 2
 afinitetna · 2
 fluidna pri superkritičnim uvjetima · 2
 frontalna · 1
 ionska · 2
 isključenjem · 2
 ispiranjem · 1
 istisnućem · 1
 kolonska · 2
 plinska · 2
 plošna · 2
 razdjelna · 2
 tekućinska · 2
kromatografska vrpca · 46
kromatografska zona · 46
kromatografsko odjeljivanje · 42

L

Lambert-Beerov zakon · 111
linearno područje odziva · 87

M

metode istodobnog planiranja eksperimenata · 121
metode slijednog planiranja eksperimenata · 120
 metode interpretacije · 120
 genetički algoritam · 120, 121, 129, 130
metode izviđanja · 120
 simpleks metoda · 120, 126
model dvaju kompeticijskih iona eluensa · 72
model linearne jakosti otapala · 66
molarna provodnost · 92, 93, 94
molarna provodnost pri beskonačnom razrjeđenju · 92
mutacija jedinki · 132

N

nadgledano podučavanje · 139, 140
nenadgledano podučavanje · 139, 142
nepokretna faza · 1, 29, 41
nosač · 41

O

odjeljivanje · 41
Ohmov zakon · 90
online priprema uzorka · 28
osjetljivost detektora · 87
otplinjač · 21

P

Planckova konstanta · 109
pokretna faza · 1, 6
povlačenje kromatografske krivulje · 79, 84
povlačenje signala · 86
prag osjetljivosti neurona · 138
pretreniranje mreže · 141
prigušivači pulsova · 7
 s dijafragmom · 9
 u obliku zavojnice · 7
prilagođeni volumen zadržavanja · 43, 71
prilagođeno vrijeme zadržavanja · 43
priprava eluensa · 11
 online priprava · 13
problem slučajnog hoda · 57, 63
protuioni · 29, 41
provodnost · 89
pružanje kromatografske krivulje · 79

R

razlučivanje · 9, 24, 36, 46, 50, 51, 89
razvoj metode · 118

S

selekcija jedinki · 133
selektivnost izmjenjivača · 40

simpleks · 128
sinapsa · 137
sinaptičke veze · 137
sinaptički prijenos · 137
spektrofotometrija · 108
spektrometrija · 108
spektroskopija · 108
središnja simpleks točka · 128
strategije razvoja ionskih kromatografskih metoda · 119
struja naboja · 103
stupanj umreženosti izmjenjivača · 38
stvarni koeficijent raspodjele termodinamičke ravnoteže · 83
sumator · 138
supresori · 3, 96, 97
 diskontinuirano obnovljivi · 97
 elektrolitički · 99
 kemijska supresija · 96
 kontinuirano obnovljivi · 97, 98
 membranski · 98
 vlaknasti · 98

Š

šum signala · 86

T

teorija brzine · 56

teorija linearne jakosti otapala · 66
teorija oblika kromatografske krivulje · 79
teorija odsječaka · 51
teorija višestrukih ionskih oblika eluensa i analita · 74
teorijski odsječak · 46, 48
težine neuronskih veza · 138
transmitancija · 111

U

umetanje jedinki na temelju podobnosti · 134
umjetne neuronske mreže · 136, 139
umjetni neuron · 138
UV/VIS detekcija · 108, 112

V

Van Deemterova jednadžba · 57, 66
verteks · 128
visina ekvivalentna teorijskom odsječku · 64, 66
visina ekvivalentna teorijskom odsječku · 49, 56, 57
volumen zadržavanja tvari · 43
vrijeme nezadržanog sastojka · 43
vrijeme zadržavanja · 42

10. POPIS POKRATA

ALSSA	<i>Analytical and Life Science Systems Association</i>
CEF	kriterij kromatografske eksponencijalne funkcije
CRF	kriterij kromatografske funkcije odziva
DES	model dvaju kompeticijskih iona eluensa (engl. <i>dual eluent species model</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
IR	infracrveno područje valnih duljina
HETP	visina ekvivalentna teorijskom odsječku
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
LSS	linearna jakost otapala (engl. <i>linear solvent strength</i>)
MSA	metansulfonska kiselina
MSEA	teorija višestrukih ionskih oblika eluensa i analita (engl. <i>multiple species eluent/analyte theory</i>)
PDA	detektor s nizom dioda (engl. <i>photo diode array detector</i>)
UV/VIS	ultraljubičasto i vidljivo područje valnih duljina

O AUTORIMA

TOMISLAV BOLANČA rođen je 1974. u Zagrebu. Diplomirao je 1998. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a magistrirao na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu 2000. te doktorirao 2003. godine. Zaposlen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije kao redoviti profesor i prodekan za poslovanje te je voditelj sveučilišnog specijalističkog poslijediplomskog studija Ekoinženjerstvo. Član je stalnog upravnog odbora *Central European Group for Separation Sciences*, član Matičnog odbora prirodnih znanosti, polje kemija, te član upravnog odbora i predsjednik Sekcije za kromatografiju Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa. Sudjelovao je i sudjeluje, kao istraživač i/ili voditelj, u radu više međunarodnih i domaćih projekata, objavio je više od 50 znanstvenih radova (44 citirana u *Current Contents* bazi), član je uređivačkog odbora dvaju međunarodnih znanstvenih časopisa i pozvani recenzent u više od 20 međunarodnih znanstvenih časopisa. Kao predsjednik ili član znanstvenog i organizacijskog odbora sudjelovao je u organizaciji više od dvadesetak većinom međunarodnih znanstvenih skupova. Ovlašteni je *auditor/lead auditor* za ISO 14001 te predsjednik upravnog odbora *spin-off* tvrtke *Comprehensive Water Technology d.o.o.* 2014. godine *Central European Group for Separation Sciences* dodijelila mu je međunarodnu nagradu i medalju za doprinos u kromatografiji i srodnim separacijskim tehnikama.

ŠIME UKIĆ rođen je 1979. u Šibeniku. Nakon djetinjstva provedenog na otoku Prviću, 1997. odlazi u Zagreb gdje upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Po završetku studija zapošljava se na matičnom fakultetu kao znanstveni novak na Zavodu za analitičku kemiju te 2009. brani svoju disertaciju pod nazivom „Matematički model za simuliranje odziva ionske kromatografske analize“. U nastavno zvanje docenta izabran je 2012. Nositelj je više kolegija na dodiplomskim, diplomskim i doktorskom studiju matičnog fakulteta. Znanstveno se bavi problematikom analitičke kemije, s osobitim naglaskom na ionskoj kromatografiji, te kemijom voda i kemometrijom. Tijekom dosadašnjeg znanstvenog djelovanja sudjelovao je u realizaciji više znanstvenih projekata, a rezultate istraživanja objavio u brojnim znanstvenim radovima (28 objavljeno u časopisima citiranima u bazi *Current Contents*). Član je Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.