



Otrzymano: 19 lipca 2016
Zaakceptowano: 14 listopada 2016
Udostępniono online: 21 listopada 2016

Jednoczesne oznaczanie nieorganicznych anionów oraz kwasów karboksylowych metodą chromatografii jonowej z elucją gradientową

Simultaneous determination of inorganic anions and carboxylic acids by using ion chromatography with gradient elution

Joanna KOŃCZYK, Rajmund MICHALSKI*

Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska

Streszczenie: Chromatografia jonowa jest referencyjną metodą oznaczania głównych nieorganicznych anionów i kationów w wodach i ściekach. Wraz z jej rozwojem rozszerza się zakres zastosowań o nowe rodzaje analitów i matryc. Przedmiotem badań była możliwość zastosowania chromatografii jonowej z detekcją konduktometryczną w układzie elucji gradientowej do oznaczania wybranych nieorganicznych anionów oraz kwasów karboksylowych w próbkach żywności na przykładzie naparów herbat ziołowych. Przedstawiono wpływ składu eluentu i jego gradientu na jednoczesne rozdzielanie jonów: F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} oraz kwasów: mrówkowego, octowego, szczawowego i cytrynowego w próbkach naparów z herbat.

Słowa kluczowe: aniony, chromatografia jonowa, detekcja konduktometryczna, elucja gradientowa, kwasy karboksylowe

Abstract: Ion chromatography is the reference method for determining the major inorganic anions and cations in water and wastewater. Along with the developments its applications expand to the range of new types of analytes and matrices. The object of the study was the possibility of using ion chromatography with conductivity detection and gradient elution of selected inorganic anions and carboxylic acids in food samples for example of herbal tea infusions. The influence of eluent composition and its gradient on the simultaneous separation of ions: F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , as well as formic acid, acetic acid, oxalic acid, and citric acid in samples of teas was tested.

Keywords: anions, ion chromatography, conductometric detection, gradient elution, carboxylic acids

1. Wstęp

Do oznaczania nieorganicznych jonów były i nadal są wykorzystywane metody klasyczne takie jak metody miareczkowe, kolorymetryczne, grawimetryczne czy turbidymetryczne. Ich zalety to dostępność i niskie koszty analiz. Niestety większość z nich charakteryzuje się znacznym wpływem czynników przeszkadzających, wysokimi granicami wykrywalności i oznaczalności, niską czułością i selektywnością, a także w wielu przypadkach koniecznością stosowania drogich i toksycznych odczynników oraz brakiem możliwości automatyzacji pomiarów. Ponadto metody klasyczne, nawet jeśli spełniają kryteria jakościowe, zazwyczaj są pracochłonne, co utrudnia pracę w laboratorium wykonujących rutynowe analizy. W takiej sytuacji zdecydowanie bardziej efektywne są metody instrumentalne, mimo wysokiej ceny zakupu przyrządów. Wśród nich dominują metody separacyjne, a w szczególności chromatograficzne [1].

Chromatografia jako metoda rozdzielania znana jest od początku XX wieku, jednak jej szybki rozwój nastąpił dopiero kilkadziesiąt lat później. Obecnie metody chromatograficzne ze względu na możliwość szybkiego rozdzielania i analizy substancji, także w próbkach o złożonych matrycach, należą

do najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej. Różnymi metodami chromatograficznymi można rozdzielać i analizować składniki polarne i niepolarne; kwasyne, obojętne i zasadowe; organiczne i nieorganiczne, a także monomery, oligomery i polimery. W zależności od właściwości fizykochemicznych badanej próbki i jej składników, do ich rozdzielania należy zastosować odpowiedni rodzaj chromatografii. Metody chromatograficzne są powszechnie stosowane zarówno na skalę preparatywną, jak i analityczną, a chromatografy są najbardziej rozpowszechnionymi na świecie przyrządami analitycznymi.

O ile w badaniach związków organicznych dominują chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), w przypadku rozdzielania i oznaczania substancji nieorganicznych (w tym rutynowo oznaczanych anionów i kationów) metody chromatograficzne długo nie mogły znaleźć zastosowań. Jeszcze 50 lat temu, kiedy to chromatografia gazowa i cieczowa były już powszechnie stosowane w laboratoriach, badania związane z ich wykorzystaniem do analiz nieorganicznych jonów nie przynosiły spodziewanych efektów. Przełom nastąpił dopiero na początku lat 70-tych XX wieku, kiedy to ukazało się kilka prac dotyczących zastosowania chromatografii jonowej do rozdzielania i oznaczania nieorganicznych anionów i kationów [2]. Oficjalnie chromatografia jonowa jako metoda analityczna

* Autor korespondencyjny.
Adres e-mail: r.michalski@ajd.czest.pl (R. Michalski).

istnieje od roku 1975, kiedy to na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego w Chicago, firma Dionex zaprezentowała pierwszy handlowy chromatograf jonowy, a praca Smalla, Stevensa i Baumanna [3] uznana została za kamień milowy w rozwoju tej metody analitycznej. Obecnie chromatografia jonowa jest najpopularniejszą instrumentalną metodą oznaczania nieorganicznych i organicznych anionów i kationów w wodach i ściekach stosowaną w większości laboratoriów na świecie. Zakres jej zastosowań rozszerza się szybko m.in. na analizy próbek żywności, w badaniach klinicznych, w przemyśle farmaceutycznym, metalurgicznym, produkcji półprzewodników czy w badaniach środowiskowych [4]. W Polsce zwiększone zainteresowanie tą metodą analityczną obserwuje się dopiero od kilkunastu lat, a przyczyniają się do tego konferencje naukowe na jej temat i związane z nimi monografie [5]. Chromatografia jonowa już w latach 80-tych XX wieku została uznana za referencyjną metodę w badaniach wód i ścieków zalecaną przez organizacje takie jak Północnoamerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA) i Międzynarodowa Organizacja Standaryzacyjna (ISO) [6].

O ile chromatografia jonowa została stworzona na potrzeby analiz nieorganicznych anionów i kationów w wodach i ściekach, jej rutynowe zastosowania do analiz substancji organicznych takich jak m.in. kwasy karboksylowe czy aminy nastąpiły kilkanaście lat później. Niższe kwasy karboksylowe takie jak kwas mrówkowy, octowy, propionowy czy masłowy są powszechnie stosowane w przemyśle spożywym, farmaceutycznym, tworzyw sztucznych oraz barwników i farb. Jest to ich główne źródło obecności w próbkach środowiskowych. Kwasy karboksylowe takie jak kwas szczawowy, mrówkowy, octowy, propionowy, pirogronowy czy ketomalonowy są produktami ubocznymi uzdatniania wód – stąd ich potencjalna obecność w wodach do spożycia [7]. Ponadto mogą one stanowić produkty przemian zachodzących w atmosferze z udziałem ozonu i halogenków oraz występować w wodach opadowych [8].

Najważniejsze parametry decydujące o procesie rozdzielania w chromatografii jonowej to: rodzaj wypełnienia kolumny analitycznej; rodzaj, stężenie, pH i natężenie przepływu eluentu; rodzaj detektora i parametry jego pracy; objętość nasyty; rodzaj odczynnika do derywatywacji zakolumnowej i jego natężenia przepływu (dla detektora UV/Vis) oraz sposób przygotowania próbki do analizy. W analizie mieszanin wieloskładnikowych niezmiernie ważny jest odpowiedni dobór składu eluentu. Ponadto składniki eluentu nie mogą reagować pomiędzy sobą, jak i z częściami chromatografu, z którymi mają bezpośredni kontakt. Eluent może być tłoczony za pomocą pompy przez kolumnę w trybie izokratycznym lub gradientowym. Podczas elucji izokratycznej skład fazy ruchomej jest stały podczas całego procesu chromatografowania, a w elucji gradientowej w trakcie rozdzielania następuje zmiana jego stężenia i wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej. Eluentami najczęściej stosowanymi do rozdzielania anionów z wykorzystaniem chromatografii jonowej z tłumieniem przewodnictwa w układzie izokratycznym są wodne roztwory węglanu sodu, wodorowęglanu sodu lub ich mieszaniny. W układzie gradientowym stosowane są wodne roztwory wodorotlenku sodu lub potasu.

Ze wzrostem stopnia utlenienia jonu próbki rośnie jego powinowactwo do grupy funkcyjnej, np. jony na +III stopniu utlenienia są wiązane silniej niż jony na +II stopniu utlenienia. Dla różnych jonów o tym samym stopniu utlenienia im w więk-

szy jest promień jonowy i stopień polaryzacji, tym jon jest silniej zatrzymywany na jonicie. Jony próbki charakteryzujące się silnym oddziaływaniem hydrofobowym lub siłami Van der Waalsa z matrycą będą wymywane przed jonami o słabszych oddziaływaniach. Im wyższy jest stopień utlenienia jonu, tym dłużej będzie on zatrzymywany na jonicie. Zasada ta jest słuszna dla anionów prostych i złożonych, w tym dla kwasów organicznych z jedną, dwiema lub trzema grupami funkcyjnymi, a także dla kationów nieorganicznych i prostych. Przykładowo jony takie jak: F^- , Cl^- , Br^- , I^- czy Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ są eluowane w kolejności wzrostu ich promienia jonowego. Na rozdzielanie anionów i kationów (w tym organicznych kwasów i amin) wpływa również pH eluentu, np. fosforany(V) w roztworze o niskim pH występują jako jony jednoujemne, a przy wzroście pH tworzą jony dwu- lub trójujemne. Z tego powodu względne położenie piku jonu fosforanowego(V) na chromatogramie może się zmieniać. Tak samo zachowują się wielofunkcyjne kwasy organiczne, których czasy retencji rosną ze wzrostem pH eluentu. Biorąc pod uwagę ładunek oraz wielkość jonów, niższe kwasy karboksylowe są eluowane z typowej kolumny anionowej w czołnej, pomiędzy jonami fluorkowymi i chlorkowymi, co utrudnia ich jednoczesne rozdzielanie i oznaczanie. Z kolei sole wyższych kwasów karboksylowych, takie jak m.in. szczawiany i cytryniany są wymywane późno, w związku z czym, elucja izokratyczna powinna być zastąpiona elucją gradientową [9].

Celem pracy było opracowanie i optymalizacja metodyki jednoczesnego rozdzielania i oznaczania wybranych nieorganicznych anionów (F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) oraz kwasów karboksylowych (mrówkowy, octowy, szczawowy, cytrynowy) metodą chromatografii jonowej z detekcją konduktometryczną w układzie elucji gradientowej.

2. Część eksperymentalna

Do badań wykorzystano chromatograf jonowy firmy Thermo Scientific (Dionex ICS-3000) wyposażony w: pompę gradientową; system odgazowania próżniowego; zawór strzykowy; program komputerowy Chromeleon 7; automatyczny podajnik próbek (AS-AP); supresor AERSTM300_2mm; detektor konduktometryczny DC-3000 oraz automatyczny generator eluentu Dionex EGC KOH.

W praktyce laboratoryjnej optymalizacja warunków rozdzielania najczęściej dotyczy doboru odpowiedniego składu i stężenia eluentu oraz jego natężenia przepływu. W prowadzonych badaniach wykorzystano kolumnę firmy Dionex IonPac AS20 dedykowaną do jednoczesnego rozdzielania nieorganicznych anionów oraz jonów kwasów karboksylowych.

Zasadniczym problemem, z jakim spotykają się praktycy stosujący metody chromatograficzne w laboratoriach, jest to, że noty aplikacyjne producentów kolumn analitycznych są przygotowywane na czystych wzorach, a skład próbki i stężenie poszczególnych analitów nie są tak zróżnicowane jak w próbkach rzeczywistych. W prowadzonych przez nas badaniach zastosowano kolumnę analityczną Dionex IonPac AS20, ale o średnicy 2 mm, co wiązało się z obniżonym natężeniem przepływu eluentu (0.25 mL/min). Pozostałe warunki rozdzielania były takie same. W celu w ykondycjonowania kolumny analitycznej, po każdym nasytciu przepłukiwano ją wodą dejonizowaną przez 15 minut dla analiz prowadzonych zgodnie z profilami gradientowymi II i III, 20 minut – dla profili

Tabela 1. Warunki elucji gradientowej dla poszczególnych profili.

Program gradientu			
Czas min	Stężenie eluentu mM	Czas min	Stężenie eluentu mM
Profil I		Profil II	
0–35	10	0–6	2
		10	7
		19	15
		20	30
		22	30
		24	5
26	2		
Profil III		Profil IV	
0–6	2	5	5
7	7	5–12	10
15	20	20–21	45
20	35	21.1	5
21–21.5	40		
23	5		
26	2		
Profil V		Profil VI	
0–6	2	0–5	5
10	7	15	25
15	30	30–31	55
18–18.5	55	31.1	5
23	10		
26	5		

IV, V i VI lub 30 minut – dla profilu izokratycznego I. W Tabeli 1 podano w warunki elucji gradientowej dla każdego testowanego programu.

Przedmiotem badań było określenie w wpływu składu eluentu (jego gradientu) na możliwość jednoczesnego rozdzielania

i oznaczania jonów: F^- ; Cl^- ; NO_2^- ; NO_3^- ; Br^- ; PO_4^{3-} ; SO_4^{2-} oraz mrówczanowych, octanowych, szczawianowych oraz cytrynianowych. Zastosowano eluent KOH o 5-ciu różnych profilach gradientu oraz jeden układ izokratyczny. Ich profile stężeń eluentej przedstawiono na Rysunku 1.

Do badań wykorzystano mieszaninę wzorcową o składzie [mg/L]: F^- – 5; Cl^- – 25; NO_2^- – 10; NO_3^- – 25; Br^- – 5; PO_4^{3-} – 15; SO_4^{2-} – 37.5 oraz aniony kwasów organicznych (mrówkowego, octowego, szczawianowego i cytrynowego) – po 10 każdy. Próbkami rzeczywistymi były próbki naparów herbaty „Bukiet ziół” i herbaty zielonej z opuncją firmy Bastek oraz herbaty z mięty firmy Belin. Próbkę herbaty przygotowano w następujący sposób: odważono produkt w ilości 1.0000 g \pm 0.0001 g, który zalano 100 ml wrzącej dejonizowanej wody i pozostawiono pod przykryciem na 10 minut. Następnie napar sączone przez średniej grubości bibułę filtracyjną, a następnie filtrowano przez filtr strzykawkowy Micropore NYLON 66 0.45 μ m. Przesącz przelano do plastikowych pojemników i poddano analizie chromatograficznej i spektrometrycznej.

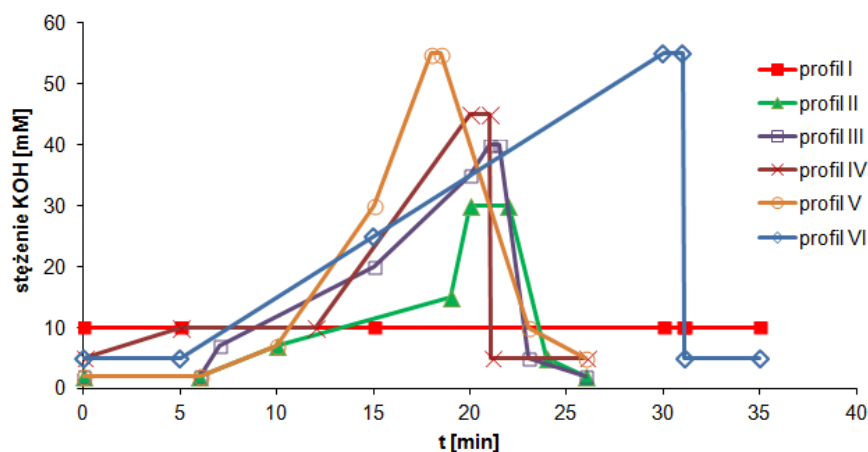
3. Wyniki i dyskusja

Na Rysunkach 2–18 przedstawiono chromatogramy uzyskane dla próbki wzorcowej oraz próbek rzeczywistych dla poszczególnych profili stężeń eluentu.

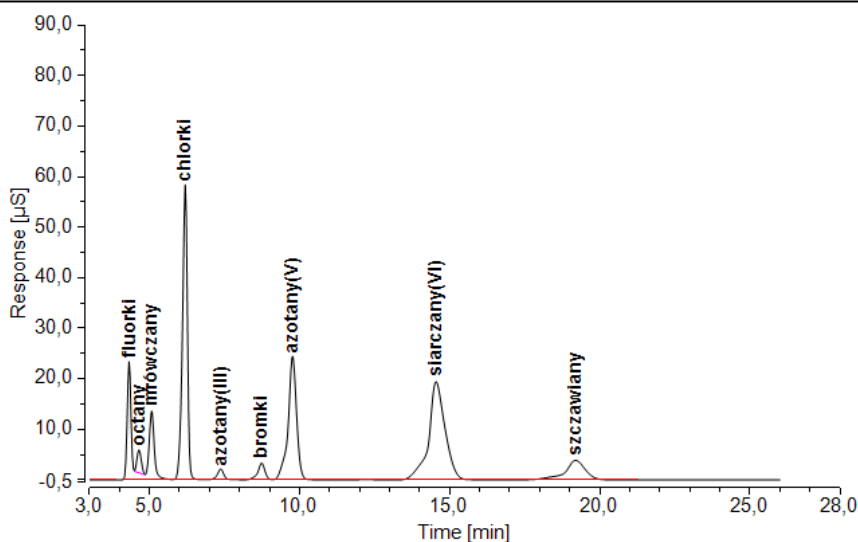
Chromatografia jonowa z detekcją konduktometryczną i w układzie elucji gradientowej jest użyteczną metodą do jednoczesnego oznaczania nieorganicznych anionów oraz kwasów karboksylowych. Dobierając odpowiednio w warunki analityczne takie jak: rodzaj kolumny analitycznej (jej wypełnienie), rodzaj i stężenie eluentu, natężenie jego przepływu, parametry pracy supresora i detektora, a także sposób przygotowania próbki do analizy, można rozdzielać i oznaczać te jony na poziomie od μ g/dm³ do mg/dm³.

Wyniki uzyskane podczas prowadzonych badań pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

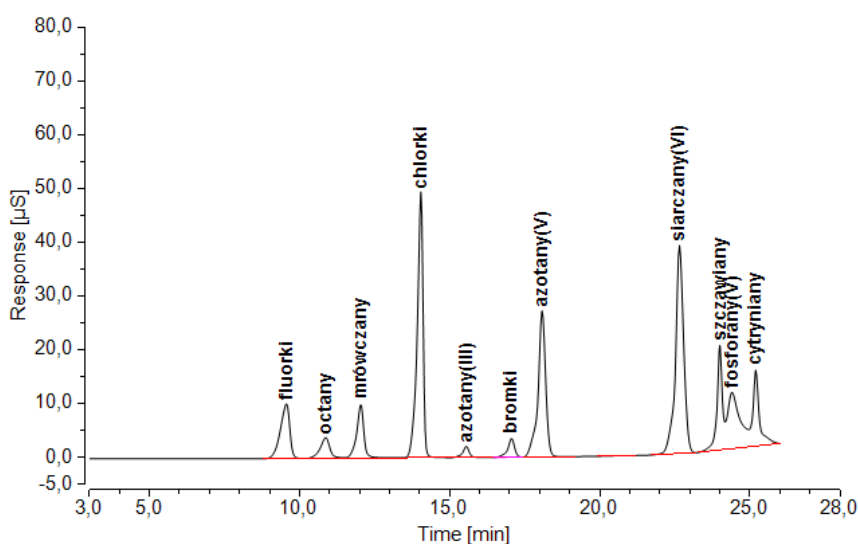
Elucja izokratyczna (profil I) nie pozwala na jednoczesne rozdzielanie i oznaczanie wszystkich analitów zarówno w próbce wzorcowej (Rysunek 2), jak i w próbkach herbat (Rysunki 8 i 14). Wprawdzie dla 11-stu anionów obecnych w próbce uzyskano 9 pików, ale ich rozdzielczość jest słaba, a na chromatogramie nie ma pików jonów fosforanowych i cy-



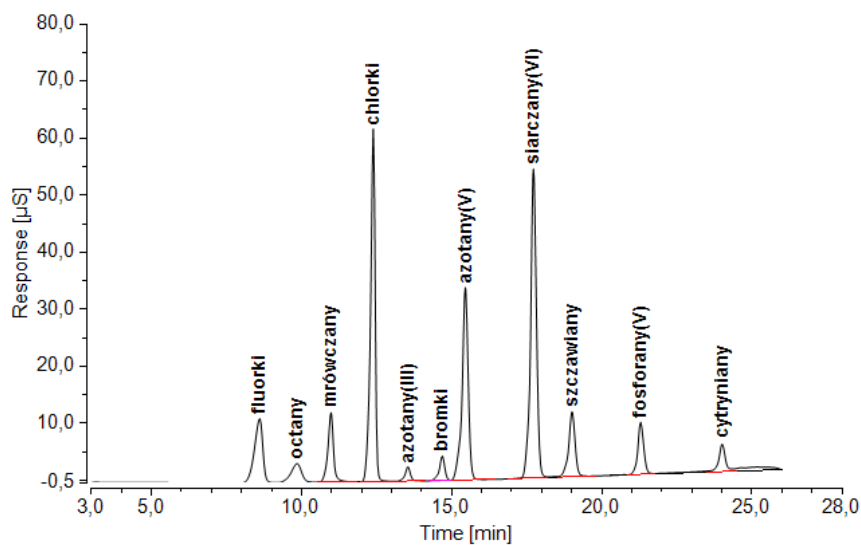
Rysunek 1. Profile stężeń eluentej: izokratyczny (stałe stężenie KOH = 10 mM – profil I) i gradientowe (profile II–VI).



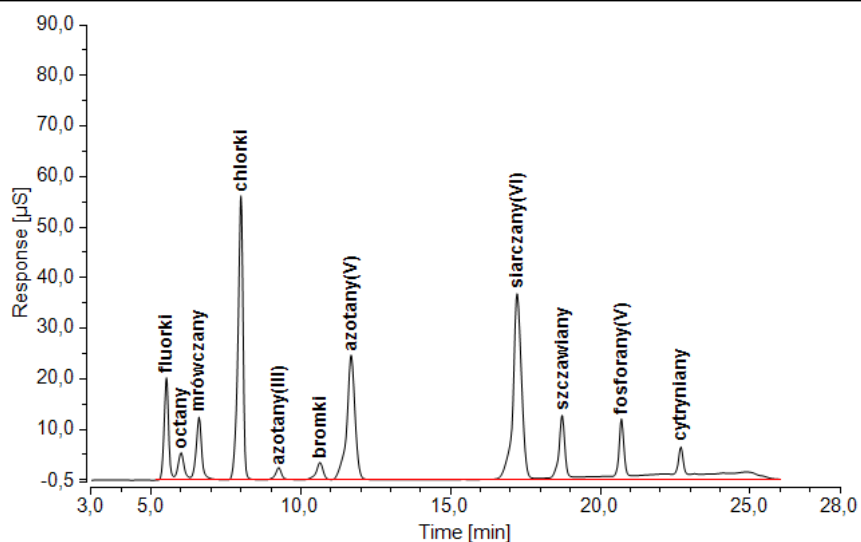
Rysunek 2. Chromatogram próbki w zorcowej, profil I (izokratyczny).



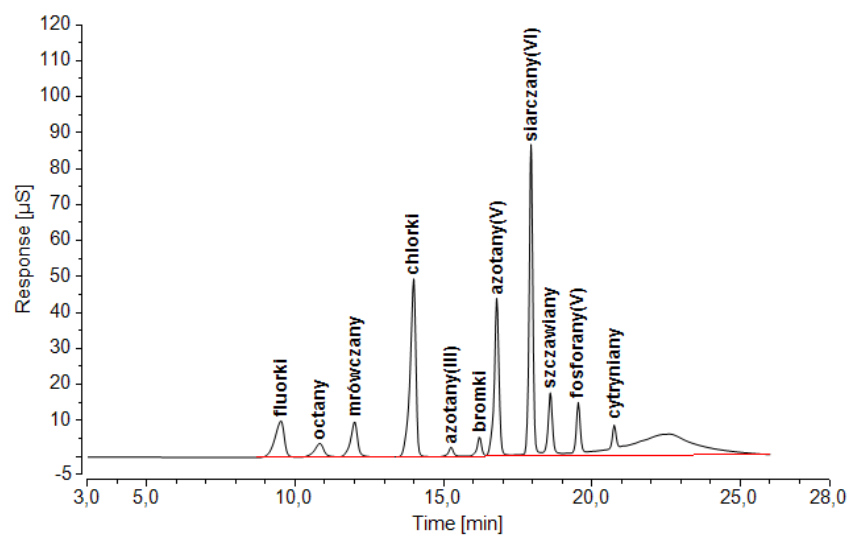
Rysunek 3. Chromatogram próbki w zorcowej, profil II (gradientowy).



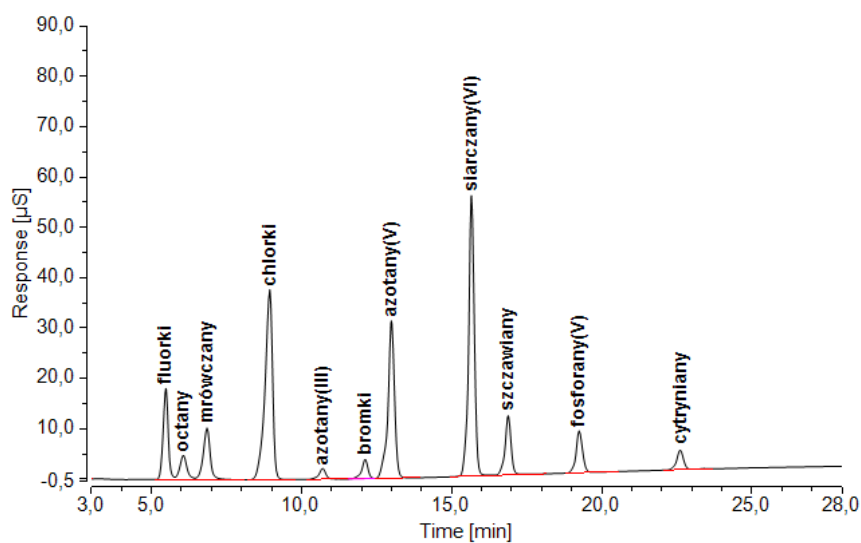
Rysunek 4. Chromatogram próbki w zorcowej, profil III (gradientowy).



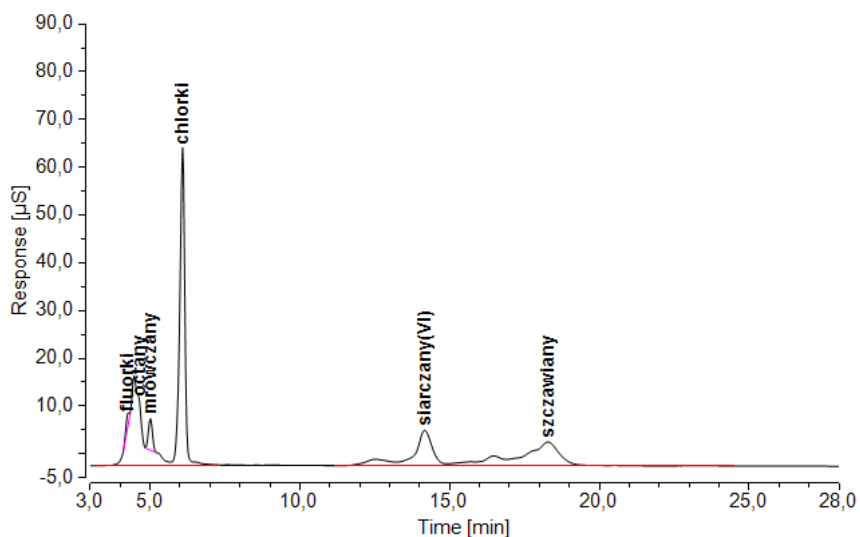
Rysunek 5. Chromatogram próbki w zorcowej, profil IV (gradientowy).



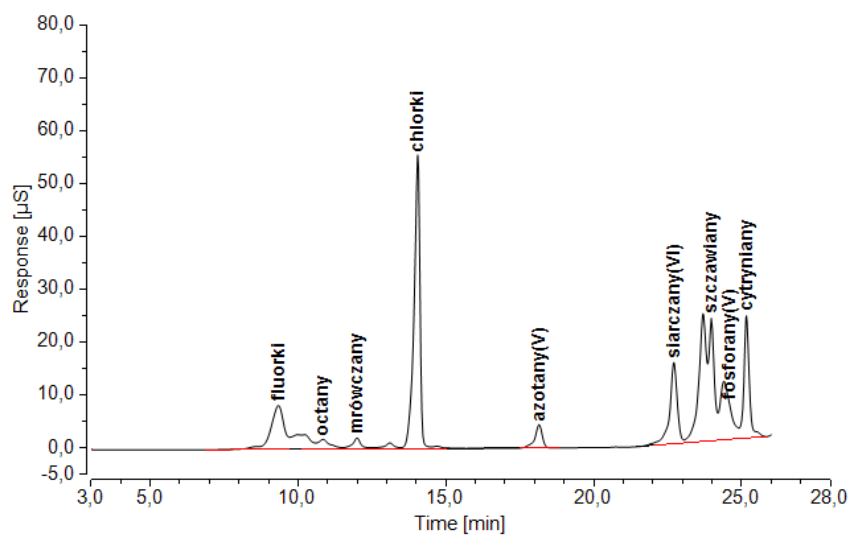
Rysunek 6. Chromatogram próbki w zorcowej, profil V (gradientowy).



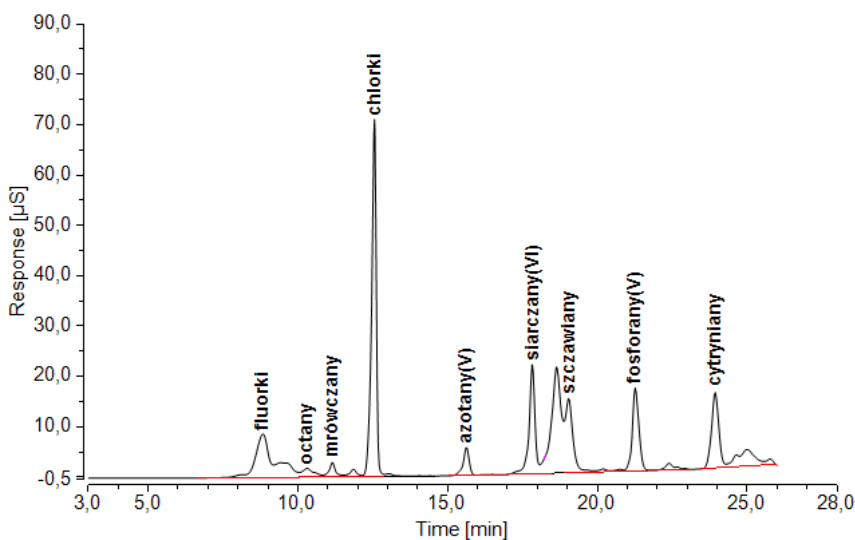
Rysunek 7. Chromatogram próbki w zorcowej, profil VI (gradientowy).



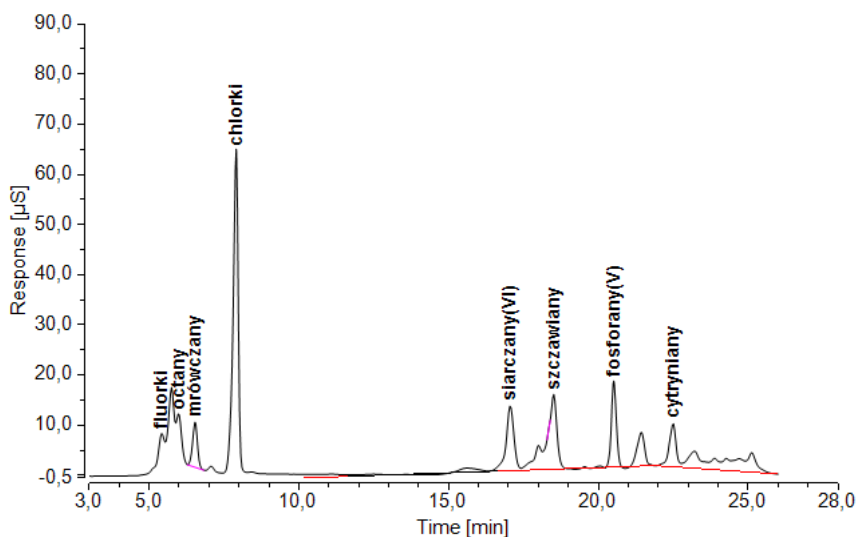
Rysunek 8. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil I (izokratyczny).



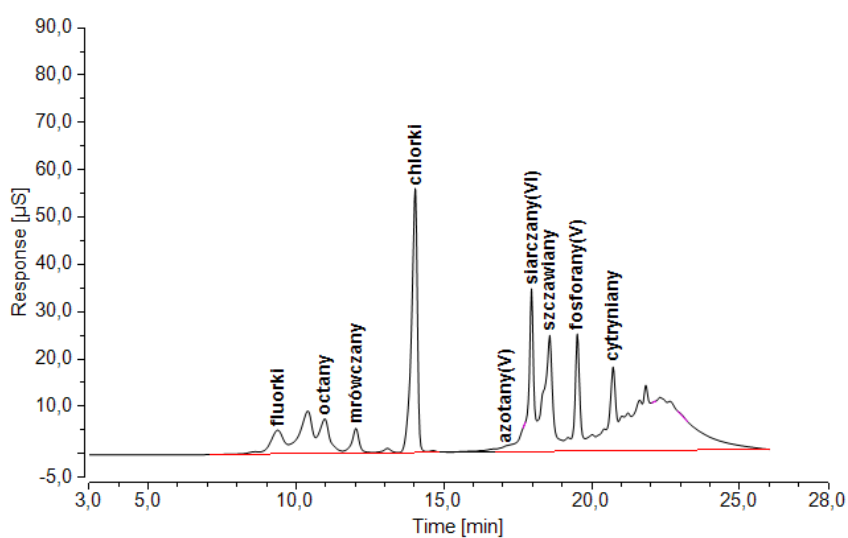
Rysunek 9. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil II (gradientowy).



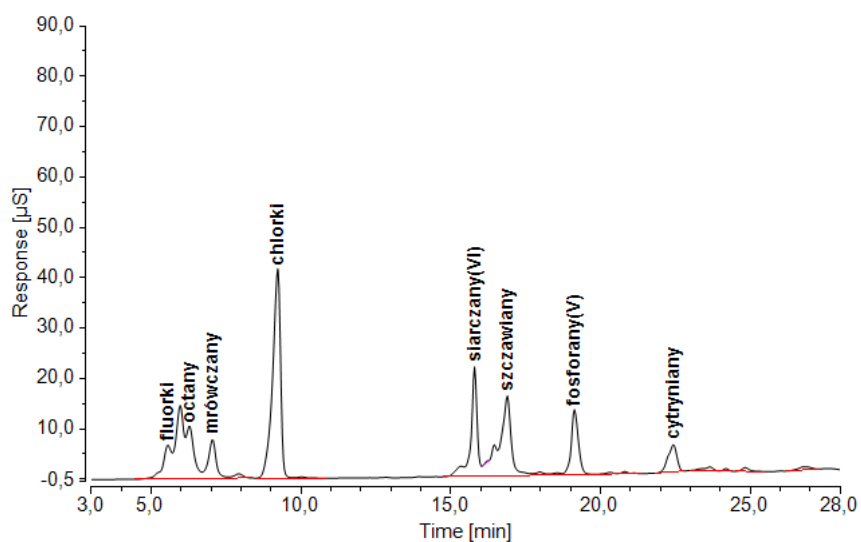
Rysunek 10. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil III (gradientowy).



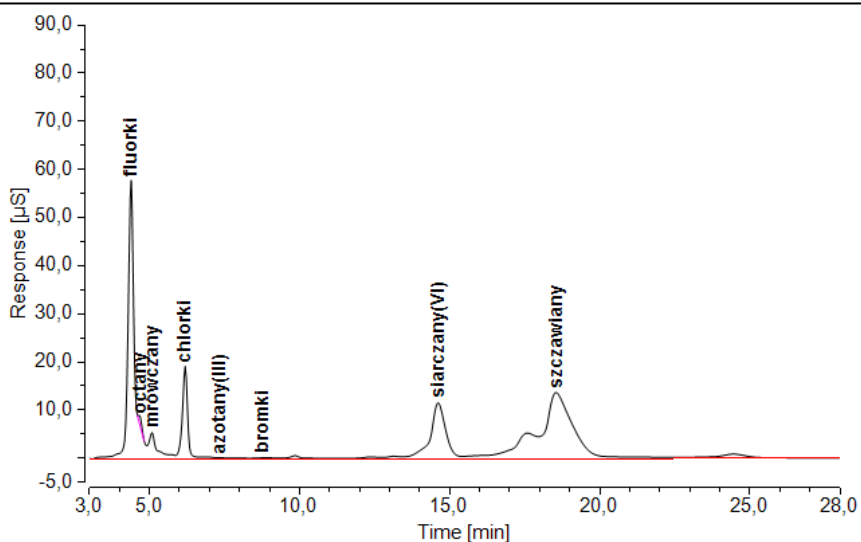
Rysunek 11. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil IV (gradientowy).



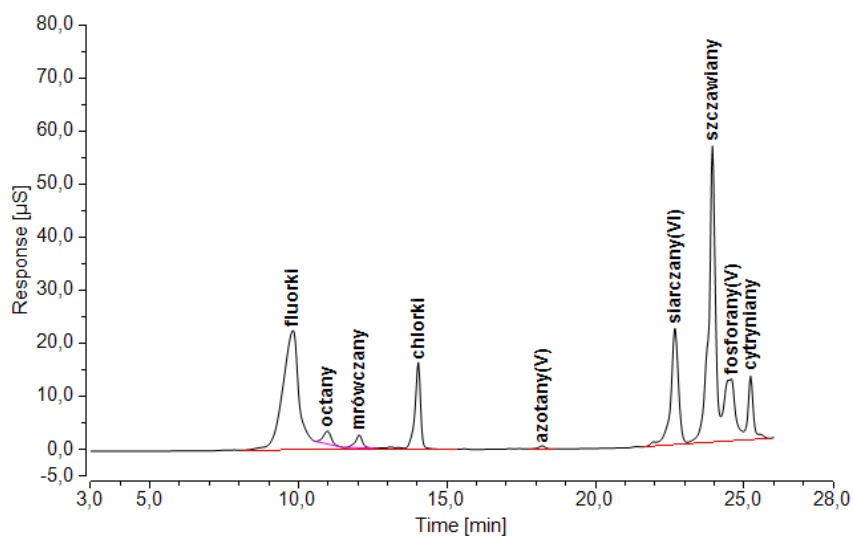
Rysunek 12. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil V (gradientowy).



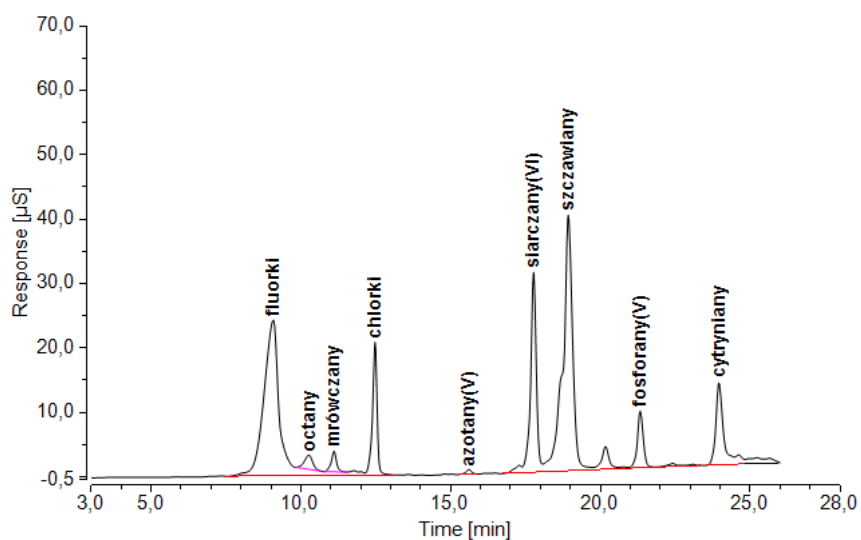
Rysunek 13. Chromatogram anionów w naparze z herbaty „Bukiet ziół”, profil VI (gradientowy).



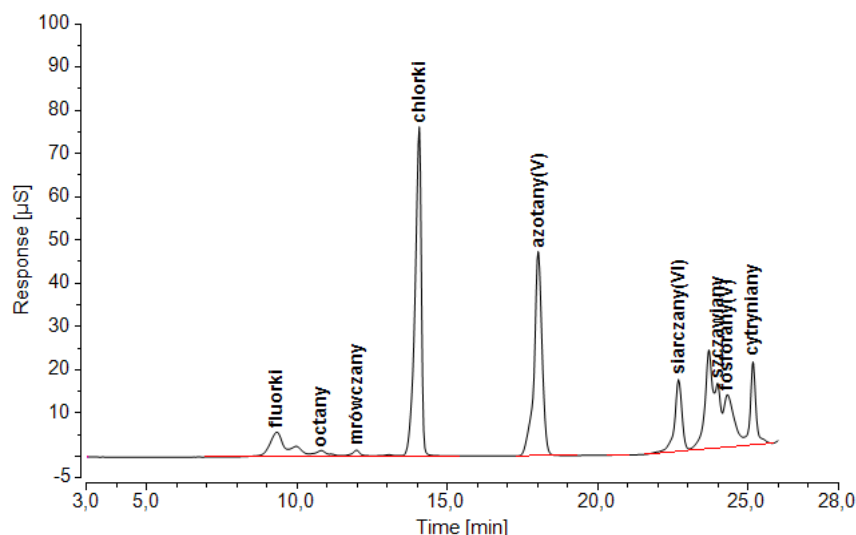
Rysunek 14. Chromatogram anionów w naparze z herbaty zielonej z opuncją, profil I (izokratyczny).



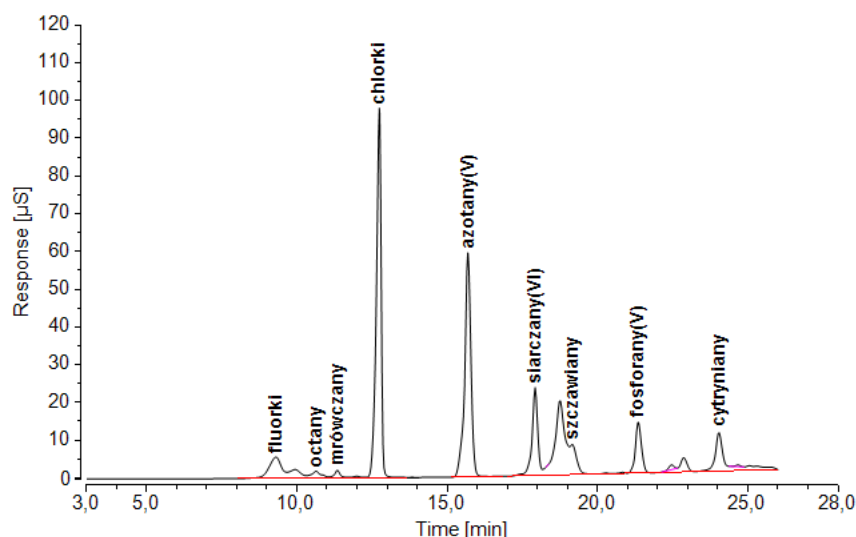
Rysunek 15. Chromatogram anionów w naparze z herbaty zielonej z opuncją, profil II (gradientowy).



Rysunek 16. Chromatogram anionów w naparze z herbaty zielonej z opuncją, profil III (gradientowy).



Rysunek 17. Chromatogram anionów w naparze z herbaty z mięty, profil II (gradientowy).



Rysunek 18. Chromatogram anionów w naparze z herbaty z mięty, profil III (gradientowy).

trynianowych. W przypadku próbek rzeczywistych, w których stężenia anionów są silnie zróżnicowane wyraźne są garby i nierozdzielone pary pików F^- /mrówczany oraz PO_4^{3-} /szczawiany. Zastosowanie elucji gradientowej (profil II) pozwala na bardzo dobre rozdzielanie pierwszych 7 anionów (w tym jonów F^- , mrówczanowych, octanowych i Cl^-). Jony silnie spolaryzowane (szczawiany, fosforany, cytryniany) nie są dostatecznie dobrze rozdzielone (Rysunek 3). Jest to szczególnie dobrze widoczne w próbkach rzeczywistych o zróżnicowanym stężeniu analitów (Rysunki 9 i 15).

Bardzo dobrą efektywność rozdzielania uzyskano dla gradientu III, zarówno w przypadku próbki w zorcowej, jak i próbek rzeczywistych (Rysunki 10 i 16). Na chromatogramie próbki rzeczywistej widoczne są piki niezidentyfikowane, które jednak nie wpływają na jakość analiz. Porównując chromatogramy uzyskane dla gradientu III i IV (Rysunki 4 i 5), znacznie lepsze rozdzielczości uzyskano dla silnie spolaryzowanych anionów (profil IV). Charakterystyczna jest duża (około 5 minut) różnica w czasach retencji azotanów(V) i siarczanów(VI). Dla profilu gradientu V pierwsze aniony (fluorkowe)

są wymywane z kolumny dopiero po około 9 minutach, a ostatnie (cytryniany) już po 21 minutach. Powoduje to duże nagromadzenie pików środkowej części chromatogramu i utrudnia analizę próbek rzeczywistych (Rysunek 12).

4. Podsumowanie

Podsumowując, należy stwierdzić, że nawet zmiana w jednym parametrze (skład eluentu) pozwalają zoptymalizować rozdzielanie badanych jonów. Inne warunki należy wybierać, gdy przedmiotem badań jest kilkanaście analitów, inne gdy istotne są tylko pojedyncze jony, a jeszcze inne gdy ważny jest całkowity czas rejestracji chromatogramu i liczba wykonanych analiz. Elucja gradientowa pozwala na prostą i efektywną optymalizację jednoczesnego rozdzielania wielu analitów, także w próbkach o złożonej matrycy.

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowania firmie A.G.A. Analytical za bezpłatne udostępnienie chromatografu jonowego

Thermo Scientific (Dionex) model ICS-3000, dzięki czemu możliwe było wykonanie badań.

Literatura

- [1] Z. Witkiewicz, M. Kałużna-Czaplińska, **Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych**, WNT, Warszawa, 2011.
- [2] H. Small, B. Bowman, *Am. Lab.*, **1998**, 10, 1–8.
- [3] H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman, *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1801–1886.
- [4] R. Michalski, **Chromatografia jonowa**, WNT, Warszawa, 2015.
- [5] R. Michalski (red.), **Postępy chromatografii jonowej**, IPIŚ PAN, Zabrze, 2014.
- [6] R. Michalski, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2006**, 36, 107–127. doi: 10.1080/10408340600713678
- [7] S.D. Richardson, M.J. Flew a, E.D. Wagner, R. Schoeny, D.M. De Marini, *Mut. Res. Rev. Mut. Res.*, **2007**, 636, 178–242. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.09.001
- [8] E. Dabek-Zlotorzynska, M. McGrath, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 367, 507–518. doi: 10.1007/s002160000376
- [9] R.D. Rocklin, R.W. Slingsby, Ch.A. Pohl, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **1986**, 9, 757–775.
- [10] Thermo Scientific, Dionex IonPac AS20 Columns, Product Manual, 2012.