



# Najnowsze osiągnięcia w śladowej analizie metali z zastosowaniem chromatografii jonowej z chelatującymi fazami stacjonarnymi

Anna Błazewicz\*

W pracy przedstawiono osiągnięcia w wysokosprawnej chromatografii jonowej przebiegającej z tworzeniem kompleksów chelatowych (HPCIC). Postęp w tej dziedzinie dotyczy głównie powstających nowoczesnych chelatujących faz stacjonarnych, posiadających zwiększoną kinetykę oddziaływań analizowanych jonów z grupami funkcyjnymi opisywanych faz. Dokonano przeglądu osiągnięć dotyczących nowych reagentów do derywatywacji pokolumnowej oraz metod poprawiających czułość detekcji i wykrywalność w HPCIC. Niniejsze opracowanie zawiera także przykłady nowych zastosowań chelatujących faz stacjonarnych w analizie próbek o złożonej matrycy, w tym biologicznych.

## 1. Wprowadzenie

Chromatografia jonowa (IC) jest odmianą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosowaną do rozdzielania i oznaczania anionów i kationów oraz innych substancji po ich uprzednim przeprowadzeniu do postaci jonowej [1]. Wysokosprawna chromatografia jonowa z tworzeniem kompleksów chelatowych (ang. High Performance Chelation Chromatography, HPCIC) to technika chromatograficzna, w której mechanizm rozdzielania opiera się głównie na selektywnym tworzeniu związków kompleksowych pomiędzy analitami a grupami powierzchniowymi fazy stacjonarnej. Zarówno kinetyka tworzenia wspomnianych kompleksów, jak i ich trwałość decydują o efektywności rozdzielania jonów. W 1940 roku Skogseid zastosował sorbent posiadający grupy dipikrylo-

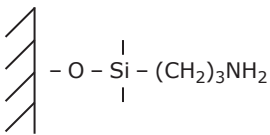
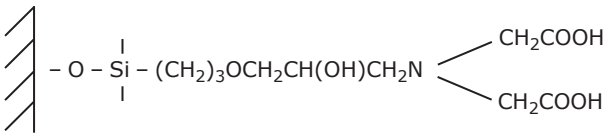
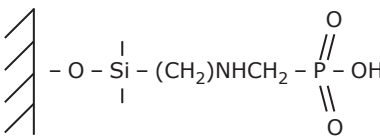
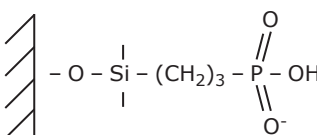



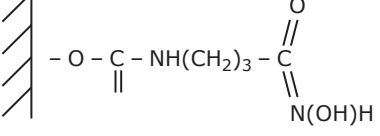
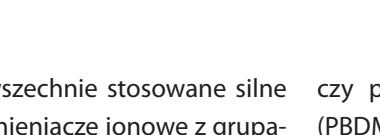
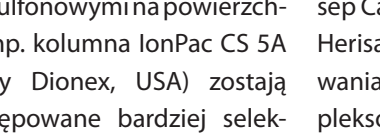
aminowe do selektywnej izolacji jonów potasu [2]. Dzieciście lat później przygotowano sorbent z grupami aminokarbonylowymi do zagęszczania jonów metali ciężkich [3]. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze doniesienia o zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania substancji o charakterze jonowym [4]. Powstałe wówczas wypełnienia kolumn chromatograficznych charakteryzowały się słabą wydajnością. Ponadto brak było jeszcze powszechnie dostępnych czułych technik detekcji on-line, a dodatkowy problem stanowiła ilośćowa elucja jonów z sorbentów chelatujących. Chociaż żywice chelatujące były i są nadal z powodzeniem stosowane do zateżnienia, czy wydzielania śladowych ilości jonów [5] to nakładające się mechanizmy

jonowymienny oraz kompleksowania stanowiły początkowo duże utrudnienie do oszacowania selektywności kolumn z tego typu wypełnieniami.

Jones i Schwedt jako pierwsi otrzymali fazę stacjonarną składającą się z nośnika będącego kopolimerem styrenu z diwinylobenzenem (PS-DVB), na powierzchni którego osadzono hydrofobowy barwnik (chromazurol S, CAS) do rozdzielania magnezu, manganu, cynku i miedzi [6]. Mechanizm kompleksowania na powierzchni takiej fazy stacjonarnej mógł być dokładnie poznany poprzez ograniczenie wpływu oddziaływań jonowymiennych na rozdzielanie chromatograficzne. Dokonano tego dzięki zastosowaniu eluentów o dużej sile jonowej ( $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$ ). Jak wiadomo, zbyt duża siła jonowa próbki może spowodować

znaczne zmiany w pojemności jonowymiennych kolumny, a w związku z tym zaburzyć proces rozdzielania, w którym zasadniczy mechanizm polega na wymianie jonowej. Zwykle stosuje się dodatki azotanów (V), względnie chloranów (VII) litowców do faz ruchomych, ponieważ nie posiadają właściwości kompleksowania metali oraz nie tworzą osadów w trakcie analizy. Jednakże, jeśli rozdzielanie jonów odbywa się na chelatujących fazach stacjonarnych większą rolę odgrywają trwałości kompleksów powstających na powierzchni fazy stacjonarnej. Nawet przy braku wymienionych powyżej związków jonowych w eluencie mechanizm chelatujący będzie dominował nad jonowymiennym, jeśli stałe trwałości kompleksów oznaczanych jonów z ugrupowaniami chelatującymi fazy stacjonarnej będą wysokie [7].

Tabela 1. Rozdzielanie jonów metali na wybranych jonitach z kowalencyjnie związanymi ugrupowaniami chelatującymi techniką HPCIC

chelatująca faza stacjonarna	rozdzielane jony	literatura
	HG(II) CU(II)	[15]
	CO, CD, FE, MG, CA, SR, BA, MG, CA, MN, CD, CO, ZN, PB BE	[16] [17] [18] [19]
	NI, ZN, CD, MN, AL., BE, LU, LA	[20]
	NI, ZN, CO, FE, CU, CD, PB	[21]
	BA, SR, CA, MG, NI, CO, ZN, CU, PB, CD, MN	[22]
	lantanowce	[23]
	CU(II)	[24]
	MG, CA, SR, BA, CD, ZN, CO, PB, CU, MN	[25]
	FE, ZN, MN, CD	[26]
	V(IV), MO(VI), W(VI)	[27]

Powszechnie stosowane silne wymiennicze jonowe z grupami sulfonowymi na powierzchni (np. kolumna IonPac CS 5A firmy Dionex, USA) zostają zastępowane bardziej selektywnymi słabymi wymienniczymi jonowymi posiadającymi karboksylowe, fosfonowe,

czy polibutadienomaleinowe (PBDMA) (np. kolumna Metrosep Cation 1-2 firmy Metrohm, Herisau, Szwajcaria) ugrupowania biorące udział w kompleksowaniu. Obok wytwarzania nowych faz stacjonarnych kolejnym trendem w dziedzinie wyso-

kosprawnej chromatografii jonowej kationów metali jest stosowanie nowych reagentów do derywatyzacji pokolumnowej (PCR) umożliwiających czułą detekcję i wykrywalność na poziomie co najmniej ppb. Wszystkie te osiągnięcia sprawiają, że HPCIC

stała się konkurencyjną metodą dla większości metod spektroskopowych (w tym spektrometrii masowej ze wzbudzeniem w indukowanej plazmie ICP-MS).

## 2. Wypełnienia do kolumn w HPCIC

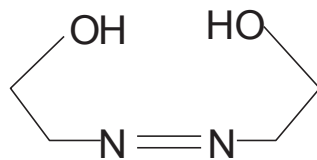
Podstawowymi parametrami decydującymi o efektywnym rozdzielaniu jonów w HPCIC są kinetyka adsorpcji jonów, selektywność oddziaływań ugrupowań kompleksujących z oznaczanymi jonami oraz trwałość tworzących się kompleksów chelatowych. Pozostałe parametry takie jak temperatura, pH fazy ruchomej, dodatek organicznych rozpuszczalników jako modyfikatorów fazy ruchomej są również istotne, ale nie są przedmiotem niniejszego przeglądu. Wybór chelatującego ligandu w przygotowaniu fazy stacjonarnej musi opierać się na znajomości w/w parametrów. Z uwagi na elektrostatyczne oddziaływania jonów z powierzchnią chelatującej fazy stacjonarnej, szybszą kinetykę obserwuje się dla ugrupowań posiadających ujemny ładunek. Większość materiałów wypełnień do kolumn w HPCIC zawiera jonity z grupami aminowymi, iminofosfonowymi, czy polikarboksylowymi (tabela 1).

### Metody otrzymywania jonitów chelatujących

Jedną z metod otrzymywania wypełnień do kolumn w HPCIC jest impregnacja żywicy PS-DVB, która zwykle jest używana, jeśli ligandem jest substancja posiadająca kilka pierścieni aromatycznych



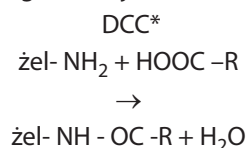
w swej strukturze. Wówczas takie substancje są silnie zatrzymywane na powierzchni polimerycznego nośnika dzięki kombinacji oddziaływań hydrofobowych oraz  $\Pi - \Pi$ . Jednakże, ze względu na duże rozmiary ligandów zdolność rozdzielania jest w znacznym stopniu ograniczona. Dużo bardziej wydajne są materiały powstałe poprzez dynamiczne impregnowanie cząsteczkami chelatującymi o mniejszych rozmiarach, takich jak kwas pikolinowy (o-pirydyno-karboksyłowy) i jego pochodne. Chociaż w porównaniu z uprzednio wspomnianymi sorbentami wspomniane materiały mają zwiększoną zdolność rozdzielania, wadą ich jest mała stabilność. W przypadku używania takich faz stacjonarnych istnieje konieczność dodatku takich samych odczynników chelatujących do fazy ruchomej, aby utrzymać dynamicznie stabilną warstwę na powierzchni wypełnienia kolumny chromatograficznej. Jak wykazano w pracach [8, 9] nośnik polimeryczny może zostać zastąpiony modyfikowanym żel krzemionkowym. W badaniach własnych stosowałam LiChroprep-NH<sub>2</sub> (żel krzemionkowy z ugrupowaniami aminopropylowymi), na którego powierzchni immobilizowano następujące sulfonowane odczynniki chelatujące: kalkon -granat eriochromowy R - C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>SNa (sól sodowa kwasu 3-hydrokso-4-(2-hydrokso-1-naftylazo)-1-naftalenosulfonowego) oraz kalces - kwas kalkonokarboksyłowy (CCA)- C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S(kwas 2,2'-dihydrokso-4'-sulfo-1,1'-azo-naftaleno-3-karboksyłowy).



Rys.1. Ugrupowanie dihydroksyazowe

Zarówno kalkon jak i kalces należą do grupy związków orto, orto'-dihydroksyazowych, w których występuje ugrupowanie zdolne do chelatowania jonów wielu metali (rys.1).

W wyniku poniższej reakcji tworzy się wiązanie amidowe pomiędzy odczynnikiem chelatującym, a nośnikiem powstającego w ten sposób wypełnienia kolumny chromatograficznej:



\*- DCC (dicykloheksylokarbodiimid) jest popularnym odczynnikiem odwadniającym oraz katalizatorem w powyższej reakcji [10, 11].

Należy podkreślić, że sorbenty chelatujące powstałe na podłożu krzemionkowym wykazują dość dobrą kinetykę tworzenia i dysocjacji kompleksów z jonami metali, ale niestety są niestabilne przy stosowaniu roztworów o wyższych wartościach pH. Lepsze w tym przypadku wydają się być sorbenty na podłożu PS/DVB, ponieważ cząstki polimerowej matrycy nie pęcznieją w organicznych rozpuszczalnikach, są sztywniejsze (im większe jest usieciowanie) i odporne na wysokie wartości pH.

Warto wspomnieć w tym miejscu o zastosowaniu eterów koronowych przyłączanych zarówno do krzemionki jak i do polimerowego podłoża. Etery koronowe są to makrocycliczne ligandy z wewnętrzną hydrofilową i zewnętrzną hydrofobową przestrzenią. Tworzą one stabilne kompleksy poprzez utworzenie koordynacyjnych połączeń z wnątką eteru. Chromatograficzne możliwości takich faz stacjonarnych opierają się na zdolności kompleksowania kationów o różnych rozmiarach, a selektywność takiej fazy jest determinowana między innymi rozmiarami luki, jaką posiadają w swej cząsteczce etery koronowe [12]. Stanowią one bardzo selektywne ligandy, ponieważ zmieniając rozmiar i topologię ich układów cyklicznych można wybiórczo kompleksować określony jon. Etery koronowe są stosowane jako składniki zarówno fazy ruchomej jak i stacjonarnej (fizyczna adsorpcja bądź chemiczne wiązanie z nośnikiem, np. żelem krzemionkowym lub polimerem). Nowością wśród faz stacjonarnych do HPCIC z kowalencyjnie związanymi ligandami chelatującymi są fazy oparte na monolitycznych nośnikach [12, 13]. Stosowanie kolumn monolitycznych do analizy jonów stanowi istotny postęp w technologii kolumn chromatograficznych w ostatnich latach. Wprowadzenie porowatych kolumn monolitycznych do chromatografii cieczowej wniosło nowe możliwości znaczącego zredukowania czasu analiz chromatograficznych. W porównaniu do tradycyjnej

technologii kolumn, monolity umożliwiają istotne obniżenie ciśnienia potrzebnego do przeprowadzenia fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną. Zasadniczą zaletą wypełnień monolitycznych jest znaczące poprawienie szybkości analizy (dzięki wyskokoporowatej strukturze złoża zwiększony przepływ fazy ruchomej nie powoduje znacznego wzrostu ciśnienia na kolumnie) wraz ze zwiększeniem rozdzielczości pików. Można wyróżnić zasadniczo dwa główne typy monolitycznych faz stacjonarnych używanych w chromatografii jonowej:

- monolityczne fazy oparte na żelu krzemionkowym (głównie fazy chemicznie związane z uwagi na mniejszą „wrażliwość” pokrycia na zmiany eluentu czy temperatury w porównaniu z fazami dynamicznie modyfikowanymi)

- polimery organiczne (szczególnie użyteczne w rozdzielaniu anionów z uwagi na swoją stabilność w wysokim zakresie pH, łatwość przygotowania oraz wysoką przenikalność eluentu poprzez porowate złożo, a więc możliwość znacznego zwiększenia szybkości przepływu).

Fazy oparte na nośnikach monolitycznych są coraz powszechniej używane w wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej. Niestety w dziedzinie HPCIC można znaleźć nieliczne przykłady stosowania takich faz, ale biorąc pod uwagę zalety szybkich analiz należy przypuszczać, że technologia takich faz będzie się rozwijać.

Tabela 2. Wybrane zastosowania HPCIC w analizie jonów metali w próbkach o złożonej matrycy

zastosowanie	faza stacjonarna	faza ruchoma	detekcja	literatura
PB, CD, CU w mące ryżowej	PS-DVB dynamicznie pokryty kwasem 4-chlorodipikolinowym	1 MOL/DM <sup>3</sup> KNO <sub>3</sub> , 0,25 MOL/DM <sup>3</sup> kwas 4-chlorodipikolinowy	PCR, PAR, 520 NM	[34]
CU, ZN, CO, MN, CD w tkankach ostryg (NIST SRM 1566A, woda morska)	γ-aminobutyrohydroksamowy na polimerycznym nośniku	0,025 MOL/DM <sup>3</sup> kwas szczawiowy, 0,025 MOL/DM <sup>3</sup> azotan (V) sodu	PCR, PAR, 510 NM	[26]
MG i CA w zasolonej wodzie morskiej, próbkach kopalnianych	porowaty węgiel grafityzowany dynamicznie pokryty chlorkiem ORTO-CETYLOPIRYDYNY (O-CPC)	45 – 58 % MEOH, 0,004 MOL/DM <sup>3</sup> O-CPC	VIS, 575 NM	[35]
MG, MN, CD, ZN, PB w solankach	błękit metylotymolowy (MTB) osadzony na polimerycznym nośniku	0,5 MOL/DM <sup>3</sup> KNO <sub>3</sub> z dodatkiem 0002 MOL/DM <sup>3</sup> MTB	VIS, 600 NM	[36]
BE w osadach potoków	żel krzemionkowy z chemicznie związanym kwasem aminometylofosfonowym	1 MOL/DM <sup>3</sup> KNO <sub>3</sub> , 0,5 MOL/DM <sup>3</sup> HNO <sub>3</sub> , 0,08 MOL/DM <sup>3</sup> kwas askorbinowy	PCR, chromoazuroł S(CAS), 560 NM	[19]
CU, MN, CD, CO, ZN w zmineralizowanych grzybniach shiitake	10 μM LICHROPREP-NH <sub>2</sub> z chemicznie związanym kwasem kalkonokarboksylovym (CCA)	0,008 MOL/DM <sup>3</sup> kwas szczawiowy, 0,001 MOL/DM <sup>3</sup> wodorotlenek tetrametyloamoniowy (TMAH), 0,05 MOL/DM <sup>3</sup> KOH	PCR, 0,0005 MOL/DM <sup>3</sup> PAR, 1,0 MOL/DM <sup>3</sup> 2-dimetyloaminoetanol, 0,50 MOL/DM <sup>3</sup> NH <sub>4</sub> OH, 0,3 MOL/DM <sup>3</sup> NAHCO <sub>3</sub>	[37]

Nowe osiągnięcia w dziedzinie monolitycznych faz stacjonarnych do chromatografii jonowej kationów dotyczą zastosowania monolitycznej fazy stacjonarnej opartej na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami kwasu iminodioctowego (IDA) do rozdzielania kationów metali lekkich oraz niektórych kationów metali przejściowych. Zastąpienie tradycyjnego wypełnienia (żelu krzemionkowego pokrytego grupami IDA) monolitycznym złożem z tymi samymi ugrupowaniami prawie sześciokrotnie skróciło czas analizy kationów Mn, Cd, Zn oraz Pb, które w odróżnieniu od fazy nie-monolitycznej uległy całkowitemu rozdzielaniu na monolitycznej fazie [13].

Surgue i Nesterenko porównali rozdzielanie jonów wapnia i magnezu zawartych w 1 molowym roztworze KCl na dwóch fazach stacjonarnych zawierających jednakowe ugrupowania IDA na powierzchni nośników typu żel krzemionkowy [14]. Monolityczna faza stacjonarna (kolumna o długości 10 cm) pozwoliła na rozdzielanie ww. jonów do linii bazowej w czasie krótszym niż 1 minuta, czyli 5-krotnie szybciej niż na fazie stacjonarnej o rozmiarze ziaren 8 μm (kolumna o długości 25 cm).

### 3. Detekcja w HPCIC

Chociaż już w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku stosowano wiele odczynników tworzących w reakcjach kolorymetrycznych barwne

połączenia z jonami metali, tylko niektóre z nich w pełni nadawały się jako reagenty do pokolumnowej derywatywacji (PCR) umożliwiającej detekcję spektrofotometryczną. Na przeszkodzie stały zbyt wolne tworzenie połączeń kompleksowych oraz ich słaba rozpuszczalność w wodzie. W latach siedemdziesiątych Fritz i Story [28] zastosowali 4-(2-pirydylo)rezorcynol (PAR), który należy obecnie do najczęściej stosowanych reagentów PCR w chromatografii jonowej. PAR tworzy barwne połączenia z licznymi metalami (w tym Zn, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Cd i Pb). Dodatek ZnEDTA do PAR pozwala poprawić detekcję dla Mg, Ca, Sr i Ba. Dla lantanowców i aktynowców lepsze okazały się odczynniki

eliminujące ryzyko ewentualnego wytracania, takie jak Arsenazo I lub Arsenazo III [29, 30].

Molowy współczynnik absorpcji wynosi dla PAR  $7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy dla pochodnych PAR, np. 2-(5-nitro-2-pirydylo)-5-(N-propylo-N-sulfopropylamino)fenolu (Nitro-PAPS) wynosi  $1,2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Pomimo tego stosowanie takich pochodnych do derywatywacji pokolumnowej nie jest zbyt częste co wiąże się z wysokimi kosztami produkcji takich pochodnych.

Problem rozpuszczalności organicznych reagentów do PCR może być rozwiązany dzięki dodatkom środków powierzchniowoczynnych (SPC) tworzących micelle, takich jak



chlorek cetylopirydyny (CPC), czy niejonowy polioksyetyleno-t-oktylofenol (Triton X-100). Micele SPC solubilizują formy hydrofobowe, a także reagują z formami jonowymi. Dodatek niewielkiej ilości (0,5 – 2,0 %) CPC do oranżu ksylenolowego poprawił aż trzykrotnie absorbancję przy oznaczaniu lantanowców [31]. Częstym problemem jest także obecność tzw. szumów linii bazowej mających istotny wpływ na oznaczalność i wykrywalność poszczególnych analitów. Obecnie, aby poprawić granicę wykrywalności stosowane są między innymi elektroniczne metody filtrowania sygnału (ang. *electronic filters*) mające na celu wzmac-

nianie sygnału na wyjściu detektora przed przesłaniem go do integracji komputerowej. Operator (analityk) dokonuje wyboru stałej czasowej mającej wpływ na wygląd linii bazowej i pików. Alternatywną opcją są komputerowe oprogramowania posiadające możliwości tłumienia szumów linii bazowej w trakcie lub po zakończeniu analizy. Specjalne algorytmy stosowane do „wygładzania” linii bazowej chromatogramów dostępne są w większości oprogramowań sterujących chromatografami jonowymi.

Szczególne znaczenie dla poprawności analiz mają odpowiednie konstrukcje pomp, w których zastępowane są

tłoki pracujące z niższą częstotliwością, na tłoki pracujące z większą częstotliwością. Coraz szybsze analizy wymagają niekiedy bardzo wysokich prędkości przepływu faz ruchomych. Sytuacja jeszcze bardziej komplikuje się, gdy detekcja jest poprzedzona derywatyzacją pokolumnową, ponieważ poziom szumów ulega wzmocnieniu (2 pompy zamiast jednej). Ostatnio firma JPP Chromatography UK zastosowała specjalny elektroniczny ekstraktor sygnałów (JPP SES 203 system) oparty na zaprogramowanych mikroprocesorach niejako odnajdujących sygnał analitu spośród szumów mających swe źródło nie tylko w pracy pompy [32].

Rozwiązanie to umożliwiło analizę metali o stężeniach od 0,5 do 4 ppb na chelatującej fazie stacjonarnej (żel krzemionkowy z grupami kwasu iminodiocetowego) z użyciem derywatywacji pokolumnowej PAR/NH<sub>3</sub>.

#### 4. Nowe zastosowania HPCIC w śladowej analizie metali

Od lat chromatografia jonowa coraz silniej wkracza na pole analizy próbek biologicznych, klinicznych, o skomplikowanej, złożonej matrycy. Termin „złożona matryca” próbki dotyczy głównie roztworów o dużej sile jonowej, względnie roztworów zawierające duże dysproporcje pomiędzy stężeniem oznaczanego jonu

## METTLER TOLEDO

### W naszej ofercie:

- mikrowagi
- wagi analityczne, precyzyjne i przemysłowe
- komparatory
- wagosuszarki
- pH-/jonometry i elektrody
- pipety automatyczne
- aparaty do miareczkowania
- systemy analizy termicznej
- gęstościomierze, refraktometry, wiskozymetry
- automatyczne reaktory laboratoryjne
- systemy pomiarowe pH-/Redox, O<sub>2</sub>, przewodności, zmętnienia

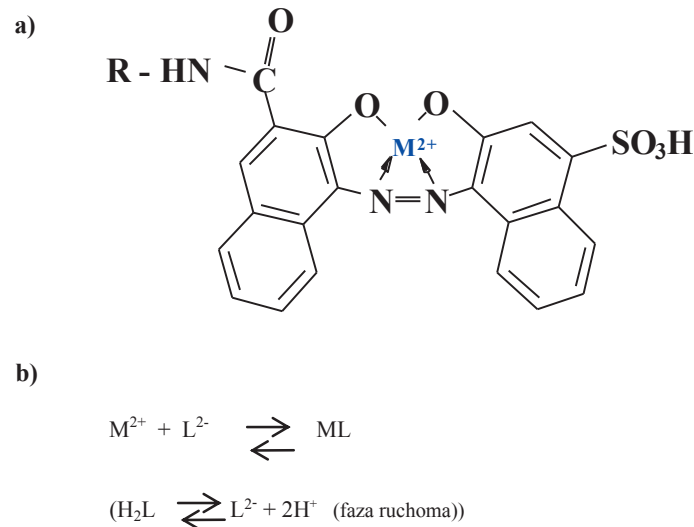


Mettler-Toledo Sp. z o.o., 02-822 Warszawa, ul. Poleczki 21  
tel. (22) 545 06 80; fax (22) 545 06 88  
e-mail: Polska@mt.com, [www.mt.com](http://www.mt.com)



Zadzwoń, dowiesz się więcej: 601 77 50 47

(jonów) a stężeniem innych jonów obecnych w próbce. Próbkę biologiczną zawierającą zwykle duże ilości materii organicznej (np. białek o dużych rozmiarach cząsteczek), a małe ilości jonów nieorganicznych bądź jonów organicznych, ewentualnie próbki niewodne należą również do tej grupy [33]. Analiza takich próbek uważana jest jako trudna, ponieważ natura analitów i składników matrycy może być zmienna (poprzez zmianę choćby wartości pH, czy czasu przechowywania próbek). Dodatkową komplikację stanowią nakładające się wzajemnie różne mechanizmy retencji, np. do jonowymennego mechanizmu retencji dokłada się niekiedy jonowykluczanie, wzajemne oddziaływania hydrofobowe, etc. Zwykle próbki biologiczne zawierają znaczne ilości magnezu i wapnia, co ma duże znaczenie przy jednoczesnym oznaczaniu niewielkich ilości jonów metali przejściowych. Dzięki stosowaniu chelatujących faz stacjonarnych oraz faz ruchomych zawierającymi kompleksujące odczynniki znacząco poszerzają się możliwości wyboru selektywnego układu chromatograficznego. Dużą zaletą HPCIC jest możliwość oznaczania analitów w bardzo stężonych roztworach soli, co byłoby znacznie utrudnione gdyby rozdzielanie odbywało się tylko dzięki wymianie jonowej. W badaniach własnych zastosowałam opisaną wcześniej fazę stacjonarną (LiChroprep-NH<sub>2</sub> z chemicznie związanym kwasem kalkonokarboksylowym (CCA)) do analizy wy-



Rys. 2. Oddziaływania pomiędzy jonami oznaczanego metalu ( $M^{2+}$ ), a- faza stacjonarna ze związanym jonem metalu ( $R$  - pozostały fragment otrzymanego sorbentu), b- kompleks jonu metalu z ligandem z fazy ruchomej ( $L^{2-}$ )

branych metali przejściowych w zmineralizowanych grzybnicach Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.)). Zastosowany przeze mnie wariant chromatografii jonowej oparty jest na tworzeniu kompleksów jonów oznaczanych metali z ugrupowaniem chelatującym fazy stacjonarnej oraz tworzeniu kompleksów tych jonów z odczynnikami chelatującymi, wchodzącymi w skład fazy ruchomej (np. kwas pirydynodikarboksylowy (PDCA) (rys. 2)).

Zastosowana faza ruchoma (0,008 mol/dm<sup>3</sup> kwas szczawiowy, 0,001 mol/dm<sup>3</sup> wodorotlenek tetrametyloamoniowy (TMAH), 0,05 mol/dm<sup>3</sup> KOH; pH= 4,7 ± 0,1) zawierała znaczne ilości jonów potasu, które neutralizują miejsca wymiany jonowej. Istotne jest również to, aby stężenie ligandu w eluencie nie przekroczyło poziomu, który uniemożliwiłby późniejszą derywatyzację i detekcję. Niektóre kwasy karboksylowe

(np. kwas pirydynodikarboksylowy) tworzą bardzo trwałe kompleksy z jonami metali, dlatego stężenie tych kwasów w fazie ruchomej nie powinno być zbyt duże, ponieważ reagent derywatyzujący (PAR) musi mieć możliwość utworzenia kompleksów z jonami analizowanych metali.

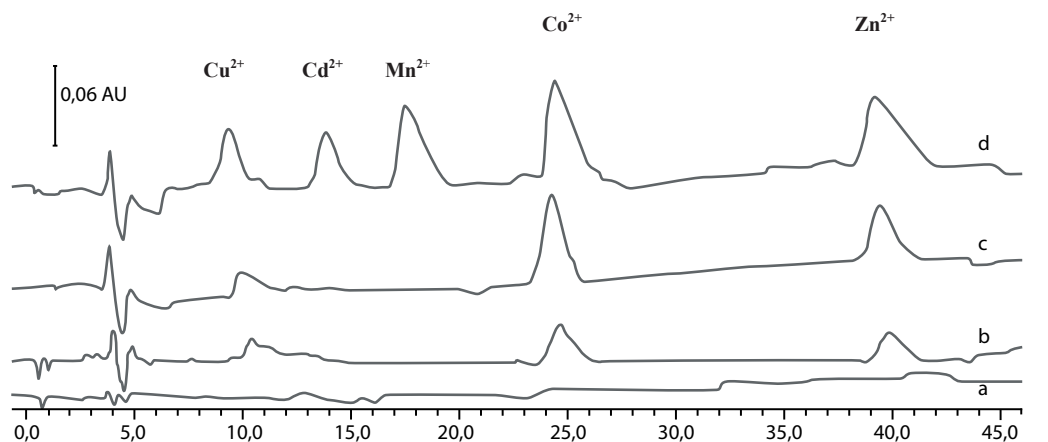
Stabilność kompleksu między chelatującym ligandem a jonem określonego metalu zależy m.in. od składu i wartości pH eluentu. Wraz ze zmniejszeniem tej wartości zmniejsza się wartość warunkowej stałej trwałości takiego kompleksu, a tym samym krótszy jest czas retencji jonów tego metalu i węższy pik na chromatogramie. Wynika to z faktu, że im niższa jest wartość pH, tym większa jest szybkość dysocjacji utworzonego kompleksu. Dlatego mniejsze wartości pH eluentu są wymagane dla kompleksów metali o dużych wartościach stałych trwałości. Jednak jak dotąd nie jest jeszcze dostatecznie potwier-

dzone, czy lepsze rozdzielanie można uzyskać stosując niższe wartości pH eluentu dla trwałszych chelatów, czy wyższe wartości pH w odniesieniu do chelatów mniej trwałych [38]. Często w HPCIC piki na chromatogramie są zazwyczaj dużo szersze w porównaniu z pikami uzyskanymi w innych wariantach chromatografii jonowej. Poszerzenie piku, a więc spadek sprawności układu może wynikać z opisanej powyżej powolnej kinetyki procesów kompleksowania, a także możliwości występowania analitu w różnych postaciach (tzn. różnych formach kompleksów). Jeżeli równowaga kompleksowania ustala się szybko w porównaniu z migracją na kolumnie, wtedy nie ma obawy pojawiania się kilku pików odpowiadających jednemu analitowi, bądź piku o zbyt szerokiej podstawie.

Rys. 3 przedstawia przykładowe chromatogramy uzyskane podczas analizy próbek grzybnicy Shiitake na kolumnie Lichroprep-NH<sub>2</sub> związanej z CCA (4,6 mm x 150 mm) [37].

## 5. Podsumowanie

Niniejszy przegląd wybranych osiągnięć wysokosprawnej chromatografii jonowej, której mechanizm rozdzielania związany jest z tworzeniem chelatów na fazie stacjonarnej (ewentualnie także w fazie ruchomej) pokazuje w jakim kierunku zmierzają obecnie analizy substancji o charakterze jonowym. Dokładniejsze poznanie wzajemnych oddziaływań analitów z fazami układu chromatograficznego pozwoliło na selektywny dobór odpowiednich odczynni-



Rys. 3. Rozdzielanie badanych jonów metali na kolumnie Lichroprep-NH<sub>2</sub> związanej z CCA (4.6 mm x 150 mm), a - ślepa próba (woda dejonizowana, 18 MΩcm), b - chromatogram próbki grzybni prekursorowanej selenem, c - chromatogram próbki grzybni prekursorowanej selenem i wzbogaconej kobaltem, d - chromatogram mieszaniny wzorcowej (szczegółowe warunki chromatograficznego rozdzielania jonów metali podaje praca [37]).

ków chelatujących, dzięki którym powstają nowe materiały wypełnienia kolumn. HPCIC to technika pozwalająca obecnie na rozdzielanie jonów w próbkach o dość złożonych matrycach – w tym biologicznych. Jeszcze do niedawna analiza próbek takich jak silnie zasolone wody była również dość dużym wyzwaniem w chromatografii jonowej. Obecne kolumny do HPCIC w połączeniu z selektywnymi odczynnikami do derywatacji pokolumnowej pozwalają na znaczne obniżenie granicy wykrywalności, a poprzez odpowiednie sposoby zmniejszania szumów możliwa jest detekcja na poziomie porównywalnym z bardzo czułymi technikami spektroskopowymi. Wysokosprawna chromatografia jonowa z chelatującymi fazami stacjonarnymi wnosi ogromną różnorodność w analizie substancji o charakterze jonowym, a przez to ułatwia dokonanie wyboru optymalnych warunków do ich rozdzielania.

#### Literatura

1. P. R. Haddad, P. E. Jackson, Ion Chromatography, Principles and Applications, Journal Chromatogr. Lib., 46, Elsevier, Amsterdam, 1990.
2. R. Bering, Chelatbildende Ionenaustausher, Akademie Verlag, Berlin (1967) 267.
3. L. J. Morris, Chem. Ind. (Lond.), 27 (1962) 1238.
4. H. Small, T. S. Stevens, W. C. Baumann, Anal Chem, 47 (1975) 1801.
5. R. Dybczyński, Z. Hubicki, K. Kulisa, Solvent Extraction and Ion Exchange, 6 (1988) 699.
6. P. Jones, G. Schwedt, J. Chromatogr. 482 (1989) 325.
7. P. N. Nesterenko, P. Jones, J. Chromatogr. 770 (1997) 129.
8. R. Kocjan, A. Błażewicz, D. Matosiuk, Mikrochim. Acta, 144 (2004) 221.
9. R. Kocjan, A. Błażewicz, E. Blicharska, J. Sep. Sci., 25 (2002) 891.
10. J. Minczewski, J. Chwastowska, R. Dybczyński, Analiza śladowa, WNT, Warszawa 1973.
11. A. Błażewicz, R. Świeboda,

- R. Kocjan, Chem. Anal. (Warsaw) 51 (2006) 307.
12. E. Sugrue, P. N. Nesterenko, B. Paull, J. Sep. Sci., 27 (2004) 921.
13. E. Sugrue, P. N. Nesterenko, B. Paull, J. Chromatogr. A, 1075 (2005) 167.
14. E. Sugrue, P. N. Nesterenko, B. Paull, Analyst, 128 (2003) 417.
15. M. Foltin, S. Megova, T. Prochackova, M. Steklac, J. Radioanalyt. Nucl. Chem. 208 (1996) 295.
16. A. Haidekker, C. Huber, J. Chromatogr. 921 (2001) 217.
17. W. Bashir, B. Paull, J. Chromatogr. 907 (2001) 191.
18. W. Bashir, B. Paull, J. Chromatogr. 942 (2002) 73.
19. W. Bashir, B. Paull, J. Chromatogr. 910 (2001) 301.
20. M. J. Shaw, S. J. Hill, P. Jones, P. N. Nesterenko, J. Chromatogr. A, 876 (2000) 127.
21. P. N. Nesterenko, O. S. Zhukova, O. A. Shpigun, P. Jones, J. Chromatogr. A, 813 (1998) 47.
22. P. N. Nesterenko, M. J. Shaw, S. J. Hill, P. Jones, Microchem. J., 62 (1999) 58.

23. R. Garcia-Valls, A. Hrdlicka, J. Peruka, J. Havel, N. V. Deorkar, L. L. Tavlarides, M. Munoz, M. Valiente, Anal. Chim. Acta, 439 (2001) 247.
24. N. R. Sumskeya, Y. V. Kaolin, V. N. Zaitsev, Zhurnal Fizicheskoi Khimii, 71 (1997) 905.
25. P. A. Kebets, K. A. Kuzmina, P. N. Nesterenko, Russ. J. Phys. Chem., 76 (2002) 1481.
26. C. Y. Liu, N. M. Lee, J. L. Chen, Anal. Chim. Acta, 369 (1998) 225.
27. C. Y. Huang, N. M. Lee, S. Y. Lin, C. Y. Liu, Anal. Chim. Acta, 466 (2002) 161.
28. J. S. Fritz, J. N. Story, Anal. Chem. 46 (1974) 825.
29. R. M. Cassidy, Chem. Geol, 67 (1988) 185.
30. V. T. Hamilton, W. Dalespall, B. F. Smith, E. J. Peterson, J. Chromatogr. A, 469 (1989) 369.
31. E. A. Gautier, R. T. Gettar, R. E. Servant, D. A. Batistoni, J. Chromatogr. A, 770 (1997) 75.
32. www.jppchromatography.co.uk
33. A. Błażewicz, Work & Studies, Prace i Studia, 70 (2007) 55.
34. M. J. Shaw, P. Jones, P. N. Nesterenko, J. Chromatogr. A, 953 (2002) 141.
35. B. Paull, M. Macka, P. R. Haddad, J. Chromatogr. A, 789 (1997) 329.
36. B. Paull B., P. N. Nesterenko, M. Nurdin, P. R. Haddad, Anal. Commun. 35 (1998) 17.
37. A. Błażewicz, J. Turło, R. Kocjan, Fresenius. Env. Bull. - w druku.
38. P. Jones, P. N. Nesterenko, J. Chromatogr. A 789 (1997) 413.

\*Dr Anna Błażewicz, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Chemii Analitycznej Katedry Chemii, Lublin