

## CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA (IexchC) / JONOWA (IC) - SKRÓT ZASAD -

Zastosowanie: rozdzielanie i oznaczanie nieorganicznych, albo organicznych kationów, albo/i anionów, w tym, kwasów karboksylowych, hydroksy-kwasów, keto-kwasów, aminokwasów, peptydów, białek, nukleotydów, amin, alkanoloamin, zasad aromatycznych i innych wysoce polarnych, tworzących trwałe jony, jonizowalnych albo trwale polaryzowalnych substancji nieorganicznych / organicznych. Podstawowym warunkiem, by miało miejsce rozdzielanie jonowymienne, jest to, by wszystkie elementy układu rozdzielczego były w stanie dysocjacji elektrolitycznej, czyli w postaci jonowej (!)

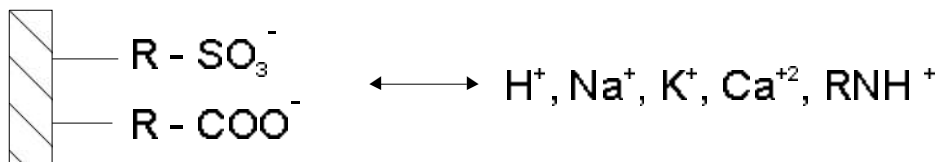
To dotyczy:

- powierzchni sorpcyjnej o charakterze jonowymiennym,
- jonowej formy składników rozdzielanej mieszaniny oraz
- jonowej formy, tzw. przeciw-jonów, będących składnikami eluentu, "konkurującymi" na powierzchni jonowymiennej (sorpcyjnej) z jonami rozdzielanej mieszaniny.

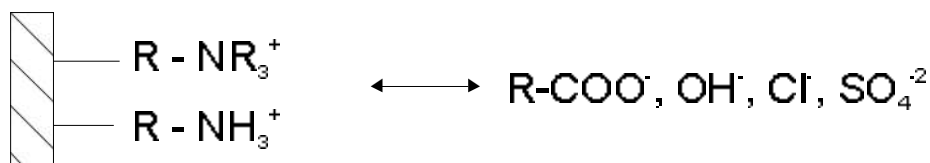
W przypadku wykorzystywania do rozdzielania substancji makromolekularnych należy zapewnić odpowiednią wielkość porów wymiennicza jonowego (sorbentu) w zakresie „ 100 - 120 Å” (12nm), do M do ok. 10000 Da (średnia średnica porów sorbentu ok. 10 nm) oraz najczęściej, średnio ok. 250 Å (25nm), gdy masa molekularna największych jonów przekracza 10 000 Da, i sięga nawet ok. 0.5 mln Da.

### 1. Typy wymienniczy jonowych:

- a) Kationit (kwas związany na powierzchni wypełnienia kolumny), mocny, średni, albo słaby  
- konkurencyjne oddziaływania z kationami:



- b) Anionit (zasada związana na powierzchni wypełnienia kolumny), mocny, średni, albo słaby  
- konkurencyjne oddziaływania z anionami:

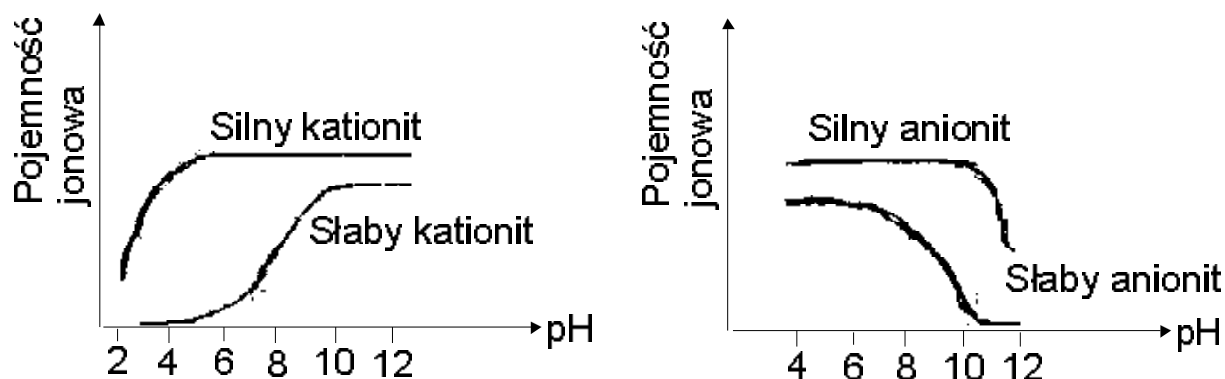


- c) wymiennicze jonów będące jednocześnie kationitami i anionitami, niekiedy, z dodatkowymi oddziaływaniami sorpcyjnymi, np. jednocześnie RP i IExch, np. SDVB-C18/RSO<sub>3</sub>H, lub typu ZIC-HILIC itp.

### 2. Pojemność jonowa i zakres pH dysocjacji elektrolitycznej powierzchni silnych / słabych wymienniczy jonowych.

Pojemność jonowa wymiennicy jonowych do wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej powinna być niewielka, w przeliczeniu na jednostkę powierzchni sorpcyjnej wymiennicy jonowego. Gdy jest wysoka, piki są bardzo asymetryczne i rozdzielczość ( $R_{j/i}$ ) jest niewielka (!) Zakres pH, w którym określony jonit posiada w pełni zdysocjowaną powierzchnię jonowymienną, z przy okazji pojemność jonowa wymiennicy jonowego może zostać łatwo określona za pomocą zwykłego miareczkowania alkacymetrycznego, gdy o odpowiednio:

- anionit zostanie przeprowadzony do postaci zasady za pomocą przemywania eluentem w formie roztworu wodnego NaOH, albo NaHCO<sub>3</sub>, albo alkanolo aminy, a następnie zostanie powoli wykonane miareczkowanie alkacymetryczne zostanie dokonane w warunkach mieszania, za pomocą mianowanego rozcieńczonego roztworu wodnego mocnego kwasu, np. HCl,
- kationit zostanie doprowadzony do postaci "sprotonowanej" za pomocą przepłukiwania roztworem mocnego kwasu, np. HCl, albo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a następnie zostanie wykonane miareczkowanie mianowanym rozcieńczonym roztworem wodnym zasady, np. NaOH, NaHCO<sub>3</sub>, MEA (monoetanoloaminy) itp. Poniżej naszkicowano odpowiednie krzywe miareczkowania, dla silnych / słabych kationitów / anionitów. Widać z nich też, że powierzchnia mocnych jonitów są w stanie zdysocjowanym w szerokich zakresach pH, jednak, słabe jonity są w postaci zdysocjowanej elektrolitycznie tylko w określonych zakresach pH, podobnie, jak odpowiednie słabe kwasy / zasady. Słaby kationit w zakresie wysokich wartości pH, słaby anionit w zakresie niskich.



1. Szeregi eluotropowe w kierunku malejącej siły elucyjnej przeciw-jonu (kolejność szczegółowa zależy od rodzaju wymiennicy jonowego, ale także od rodzaju przeciw-jonu znajdującego się w eluencie):
  - wymiana kationów - często : Ba<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Te<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>
  - wymiana anionów - często: cytrynian, siarczan, szczawian, BO<sub>3</sub><sup>-3</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, Br<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCOO<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, ClO<sup>-</sup>.
3. Na retencję określonych eluowanych jonów ma wpływ:
  - a) typ wymiennicy jonowego, szczególnie jego powierzchnia właściwa i pojemność jonowa,
  - b) rodzaj przeciw-jonu,
  - c) siła jonowa eluentu (*proszę przypomnieć sobie - co oznacza to pojęcie (?)*)
  - d) pH eluentu
4. Reguły ogólne:

- e) wzrost siły jonowej eluentu obniża retencję ( $V_R$ ),
- f) w przypadku wymiany kationów, szczególnie, tworzących średnio mocne i słabe zasady - wzrost pH eluentu ( w zakresie dysocjacji elektrolitycznej składników rozdzielanej mieszaniny oraz przeciw-jonów eluentu ) obniża retencję; wyjątek: słabe wymiennicze kationów lepiej dysocjujące przy wzroście pH
- g) w przypadku wymiany anionów, szczególnie tworzących średnio mocne, albo słabe kwasy, spadek pH eluentu ( w zakresie dysocjacji elektrolitycznej składników rozdzielanej mieszaniny oraz przeciw-jonów eluentu ) obniża retencję; wyjątek: słabe wymiennicze anionów lepiej dysocjujące przy niższym pH
- h) rodzaj przeciw-jonu w/g następujących reguł podwyższa siłę elucyjną eluentu, tzn., obniża retencję rozdzielanych jonów :
  - im wyższy ładunek przeciw-jonu,
  - im wyższa średnica przeciw-jonu,
  - im łatwiej polaryzowalny przeciw-jon
 Odwrotnie będzie z retencją jonów rozdzielanej mieszaniny, która, odpowiednio, będzie wzrastała :
  - im wyższy ładunek jonu,
  - im wyższa średnica jonu,
  - im łatwiej polaryzowalny jon.

#### Zalecenia praktyczne

- i) w warunkach jonowej chromatografii elucyjnej należy wykorzystywać do rozdzielania najwyżej 5% pojemności jonowej kolumny i stosować pH zapewniające dysocjację elektrolityczną fazy stacjonarnej oraz przeciw-jonów eluentu, a także jonów rozdzielanej mieszaniny,
- j) należy stosować stałe pH eluentu ( $\text{pH} \leq \text{pK}_b - 1,5$  , gdy rozdzielamy kationy słabych zasad, lub  $\text{pH} \geq \text{pK}_a + 1,5$  , gdy rozdzielamy aniony słabych kwasów, a siłę elucyjną zmieniać w warunkach elucji gradientowej poprzez zmianę siły jonowej eluentu,
- k) stosować dodatek substancji przeciwgrzybowych do eluentu, aby nie uszkodzić pompy i kolumny: 0.005M  $\text{NaN}_3$ , kwas kapronowy, fenol, krezol;
- l) płukać okresowo część tłoka pompy pracującą wewnątrz uszczelki, gdy składniki eluentu mogą krystalizować !

#### Detekcja w chromatografii jonowymiennej

- m) przewodnictwo elektrolityczne – celowość, a nawet konieczność - supresji jonów !
- n) „zwykła” (dla jonów absorbujących UV-VIS), albo "odwrotna detekcja UV - VIS",
- o) przydatność detektora RI (w warunkach elucji izokratycznej i stężeń w jonów mieszaninie dozowanej do kolumny HPLC na poziomie powyżej ok. 100 ppm )

#### Alternatywy dla chromatografii jonowymiennej:

- p) chromatografia par jonowych z kolumnami: C18, PHENYL

- q) cofanie dysocjacji słabych kwasów lub zasad i wykorzystanie układów faz odwróconych (RP)
- r) stosowanie warunków wykluczania jonowego (*rozdzielanie słabych kwasów, zasad organicznych, nieorganicznych*)

Przykłady substancji tworzących pary jonowe - kwasy alkilo-sulfonowe, albo arylo-sulfonowe, zasady alkilo-amoniowe, albo arylo-amoniowe (*korzystnie „alkilo-„ - nie absorbują UV od 200 nm wzwyż*).

### Uwagi:

Kolumny do jonowej chromatografii DIONEX, czy METHROM są wykonane z zastosowaniem specjalnych technologii, co powoduje, że - co kolumna np. AS7 AS 9, AS11, ... / CA, 14, CA 18, ..., to inne nieco oddziaływania elektrostatyczne, ale też inne oddziaływania hydrofobowe oraz adsorpcyjne, zwłaszcza typu wykluczania jonowego. W konsekwencji te same jony zmieniają pozycję, nawet eluowane tym samym eluentem. Dodatkowo, metodyki producentów tych kolumn, raz przewidują NaOH, raz NaHCO<sub>3</sub>, raz Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / raz kwas alkilosulfonowy, raz arylosulfonowy, ... , jako główny przeciw-jon, odpowiednio w warunkach aniono- / kationowymiennych. Wówczas ogólne reguły co do kolejności elucji poszczególnych jonów, typu :

- im wyżej wartościowy jon, tym większe powinowactwo do powierzchni jonowymiennej,
- im większy, tym większe ...

- im niższe pKa, tym wyższe powinowactwo dla anionów itd.,

obowiązują tylko "ogólnie" i jest wiele wyjątków, które nie jest łatwo wytłumaczyć, ponieważ struktura powierzchni sorpcyjnej, ani technologia jej tworzenia nie jest ujawniana. Zawsze, natomiast, obowiązuje reguła - im większa siła jonowa eluentu, tym wyższa jego siła elucyjna!

Znacznie bardziej jednoznacznie obowiązują w/w reguły w przypadku kolumn jonowymiennych, gdy fazą stacjonarną do związania grup funkcyjnych jonowymiennych jest żel krzemionkowy, ale i tu są odstępstwa, zależnie od tego, jaka grupa funkcyjna jest bezpośrednio związana z SiO<sub>2</sub>, szczególnie, czy jest to grupa oksy-alkilowa, czy oksy-alkilo-arylowa. Co też nie jest przez producentów ujawniane. W konsekwencji, zwłaszcza w przypadku rozdzielania jonów organicznych oraz stosowania tychże jako przeciw-jony, oprócz oddziaływań jonowymiennych trzeba brać pod uwagę oddziaływania hydrofobowe z alkilowymi / aryłowymi fragmentami jonów oddziaływującymi z powierzchnią jonowymienną. Np. było to widoczne w moich badaniach do publikacji o rozdzielaniu alkanolo-amin i kationów NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> oraz zasad organicznych spod "pochodni". W każdym razie, bez dodatku AcCN lub MeOH do eluentu, BDEA (butylo - dietylo-alkanoloamina ) jest ostatnim pikiem w kolumnie typu SA - mocny kationit na bazie żelu krzemionkowego ze związanym chemicznie kwasem arylo-sulfonowym. Jest tak, gdy eluent nie zawiera dodatku organicznego, mimo, że BDEA jest najsłabszą "zasadą" spośród rozdzielanych n/w alkanolo-amin. Natomiast, z dodatkiem ok. 10% MeOH, lub ok. 7% AcCN do eluentu, BDEA, która jest najbardziej hydrofobowa spośród MEA (monoetanoloaminy), DEA (dietanoloaminy), MDEA metylo-dietanoloaminy) - jest eluowana przed MEA.

W przypadku studentów, wyjaśniających kolejność elucji w warunkach jonowymiennych, ważne by było, by - oprócz podania kolejności elucji jonów rozdzielanej mieszaniny - podali argumentację, dotyczącą, wyboru przeciw-jonu, wartości pH oraz stężenia buforu w eluencie, siły jonowej eluentu oraz uzasadnili sugerowaną kolejność elucji poszczególnych jonów rozdzielanej mieszaniny. Należy, dodać, że zaproponowanie warunków, gdy jakiś składnik jonowymiennego układu rozdzielczego, ma "cofniętą" dysocjację elektrolityczną, jest błędem podstawowym.