

Razvoj i validacija ionskih kromatografskih metoda za određivanja anorganskih kationa i aniona

Tičić, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:090573>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Adriana Tičić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2025.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Adriana Tičić

Predala je izrađen diplomski rad dana: 18. veljače 2025.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Kristina Tolić Čop, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 21. veljače 2025.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Adriana Tičić

RAZVOJ I VALIDACIJA IONSKIH KROMATOGRFSKIH METODA ZA
ODREĐIVANJA ANORGANSKIH KATIONA I ANIONA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

dr. sc. Martina Miloloža

Zagreb, veljača 2025.

Ponajprije, zahvaljujem se svojem mentoru doc. dr. sc. Matiji Cvetniću, na vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Jedno veliko hvala i svim mojim profesorima, kolegama i kolegicama što su uvijek pronalazili vremena za davanje savjeta i pomaganje pri savladavanju teškoća tijekom studiranja.

Hvala i mojoj prijateljici Luciji, na podršci, pomoći i inspiraciji tijekom ovih 5 godina studija.

Naposljetku, posebno hvala mojim roditeljima i sestri na pruženoj ljubavi, razumijevanju te pomoći i ohrabrenju tijekom cijelog života, a posebice tijekom mog školovanja.

SAŽETAK

Ionska kromatografija najčešće je primjenjivana za praćenje kvalitete vode (prisutnost različitih iona u vodi) te općenito za monitoring okoliša (praćenje onečišćivala), upravo zahvaljujući njenoj visokoj osjetljivosti, preciznosti i mogućnosti istovremene analize više iona.

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti validaciju metode ionske kromatografije za određivanje aniona (bromida, fluorida, fosfata, klorida, nitrata, nitrita i sulfata) i kationa (amonija, kalcija, kalija, magnezija, natrija i litija) u pripremljenim otopinama poznatih koncentracija. Određeni su parametri validacije: linearnost, preciznost, istinitost (točnost), granica detekcije i kvantifikacije.

Ključne riječi: ionska kromatografija, analiza, validacija, parametri

ABSTRACT

Ion chromatography is most often used to monitor water quality (presence of different ions in water) and for environmental monitoring in general (monitoring of pollutants), thanks to its high sensitivity, precision and the possibility of simultaneous analysis of several ions.

The aim of this thesis was to validate the method for determining anions (bromide, fluoride, phosphate, chloride, nitrate, nitrite, and sulfate) and cations (ammonium, calcium, potassium, magnesium, sodium, and lithium) in prepared solutions with individually known concentrations using the ion chromatography method. Validation parameters determined were: linearity, precision, truthfulness (accuracy), limit od detection and quantification.

Key words: ion chromatography, analysis, validation, parameters

Sadržaj

SAŽETAK	
ABSTRACT.....	
1. UVOD U KROMATOGRFIJU	7-8
2. POVIJESNI PREGLED RAZVOJA IONSKE KROMATOGRFIJE	9
2.1. Vrste ionske kromatografije.....	9-11
2.1.1. Ion- izmjenjivačka kromatografija.....	11-16
2.1.2. Kromatografija ionskih parova	16-18
2.1.3. Kromatografija ionskog isključenja.....	18-19
2.2. Ionski kromatografski sustav	20-27
2.3. Validacija metode.....	27-32
3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Kemikalije i reagensi.....	33
3.2. Popis instrumenata i opreme	34
3.3. Metode rada.....	34
3.3.1. Priprema otopina soli za pripremu standardnih otopina	34-35
3.3.2. Priprema standardnih otopina	36-38
3.3.3. Priprema mobilnih faza.....	38-39
3.3.4. Uvjeti i karakteristike potrebne za provedbu eksperimenta.....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	41
4.1. Rezolucija kromatografskih metoda.....	41-46
4.2. Validacija kromatografske metode.....	46
4.2.1. Linearnost	47-54
4.2.2. Preciznost.....	54-57
4.2.3. Točnost.....	57-58
4.2.4. Granice detekcije i kvantifikacije	58-59
5. ZAKLJUČAK.....	60-61
6. LITERATURA	62-64

1. UVOD U KROMATOGRAFIJU

Pojam „kromatografija“ 1906. godine prvi je u primjenu uveo ruski kemičar i botaničar Mikhail Tsvett, a riječ potječe iz grčkog jezika (*chroma*-boja, *graphein*-pisati). Naime, Tsvett je proučavao separaciju biljnih pigmenata u kolonama sačinjenih od različitih materijala i različitih veličina čestica samog materijala pa je i na temelju tog rada nastao pojam „kromatografija“. [1] U svojim počecima, kromatografiju su koristili prvenstveno umjetnici i obrtnici u nadi da će usavršiti industrijske boje za proizvodnju tekstila. Tek je kasnije kromatografija našla svoju primjenu u kemiji pa su se počele razvijati tehnike koje se i danas koriste za razumijevanje i pročišćavanje kompleksnih smjesa. Iako danas više nije naglasak na dobivanju samih boja ti osnovni principi na kojima se temelji kromatografija su ostali jednako važni. [2]

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), dok se druga pokretna (mobilna) faza kreće u određenom smjeru. [3] Pojednostavljeno, kromatografski sustav čine 2 važne komponente: stacionarna faza koja može biti čvrsta ili tekuća na čvrstoj podlozi te mobilna faza koja kontinuirano prolazi preko stacionarne faze. Mobilna faza može biti tekuća ili plinovita. Smjesa koja sadrži komponente koje se analiziraju uvodi se u sustav preko mobilne faze, a upravo je afinitet otopljene tvari prema jednoj od faza (stacionarnoj ili mobilnoj) zaslužan za razdvajanje tih istih komponenti jednih od drugih. Svaka od prisutnih komponenti ima različito vrijeme zadržavanja ovisno o privlačnim silama. [4]

Mehanizmi razdvajanja u kromatografiji mogu biti različiti. Prema prevladavajućem mehanizmu kromatografija se dijeli na adsorpcijsku kromatografiju (razdvajanje je temeljeno na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari), razdjelnu kromatografiju (kod plinske kromatografije temelji se na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi), ion-izmjenjivačku kromatografiju (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni), kromatografiju isključenjem (do razdvajanja dolazi poradi isključenja zbog razlika u veličini, obliku ili naboju čestica) i afinitetnu kromatografiju (za mehanizam razdvajanja se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganda). [3]

Prema fizikalnom stanju stacionarne i mobilne faze kromatografija se dijeli na: plinsko-tekućinsku, plinsko-čvrstu, tekućinsko-tekućinsku, tekućinsko-čvrstu kromatografiju, dok se prema prirodi pokretne faze dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Prema obliku kromatografske podloge kromatografija može biti kolonska (nepokretna faza unutar kolone) i plošna (nepokretna faza je ravna ploha ili se nanosi na plohu). [3]

Vrste interakcija koje prevladavaju između stacionarne faze, mobilne faze i komponente sadržane u smjesi su osnovni čimbenik koji utječe na separaciju komponenata jedne od druge. Svrha primjene kromatografije, koja je i kvantitativna metoda analize, postizanje je zadovoljavajućeg odvajanja unutar odgovarajućeg vremenskog intervala. [5]

Danas se kromatografija široko primjenjuje u analitičkim i razvojnim laboratorijima te u laboratorijima za kontrolu kvalitete. Primjerice, kromatografija se koristi u farmaceutskoj industriji za odvajanje i analizu određenih spojeva te otkrivanje elemenata u tragovima. Također, u prehrambenoj industriji kromatografija je važna metoda za otkrivanje onečišćivala u hrani, odvajanje i identifikaciju aminokiselina, vitamina, konzervansa, itd. U kemijskoj industriji kromatografija se vrlo često primjenjuje za analizu uzoraka vode za piće, ispitivanje kvalitete zraka i identifikaciju onečišćivala, kao što je PCB (poliklorirani bifenil) u pesticidima i ulju. Pored nabrojanih, kromatografija je također neizostavna metoda prilikom forenzičkih ispitivanja, u petrokemijskoj industriji, u medicini, itd. [6]

Svrha ovog rada je izdvojiti i analizirati anorganske katione i anione iz pripremljenih otopina poznatih koncentracija ion-izmjenjivačkom kromatografijom, vrstom ionske kromatografije.

2. POVIJESNI PREGLED RAZVOJA IONSKE KROMATOGRFIJE

Prva zapažanja koja se odnose na ionsku izmjenu iznijeli su 1850. godine J. T. Way i H. S. Thompson otkrićem da tlo ima sposobnost uklanjanja amonijevih iona (NH_4^+) kada se ispiru ionskim otopinama (Ca^{2+}), zamjenjujući ekvimolarnim količinama. [7]

Tek krajem Prvog svjetskog rata počinje korištenje principa ionske izmjene u analitičke svrhe kada su O. Folin i R. Bell uspjeli odvojiti i kvantificirati amonijak u urinu korištenjem umjetnog ionskog izmjenjivača napravljenog od sintetskog aluminijskog silikata. B. A. Adams i E. L. Holmes su 1935. g. napravili sintetsku ion-izmjenjivačku smolu. Osnova za njenu sintezu je bila kondenzacijska polimerizacija polisupstituiranog spoja benzena ili formaldehida. [8]

Godine 1940. su razvijene izmjenjivačke smole kopolimerizacijom stirena i divinilbenzena te su korištene u procesu obrade vode. Sljedeći važan iskorak je bio 1975. godine kada su H. Small, T. S. Stevens i W. C. Bauman izvršili odvajanje i detekciju uzoraka koristeći mjerač vodljivosti, s time da su uključili supresorsku kolonu između separatora i detektora vodljivosti za povećanje osjetljivosti smanjenjem pozadinske vodljivosti eluenta, a istovremeno povećanjem električne vodljivosti iona analita. [8]

U 1980-ima D. T. Gjerde i suradnici su koristili ion-kromatografski sustav bez supresora, s eluensima male vodljivosti. Sustav sa supresorom, kao i sustav bez supresora, pokazali su se učinkoviti u analizi uzoraka. [9] Ionska kromatografija sa suprimiranom vodljivošću je najčešće korištena i ima najbolje performanse. [10]

2.1. Vrste ionske kromatografije

Pojam „ionska kromatografija“ (engl. „*Ion chromatography*“, *IC*) uveden je u rječnik analitičke kemije 1975. g. s prvom komercijalnom primjenom instrumentacije za ionsku kromatografiju. Od samih početaka ona je bila kombinacija 3 komponente: kolone za ionsku izmjenu, supresora i detektora vodljivosti. [11] Međutim, tijekom vremena se ustalio skraćeni naziv ionska kromatografija iako taj termin obuhvaća metodu ionske izmjene, metodu ionskog isključenja te kromatografije ionskih parova, što je sve uključeno u tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (*HPLC*). [12]

Ionska kromatografija je dio tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (*HPLC*) koja se koristi za odvajanje i određivanje aniona i kationa te drugih tvari nakon pretvorbe u ionske oblike. Brz je razvoj i velika popularnost ove analitičke metode zahvaljujući nizu prednosti, kao što su: istovremena analiza više iona u kratkom vremenu (5-30 minuta), mala količina uzorka potrebna za analizu, mogućnost korištenja različitih detektora, jednostavna priprema uzorka, mogućnost istovremene analize kationa i aniona ili organskih i anorganskih iona, selektivnost odvajanja, mogućnost analize iona istog elementa na različitim oksidacijskim razinama, sigurnost i niski operativni troškovi. [13]

U svojim počecima, ionska kromatografija koristila se za izdvajanje anorganskih kationa i aniona, ali danas se koristi za izdvajanje i šireg raspona vrsta, kao što su: organske kiseline i baze, aminokiseline, ugljikohidrati, itd. Ionska kromatografija se smatra primarnom i najučestalijom metodom za analizu anorganskih aniona. [14] Najvažnije područje primjene anionske kromatografije danas je ispitivanje vodenih sustava - analiza vode za piće, analiza vrste elemenata u anionskim otopinama ili kompleksima, analiza ultratragova u ultračistim procesnim kemikalijama. S druge strane, za analizu kationa postoje bolje alternative *IC*-u kao što je: spektroskopija atomske emisije s induktivno spregnutom plazmom (*ICP-AES*) te masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom (*ICP-MS*), tako da je manja vrijednost kationske kromatografije u usporedbi s anionskom. Ipak, može se reći da je kationska kromatografija postigla određenu važnost za analizu alkalijskih i zemnoalkalijskih metala te za određivanje amonijevog dušika (voda za piće). [15]

Dvije su osnovne vrste ionske kromatografije koje su u upotrebi ovisno o tome koristi li se supresor ili ne. U slučaju ionske kromatografije uz supresor vodljivost eluensa je smanjena, zahvaljujući supresoru, a sve kako bi se vodljivost prisutnog analita povećala. To vodi do povećanja omjera signal-šum detekcijskog signala. S obzirom na izostanak supresora, kod nesuprimirane ionske kromatografije ključnu ulogu u dobroj detekciji analita imaju eluensi smanjene vodljivosti. [16]

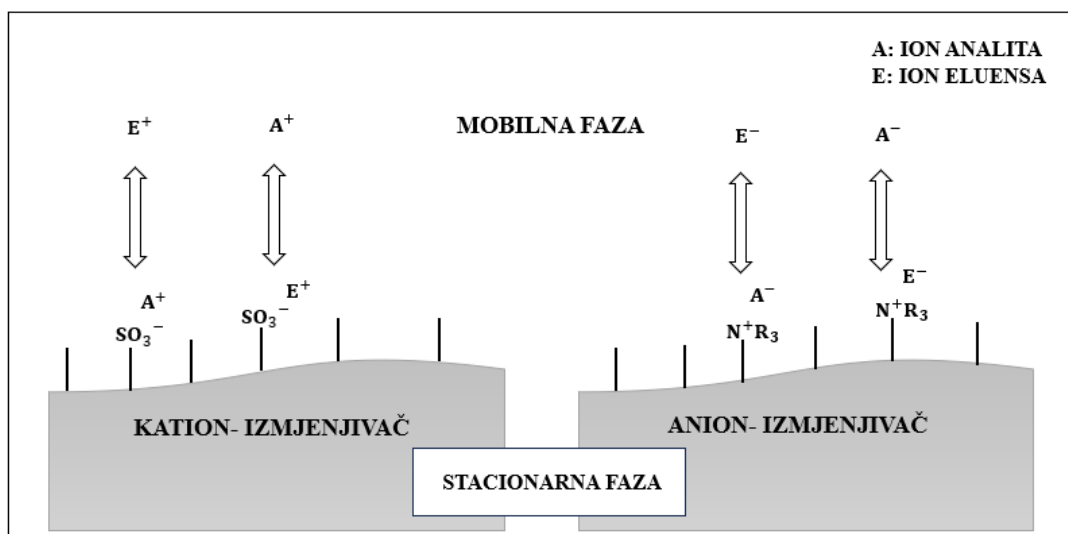
S obzirom na separacijski mehanizam 3 su vrste ionske kromatografije:

- ion-izmjenjivačka kromatografija
- kromatografija ionskih parova
- kromatografija ionskog isključenja.

Od ovdje navedenih, ion-izmjenjivačka kromatografija se podrazumijeva pod ionsku kromatografiju, dok su kromatografija ionskih parova i kromatografija ionskog isključenja više specijalizirane primjene. [15]

2.1.1. Ion-izmjenjivačka kromatografija

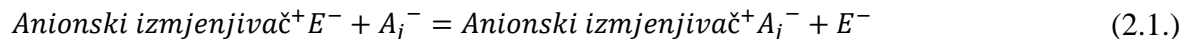
Ion-izmjenjivačka kromatografija se temelji na stehiometrijskoj kemijskoj reakciji između iona u otopini i čvrste tvari - stacionarne faze koja nosi funkcionalne skupine koje mogu zadržati ione kao rezultat elektrostatskih privlačenja (*slika 2.1.*). U najjednostavnijem slučaju te funkcionalne skupine su, ili sulfonske kiseline (kationska kromatografija), ili amonijeve skupine (anionska kromatografija). U teoriji, ioni s istim nabojem se mogu potpuno reverzibilno izmijeniti između dviju faza. Sam proces ionske izmjene vodi do postizanja ravnoteže. [15]



Slika 2.1. Shema ion-izmjenjivačkog mehanizma (lijevo: kation-izmjenjivački mehanizam; desno: anion-izmjenjivački mehanizam)

Mehanizam odvajanja ionskom izmjenom temelji se na elektrostatskim interakcijama između hidratiziranih iona iz uzorka i suprotno nabijenih funkcionalnih skupina ionskog izmjenjivača ili stacionarne faze smještene unutar kromatografske kolone. Otopljeni ioni se isporučuju u stacionarnu fazu protokom eluensa ili mobilne faze koja posjeduje odgovarajuću

snagu eluiranja koja proizlazi iz prisutnosti konkurentnih iona eluensa. U procesu odvajanja, ionski izmjenjivač se uravnotežuje s ionima eluensa, a za slučaj anion-izmjenjivačke kromatografije može se napisati proces razmjene (*jednadžba 2.1.*):



Relativna snaga između bilo kojeg aniona, A_j^- , i anionskog izmjenjivača definiraju selektivnost ionske izmjene sustava. Afinitet anionskog izmjenjivača za određeni anion, A_j^- , može biti izražen koeficijentom distribucije, D (*jednadžba 2.2.*):

$$D = \frac{[A_j]_s}{[A_j]_m} \quad (2.2.)$$

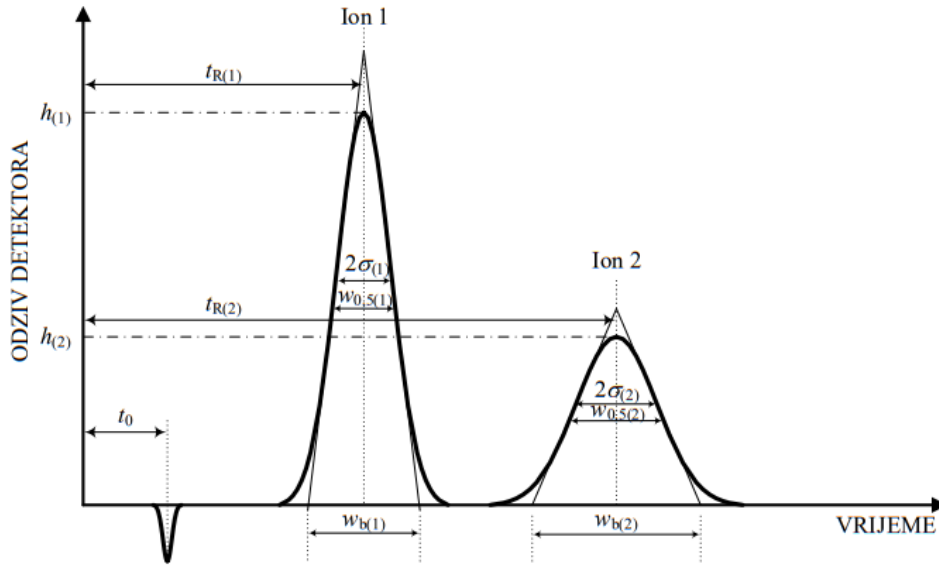
Ili preko koeficijenta selektivnosti, K (*jednadžba 2.3.*):

$$K_E^{A_j} = \frac{[A_j]_s [E]_m}{[A_j]_m [E]_s} \quad (2.3.)$$

gdje su $[A_j]_s$ i $[A_j]_m$ ravnotežne koncentracije aniona otopljenih u stacionarnoj, odnosno mobilnoj fazi; $[E]_m$ i $[E]_s$ koncentracije eluensa u mobilnoj/stacionarnoj fazi. [17]

Komponente koje imaju veću vrijednost koeficijenta distribucije, D , biti će snažnije zadržane na stacionarnoj fazi u odnosu na komponente manje vrijednosti D . [15] Koeficijent selektivnosti u obzir uzima i afinitet ionskog izmjenjivača prema ionima prisutnima u eluensu. [17] Iz izraza za koeficijent selektivnosti, K , vrijedi da što je veća vrijednost K to je veća tendencija stacionarne faze da zadrži taj anion. S druge strane, što je manja vrijednost K to je manja tendencija te stacionarne faze da zadrži taj anion. [18]

Na slici 2.2. prikazana su različita vremena zadržavanja dvaju iona na stacionarnoj fazi.



Slika 2.2. Signal detektora u ovisnosti o vremenu kod kromatografskog odvajanja; uključujući i karakteristične veličine [3]

Ukupno vrijeme zadržavanja na stacionarnoj fazi, t_R , jednako je zbroju neto vremena zadržavanja, t_S , što odgovara stvarnom vremenu zadržavanja tijekom migracijskog puta, i mrtvom vremenu (vrijeme nezadržane komponente), t_0 , odnosno vremenu protoka mobilne faze bez ikakve interakcije (jednadžba 2.4.). [15]

$$t_R = t_S + t_0 \quad (2.4.)$$

Faktor zadržavanja, k , za ion koji se zadržava unutar izmjenjivačke kolone predstavlja omjer vremena kojeg uzorak provede u nepokretnoj fazi, t_S , i vremena provedenog u pokretnoj fazi, t_0 (jednadžba 2.5.):

$$k = \frac{c_{S,i} \cdot V_S}{c_{M,i} \cdot V_M} = \frac{t_S}{t_0} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (2.5.)$$

gdje i predstavlja koncentraciju razdijeljene tvari u nepokretnoj, c_S , i koncentraciju razdijeljene tvari u pokretnoj fazi, c_M .

Poznavanje faktora zadržavanja različitih tvari je dobar pokazatelj njihova odjeljivanja odabranom kromatografskom metodom. [3] U skladu s time, definira se faktor odjeljivanja, odnosno selektivnost, kao mjera sposobnosti razdjeljivanja, a predstavlja omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, α (*jednadžba 2.6.*):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}; k_2 \geq k_1 \quad (2.6.)$$

U praksi, selektivnost ovisi o sljedeća 4 parametra:

- svojstvima stacionarne faze
- svojstvima mobilne faze
- vrsti i prirodi iona otopljene tvari
- interakcijama sekundarne faze i ravnoteže, kao što su učinci solvata, hidrofobne interakcije za organske ione, vodikove veze ... [17]

Osim faktora odjeljivanja, koji je više kvalitativna mjera odjeljivanja, kao mjera kvantitativnog odjeljivanja koriste se razlučivanje, R_s , i broj teoretskih odsječaka, N . [3] Razlučivanje, R_s , jednako je omjeru udaljenosti vremena zadržavanja dviju slijedno eluiranih tvari i dvostruke vrijednosti sume standardnih odstupanja njihovih krivulja odziva (*jednadžba 2.7.*):

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{2 \cdot (\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (2.7.)$$

Uzimajući u obzir odnose između standardnog odstupanja i vrijednosti širina, vrijedi:

$$w_{ti} = 2 \cdot \sigma \quad (2.8.)$$

$$w_b = 4 \cdot \sigma \quad (2.9.)$$

$$w_{0,5} = 2,355 \cdot \sigma \quad (2.10.)$$

Simbolom w_{ti} označena je širina krivulje u točkama infleksije, w_b označava širinu krivulje pri baznoj liniji, a $w_{0,5}$ širinu na polovici visine kromatografske krivulje, što je vidljivo na slici 2.2.. Koristeći *jednadžbe 2.8.-2.10.* razlučivanje se može izraziti preko širina krivulja (*jednadžba 2.11.*) [3]:

$$R_S = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{ti,1} + w_{ti,2}} = 1,18 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} = 2 \cdot \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{b,1} + w_{b,2}} \quad (2.11.)$$

Za kvalitativnu analizu uzoraka potrebno je postići vrijednost razlučivanja veću od 1,5. [3] Općenito, što je veća razlika između vremena zadržavanja dvaju vrhova u odnosu na vrijednost bazne širine ili polovice vrijednosti bazne širine, rezolucija se smatra dobrom. [15]

Djelotvornost kolone, prema teoriji odsječaka, ovisi o širini zone raspodjele komponente unutar kromatografske kolone. Što je ta zona uža, to je kolona djelotvornija. Djelotvornost se može izraziti preko broja teoretskih odsječaka, N , ili preko visine ekvivalentne teoretskom odsječku, $HETP$. [3] Broj teoretskih odsječaka može se odrediti koristeći standardno odstupanje, σ , baznu širinu, w , ili polovicu bazne širine, $w_{0,5}$ (jednadžba 2.12.) [14]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (2.12.)$$

Teoretski broj odsječaka, N , može se zamijeniti visinom ekvivalentom teoretskom odsječku, $HETP$ (jednadžba 2.13.):

$$HETP = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{L} \quad (2.13.)$$

U ovom slučaju $HETP$ se računa kao omjer duljine kromatografske kolone, L , i broja teoretskih odsječaka, N , ili, kao omjer standardnog odstupanja raspodjele mase, σ^2 , unutar kolone duljine, L . [3] Model teoretskih odsječaka se može koristiti za objašnjenje pojave Gaussovih signala u kromatografiji, uz pretpostavku da se zbog difuzije postiže konačno brza i nepotpuna ravnoteža između stacionarne i pokretne faze. To u konačnici rezultira širenjem vršnih bodova kao uske zone tvari jer se vrijeme zadržavanja u stacionarnoj fazi sve to više povećava. [15]

Općenito, postupak kromatografskog odvajanja se prikazuje u obliku kromatograma (slika 2.2.) u kojem se bilježi signal detektora kao funkcija elucijskog volumena mobilne faze ili vremena. To znači da ono odgovara koncentraciji, odnosno profilu mase u vremenu. Signal detektora bi trebao biti proporcionalan koncentraciji analita na kraju migracijskog puta. Zbog različitih poremećaja kao što su: stvaranje kanala, difuzijski procesi, nepravilnosti u ravnoteži

između mobilne i stacionarne faze neki analiti mogu proći kroz stacionarnu fazu brže ili sporije nego što bi se očekivalo prema neto vremenu retencije, t_s . To znači da se kromatogram ne sastoji od beskonačno uskih krivulja, već Gaussovih krivulja. Kao rezultat procesa difuzije, širina pika tvari se povećava s povećanjem vremena zadržavanja. Taj fenomen je karakterističan za sve kromatografske metode. [15]

Sintetičke ion-izmjenjivačke smole su visoko molekularni polimeri koji sadržavaju velik broj ionskih funkcionalnih skupina po molekuli. Kation-izmjenjivačke smole sadržavaju “kisele” skupine, dok anion-izmjenjivačke imaju “bazične” skupine. Jake kation-izmjenjivačke smole imaju sulfonske skupine ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) pričvršćene za polimernu matricu i imaju znatno širu primjenu od slabih kation-izmjenjivača (kao što je karboksilna skupina $-\text{COOH}$). Slično tome, jake anion-izmjenjivačke smole sadrže kvaterne amonijeve skupine [$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$], dok slabe anion-izmjenjivačke smole sekundarne ili tercijarne amine. [18]

Eksperimenti pokazuju da se polivalentni ioni mnogo jače zadržavaju od vrsta s jednim nabojem. Unutar dane skupine naboja postoje razlike između vrijednosti koeficijenta selektivnosti, K , vezano uz veličinu hidratiziranog iona. Stoga, vrijednosti K se smanjuju za jednovalentne ione sljedećim redoslijedom: $\text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$, a za divalentne katione: $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{UO}_2^{2+}$. [18]

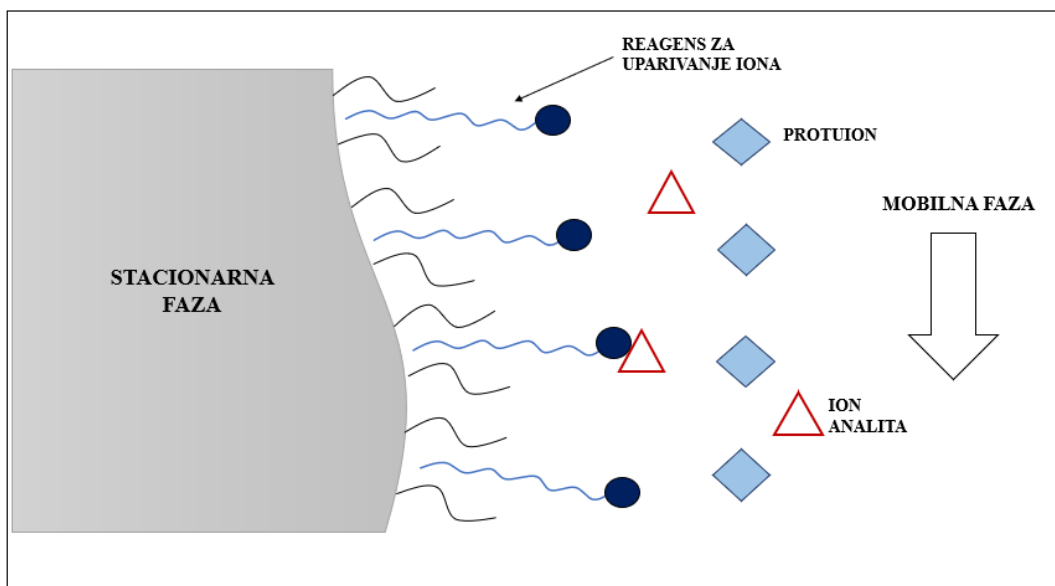
U nedostatku sekundarnih interakcija, zadržavanje iona u ion-izmjenjivačkoj kromatografiji proporcionalno je njegovom naboju, polarizabilnosti i veličini. Teoretski, među ionima sličnih naboja jača interakcija će biti što su ioni manji, a time će i zadržavanje biti veće za manje ione. [17]

2.1.2. Kromatografija ionskih parova

Kromatografija ionskih parova je dio ionske kromatografije reverzne faze koja se koristi za separaciju iona i djelomično ioniziranih analita koristeći reverznu fazu ili neutralnu stacionarnu fazu koja ne nosi naboj. Uključuje modificiranje polariteta nabijenih analita interakcijom sa reagensom za uparivanje iona koji se dodaje mobilnoj fazi. Molekule ovih reagensa imaju suprotno nabijen naboj od naboja analita, zbog čega dolazi do elektrostatskih privlačenja između njih. [19]

Reagensi koji se dodaju za formiranje ionskih parova su obično alkilsulfonat, alkilsulfat, alkilamonijeva sol. Svrha dodavanja tih reagensa u mobilnu fazu je promjena vremena zadržavanja ionskih analita. Faktor zadržavanja analita, sa suprotnim jednostrukim nabojem, može se povećati za 10-20 u odnosu na faktor zadržavanja analita bez dodanog reagensa.[20]

Povijesno, razvijene su 2 teorije zadržavanja: stehiometrijska i nestehiometrijska. U počecima razvoja kromatografije ionskih parova razvijena je stehiometrijska metoda prema kojoj otopljeni ioni i ioni za uparivanje tvore stehiometrijske komplekse bilo u mobilnoj fazi (model ionskog para) ili na stacionarnoj fazi (model dinamičke ionske izmjene). Adsorpcijski model sparivanja iona pretpostavlja stvaranje ionskog para unutar polarne mobilne faze, nakon čega slijedi adsorpcija nenabijenog kompleksa na hidrofobnoj stacionarnoj fazi. Dinamički model ionske izmjene pretpostavlja da se amfifilne molekule reagensa adsorbiraju zajedno sa svojim anorganskim protuionima na stacionarnoj fazi što uzrokuje da se kolona ponaša kao dinamički generirani ionski izmjenjivač. Zadržavanje iona otopljene tvari je tada posljedica ionske izmjene s anorganskim protuionima. [21]



Slika 2.3. Shema nestehiometrijskog modela u kromatografiji ionskih parova (model jednak za katione i anione)

S druge strane, nestehiometrijski model (slika 2.3.) opisuje zadržavanje ionskih analita bez stvaranja kemijskih kompleksa. Zajednički temelj modernih retencijskih teorija je da nabijena

površina nastaje kada reagens za uparivanje iona adsorbira na granici između polarne mobilne faze i hidrofobne stacionarne faze. Anorganski protuioni ionskog para reagensa su teritorijalno vezani za nabijenu površinu u difuznom sloju i nastaje difuzni dvostruki sloj. [20] Pretpostavka je da je zadržavanje iona otopljene tvari djelomično određeno njihovom interakcijom sa stvorenim električnim poljem adsorbiranog iona za uparivanje. Prema tome, učinak iona za uparivanje je neizravan, a djeluje putem uspostavljanja određenog elektrostatskog površinskog potencijala.

Kvantitativan opis elektrostatskih interakcija dao je B. A. Bidlingmeyer u teoriji o ionskim interakcijama. Prema toj teoriji, ion koji se adsorbira na površini stacionarne faze tvori primarni ionski sloj. Elektrolitički protuioni tvore sekundarni ionski sloj između nabijene površine i mobilne faze. Ioni analita su ili privučeni, ili odbijeni primarnim ionskim slojem, ovisno o predznaku njihovog naboja i naboja primarnog sloja. Glavna prednost modela elektrostatske interakcije je u tome da je on dobro utemeljen u fizikalnoj kemiji pa tako omogućuje predviđanje zadržavanja. Pretpostavlja se da je primarni doprinos zadržavanju ionskih analita njihova povećana privlačnost ili odbojnost prema električki nabijenoj površini. [21]

Kod kromatografije ionskih parova brojne varijable mobilne faze (vrsta iona za uparivanje, koncentracija iona, ionska jakost, pH eluensa, organska otapala) mogu se koristiti za kontrolu vremena zadržavanja i selektivnosti. Širok izbor i kombinacija ovih varijabli omogućuju odvajanje složenih mješavina uzoraka koji sadrže ionske/ionizacijske i neutralne otopljene tvari. [21]

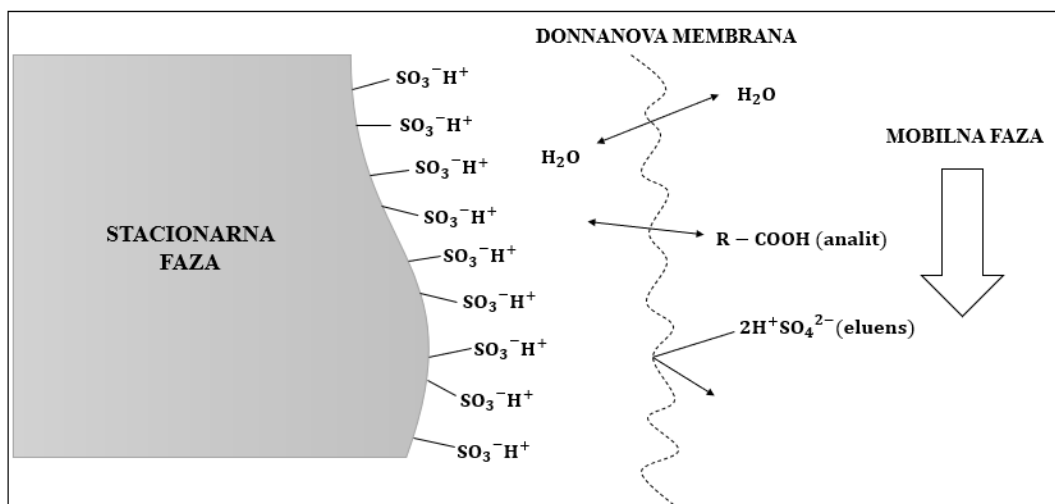
2.1.3. Kromatografija ionskog isključenja

Kromatografija ionskog isključenja je separacijska tehnika koja se uglavnom koristi za odvajanje slabih kiselina, posebice karboksilnih kiselina, ali i za odvajanje ugljikohidrata, fenola, aminokiselina, slabih baza. [17] Jedna od osobitosti ove metode je da je električni naboj funkcionalne skupine ion-izmjenjivačke smole jednak kao i naboj ionske vrste analita. Separacija negativno nabijenih komponenti, kao što je disocirana karboksilna kiselina, odvija se na kation-izmjenjivačkoj smoli s anionskim funkcionalnih skupinama, dok se pozitivno nabijeni ioni izdvajaju na anion-izmjenjivačkim kolonama.

Jaki elektroliti se isključuju iz pora smole zbog elektrostatskih odbijanja od strane fiksnih naboja smole/punjenja, dok su slabi elektroliti i neelektroliti zadržani između tekućine unutar

smole/punjenja i vanjske tekućine. Točnije, slabi elektroliti su ili zadržani, ili odbijeni, ovisno o njihovom stupnju disocijacije. Što je veći stupanj disocijacije to je kraće zadržavanje pa to omogućuje razdvajanje djelomično ioniziranih komponenti smjese na temelju njihovih konstanti disocijacije. Vrijeme zadržavanja slabih elektrolita je proporcionalno vrijednosti konstanti disocijacije, K_a . [22]

Kao materijal za punjenje u kromatografiji ionskog isključenja se često koristi sulfonirani kationski izmjenjivač sa protonima kao protuionima. U vodenim eluensima ove funkcionalne skupine su hidratizirane. Hidratizirana ljuska je okružena imaginarnom negativno nabijenom membranom - Donnan membranom. Kroz tu membranu mogu proći samo nenabijene, nedisocirane molekule kao što je voda. Organske karboksilne kiseline mogu se odvojiti ako se kao mobilna faza koristi jaka mineralna kiselina, kao npr. sumporna kiselina. Karboksilna kiselina je većinom u potpunosti nedisocirana u jako kiselom eluensu pa može proći kroz Donnanovu membranu i adsorbirati na stacionarnoj fazi, dok su potpuno disocirani sulfatni ioni isključeni (*slika 2.4.*). [15]



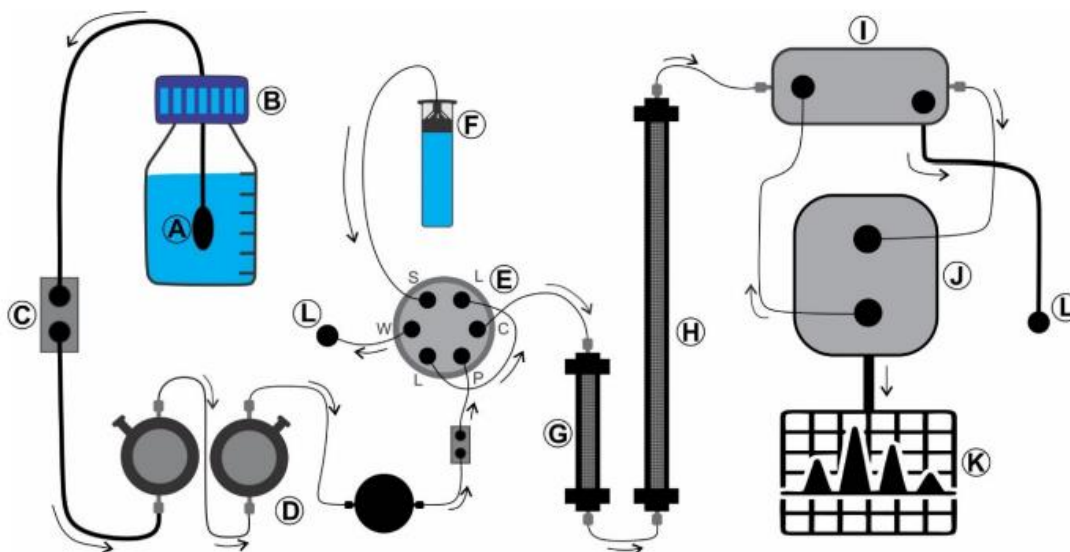
Slika 2.4. Shema separacijskog mehanizma na principu Donnanove membrane

2.2. Ionski kromatografski sustav

Osnovne komponente ionskog kromatografskog sustava sastoje se od: spremnika eluensa, pumpe, otplinjača, injekcijske igle, uzorka, pretkolone i kolone u termostatiranom kućištu, supresora, detektora i računalne jedinice.

Viskotlačna pumpa s prigušivačem pulseva doprema mobilnu fazu kroz kromatografski sustav, a pomoću otplinjača se iz eluensa uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. Uzorak se injektira u sustav putem injekcijske igle pri atmosferskom tlaku. Nakon injektiranja uzorak se pomoću mobilne faze transportira do separatorske kolone. Tipični volumeni injekcije iznose između 5 i 100 μL . Najvažniji dio kromatografskog sustava je separatorska kolona, a kvalitetu separacije određuje izbor stacionarne faze i uvjeti pri kojima se odvija separacija. Na izlasku iz kolone se nalazi elektrokemijski supresor koji omogućava smanjenje pozadinskog šuma kao i pojačanje samog signala analita te detektor za mjerenje odziva. Signal detektora sakuplja se i obrađuje u računalnoj jedinici. [23]

Pojednostavljeni prikaz kromatografskog sustava može se vidjeti na *slici 2.5*.



Slika 2.5. Shematski prikaz ionskog kromatografskog sustava; A- filter, B- spremnik eluensa, C- otplinjač, D- viskotlačna pumpa, E- injektor, F- uzorak, G- pretkolona, H- separacijska kolona, I- supresor, J- detektor, K- kromatogram, L- otpad [24]

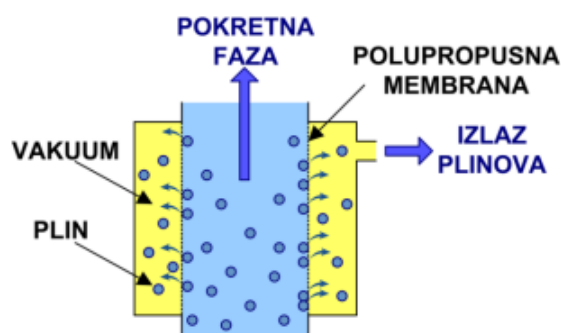
➤ ELUENS

Eluens je mobilna faza koja se koristi u kromatografiji, a može biti fiksne ili promjenjive koncentracije što se postiže pomoću generatora eluensa koji sadrži potrebnu koncentriranu otopinu elektrolita. Za analizu kationa i aniona koriste se različite otopine eluensa. [25] Eluensi koji se primjenjuju u anion-izmjenjivačkoj kromatografiji kreću se u rasponu od razrijeđenih otopina elektrolita pa sve do složenih višekomponentnih puferkih otopina koje mogu biti anorganske ili organske prirode. Snaga eluiranja, a time i zadržavanje otopljene tvari ovisi o koncentraciji konkurentskog aniona eluensa i njegovoj selektivnosti za određenu stacionarnu fazu anionske izmjene. [8]

Nerijetko, eluens se bira tako da odgovara zahtjevima za detekciju analita pa se tako razlikuju eluensi niske vodljivosti, eluensi visoke vodljivosti i eluensi čija se vodljivost može potisnuti. Neki od tipičnih eluensa za anion-izmjenjivačku kromatografiju su: puferka otopina natrijevog karbonata/bikarbonata, natrijev ili kalijev hidroksid, alifatske karboksilne kiseline, alifatske i aromatske sulfonske kiseline, aromatske karboksilne kiseline, anorganske soli, itd. Najčešće korišten eluens za ion-izmjenjivačku separaciju anorganskih kationa su razrijeđena nitratna ili metansulfonska kiselina (MSA). [8]

➤ OTPLINJAČ

Otplinjač je visokotlačni uređaj za uklanjanje plinova elektrolize nastalih prilikom proizvodnje eluensa sprječavajući da ti isti plinovi utječu na sam kromatografski proces. Prisutnost plinova u pokretnoj fazi može snažno utjecati na većinu detektora uzrokujući neravnu baznu liniju. U pravilu, otplinjavanje se izvodi koristeći razliku u tlakovima. Pokretna faza se uvodi u komore, a uslijed razlike tlakova dolazi do dekompresije plinova koji prelaze kroz polupropusnu membranu u područje znatno nižeg tlaka (vakuumsko područje), dok otplinjena pokretna faza teče dalje kroz sustav (slika 2.6.).



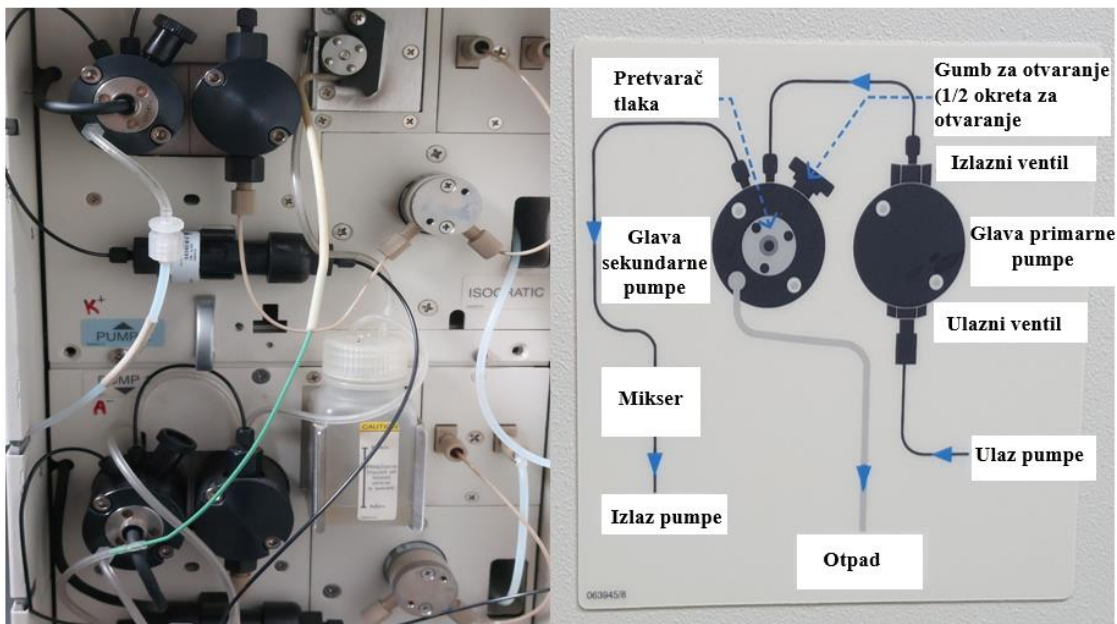
Slika 2.6. Shematski prikaz otplinjača [3]

Otplinjavanje eluensa je važno s obzirom da može ostati zarobljen zrak u povratnom ventilu, uzrokujući gubitak snage pumpe. Gubitak snage pumpe rezultira nepravilnim protok eluensa ili čak potpunim gubitkom protoka, a također otopljeni zrak iz eluensa može dovesti i do promjene u efektivnoj koncentraciji eluensa. Ugljikov dioksid iz zraka nakon otapanja u vodi stvara ugljičnu kiselinu koja jednako tako može promijeniti efektivnu koncentraciju eluensa, uključujući otopinu natrijevog hidroksida, bikarbonata i karbonata. [26]

➤ PUMPA

Ionske kromatografske pumpe sastoje se od ekscentričnog kotača spojenog na klip. Rotacija motora pretvara se u linearno gibanje klipa. Kod ovih pumpi razlikuju se klipne pumpe s jednom glavom od klipnih pumpi s dvije glave. Klipne pumpe s jednom glavom nemaju konstantan protok eluensa jer se pokretna faza dostavlja samo za pola crpnog ciklusa. Iz istog razloga ugrađuju

se prigušivači pulseva koji ublažavaju visoku razinu tlaka na vrhuncu crpnog ciklusa i osiguravaju tok eluensa dok se crpka puni. Za razliku od pumpi s jednom glavom, pumpe s dvije glave smanjuju pulsacije u sustavu protoka eluensa i time omogućuju konstantan protok eluensa kroz sustav. Pumpe funkcioniraju po principu: dok jedna glava isisava, druga usisava i obrnuto (slika 2.7.). S obzirom da pumpe stvaraju seriju pulseva na koje je većina detektora osjetljiva, a očituju se i na baznoj liniji kromatograma kao šum, nakon pumpe se ugrađuju prigušivači pulseva. [3]



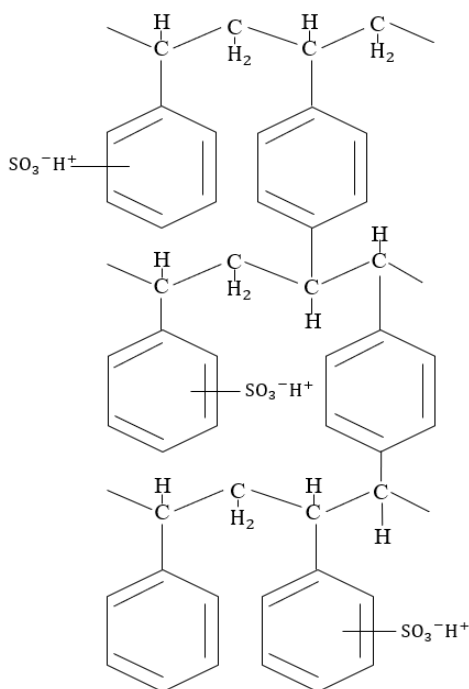
Slika 2.7. Smještaj dviju pumpi s dvije glave u kromatografskom sustavu (slika lijevo); Shema pumpe s dvije glave (slika desno)

➤ KROMATOGRAFSKA KOLONA

Kromatografske kolone su većinom cilindrične cijevi s ulazima i izlazima na oba kraja, punjene nosačima. Većinu sadržaja ovih koloni čine porozne i čvrste čestice supstrata koje imaju pozitivno ili negativno nabijene ionske funkcionalne skupine na svojoj površini. Najčešći tip ionskog izmjenjivača je organska smola. Kromatografske separacije su učinkovitije kada se koriste one na bazi silicijevog dioksida. [25] Općenito, organski polimeri su najčešće korišteni materijal u ionskoj-izmjenjivačkoj kromatografiji, što pokazuje i njihova velika stabilnost pri širokom rasponu pH vrijednosti. Stiren-divinilbenzen kopolimer, etilvinilbenzen-divinilbenzen kopolimer,

polimetilmetakrilatna (PMMA) i polivinilna smola su najvažniji organski polimeri koji se koriste za izradu osnovnog kostura u ion-izmjenjivačkoj kromatografiji. [27]

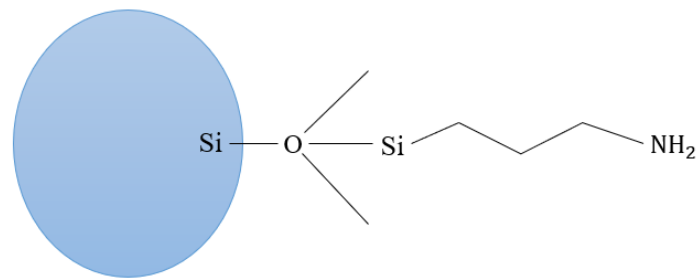
Najprimjenjivnije funkcionalne skupine kod kationskih izmjenjivača su sulfonatna, karboksilna ili fosforna, dok je kod anionskih amino skupina. Od prethodno nabrojanih polimernih materijala najčešće korišteni izmjenjivački kostur je stiren-divinilbenzen kopolimer. Kopolimerizacija stirena sa divinilbenzenom (DVB) je neophodna za postizanje dobre mehaničke stabilnosti izmjenjivačkog kostura (*slika 2.8.*). Postotak divinilbenzena u strukturi naziva se postotkom poprečnog vezivanja i o njemu ovisi poroznost samog kostura, tj. izmjenjivača. [3]



Slika 2.8. Struktura polistiren-divinilbenzenskog ionskog izmjenjivača s funkcionalnom sulfo-skupinom

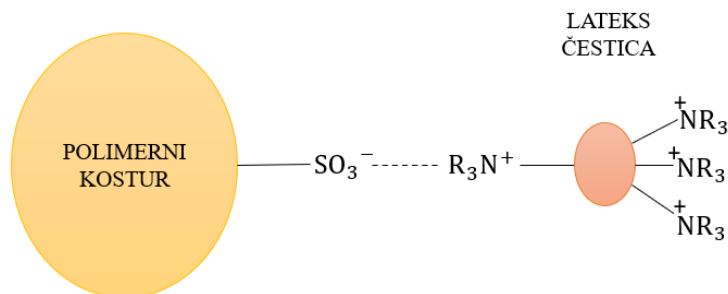
Za razliku od organskih polimera, izmjenjivači na bazi silikata imaju znatno veću efikasnost, veću mehaničku i toplinsku stabilnost. Također, kod njih nisu prisutni problemi povezani s bubrenjem i sažimanjem, ali se zato mogu se koristiti samo pri rasponu pH vrijednosti od 2 do 8. Poželjne su potpuno porozne podloge s veličinom čestica u rasponu 3 do 10 μm koje se zovu mikročestične kuglice. [27] Većina komercijalno dostupnih izmjenjivača silikatnog tipa nastaje reakcijom odgovarajućeg organosilanskog reagensa sa silanolnim skupinama na površini

silikatnog kostura (*slika 2.9.*). Kod takvih anionskih izmjenjivača korištena funkcionalna skupina je amino, dok je kod kationskih izmjenjivača funkcionalna skupina sulfonatna. Ipak, znatno je veći interes prisutan za izmjenjivače s polimerom presvučenim silikatnim kosturom. Polimerna tvar se sintetizira u zasebnom koraku, a potom se nanosi na silicij-dioksidni nosač i imobilizira. Kod kationskih izmjenjivača najčešće se koristi kopolimer priređen iz smjese butadiena i maleinske kiseline u jednakim omjerima. Kod anionskih izmjenjivača s polimerom presvučenim silikatnim kosturom kao polimerna faza se koristi lauril metakrilat. [3]



Slika 2.9. Primjer izmjenjivača na bazi silikata

Anionski izmjenjivači na bazi lateksa se sastoje od površinski sulfoniranog polimernog supstrata promjera čestica 5 do 13 μm na koje su aglomerirane aminirane porozne polimerne kuglice izrađene od polivinilbenzilklorida ili polimetakrilata koje se nazivaju latex čestice (*slika 2.10.*).

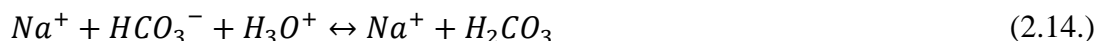


Slika 2.10. Anionski lateks izmjenjivač

Te čestice su vezane na površinu supstrata elektrostatskim i van der Waalsovima interakcijama. [27] Funkcionalne skupine na kojima dolazi do izmjene aniona su kvaterne amino skupine. Kationski izmjenjivač zasnovan na ovom principu ima slabo sulfoniranu površinu kopolimernog polistiren-divinilbenzen središta. Kao i kod anionskog izmjenjivača, elektrostatskim i van der Waalsovima silama oko centralne polistiren-divinilbenzen čestice aglomerirana su aminirana zrnca lateksa na koje je vezan dodatni sloj sulfoniranih čestica. U slučaju ovog kationskog lateks izmjenjivača funkcionalne skupine su sulfonatne skupine. [3]

➤ SUPRESOR

Glavna funkcija supresorskog sustava kao dijela detektorske jedinice je da kemijski smanji visoku pozadinsku vodljivost elektrolita u eluensu i pretvorba iona iz uzorka u vodljivi oblik. [23] U ionskoj kromatografiji gdje se eluens sastoji od razrijeđene otopine jake kiseline (npr. HNO₃) ili baze (npr. KOH), vrlo visoka pozadinska vodljivost koju stvara eluens može se eliminirati izmjenom protuiona eluensa (NO₃⁻ i K⁺) s hidroksidnim OH⁻ ili hidronijevim H₃O⁺ ionom, tvoreći H₂O. Izmjena ovih iona se odvija ili preko supresora na bazi visoko kapacitetne ion-izmjenjivačke smole ili preko ion-izmjenjivačke membrane - membranski supresor. Na tom principu se i npr. eluens natrijev ili kalijev karbonat/ bikarbonat (CO₃²⁻ /HCO₃⁻) može pretvoriti u manje vodljivu formu kao što je karbonatna kiselina (H₂CO₃), izmjenom kationa alkalnog metala s H₃O⁺ (jednadžba 2.14.). [8]



Ova reakcija vodi do smanjenja provodnosti eluensa. Pri supresiji svi kationi se zamjenjuju protonom pa time proton ima veću molarnu provodnost od ostalih kationa. Supresiju je moguće raditi i elektrolitičkim supresorom koji H⁺ i OH⁻ ione dobiva elektrolizom vode.[3]

➤ DETEKTOR

Kombinacija ionske izmjenjivačke kolone i konduktometrijskog detektora predstavlja najvažniju konfiguraciju ionske kromatografije. [3] Analit se transportira do detektora nakon prolaska kroz supresor. Postoji više kategorija detektora: detektor vodljivosti, amperometrijski,

potenciometrijski, spektrofotometrijski i fluorescentni detektor. [25] Najčešće korišteni detektor u ionskoj kromatografiji je detektor vodljivosti (konduktometrijski detektor), koji se može koristiti uz ili bez supresorskog sustava. [23] Detekcija vodljivosti se temelji na mjerenju otpora, R (mjerna jedinica ohm, Ω), između dvije elektrode unutar protočne ćelije. Recipročna vrijednost otpora naziva se električnom vodljivošću, G , i ima jedinicu siemens, S, po definiciji jednaku Ω^{-1} . [3] Odgovor standardne vodljive ćelije može se opisati *jednadžbom 2.15.*:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\kappa}{K_c} = \frac{\Lambda \cdot c_c}{10^{-3} K_c} \quad (2.15.)$$

Gdje G predstavlja signal konduktivnosti (električna vodljivost), κ električnu provodnost u $S\ m^{-1}$, Λ molarnu provodnost elektrolita u $S\ m^2\ mol^{-1}$, c_c množinsku koncentraciju elektrolita u $mol\ dm^{-3}$, a K_c konstantu konduktometrijske ćelije. [3] Konduktivnost se može mjeriti „direktno“ i „indirektno“. Kod „direktnog“ mjerenja koristi se eluens niske vodljivosti, kao npr. razrijeđena otopina slabe kiseline za anionsku izmjenu, a ioni analita se detektiraju kao pozitivni vrhovi zbog njihove veće granične ekvivalentne ionske vodljivosti u usporedbi s ionom eluensa. S druge strane, „indirektno“ mjerenje uključuje eluens visoke vodljivosti, kao što je razrijeđena otopina jake kiseline ili hidroksida alkalnog metala, pri čemu ioni analita pokazuju nižu graničnu ekvivalentnu vodljivost u odnosu na ion eluensa i stoga se pojavljuju kao negativni vrhovi unutar rezultirajućeg kromatograma. [8]

2.3. Validacija metode

Validacija analitičke metode je važan proces za provjeru prikladnosti analitičke metode za njenu primjenu u određenom analitičkom sustavu. Provjera valjanosti je važan korak u određivanju pouzdanosti i ponovljivosti metode kako bi se ispitalo ispunjava li ona sve potrebne zahtjeve za analitičku primjenu. Pouzdanost analitičkih podataka ovisi o 3 čimbenika, a to su: pouzdanost instrumenata, valjanost metode i stručnost analitičara. Sama metoda validacije može se podijeliti u 2 kategorije validacije: „potpuno validirana“ metoda (međulaboratorijsko vrednovanje) i metoda „jednog laboratorija“ (unutarnje vrednovanje). Kod „potpuno validirane“ metode karakteristike metode su procijenjene od strane više laboratorija preko zajedničkih ispitivanja. Korištenje metode

„jednog laboratorija“ je primjenjivo za osiguranje održivosti prije međulaboratorijskih ispitivanja, kada suradničko ispitivanje nije izvedivo. [28]

Metode široke primjene zahtijevaju međulaboratorijska ispitivanja, koja uključuju 2 ili više laboratorija koja ispituju identičan analitički uzorak uz dogovorene uvjete u svrhu provjere izvedbenih uvjeta ispitivanja. Ovakav pristup validaciji znatno skraćuje opseg posla za buduće laboratorije koji će koristiti određenu validiranu metodu. Kad je neka metoda potrebna u neku svrhu, ali prethodno nije objavljena kao standard koristi se laboratorijski pristup. Također, laboratorijski pristup se koristi kada je metoda potrebna jednom laboratoriju, tada se uz različite uvjete i u različitim vremenskim intervalima analiziraju isti ili različiti uzorci. [29]

U skladu s definicijom u novome mjeriteljskom rječniku VIM 3 (engl. *International Vocabulary of Metrology*), validacija nekog elementa (npr. mjernog postupka, metode) je osiguravanje objektivnih dokaza da taj element udovoljava zahtjevima koji su prikladni za neku jasnu utvrđenu uporabu. Objektivni dokazi su zapisi o provedbi validacijskih eksperimenata. S obzirom da validacijski eksperimenti troše i vrijeme i novac, potrebno je planiranje samog eksperimenta pri čemu postoje 2 kritična koraka:

- prepoznavanje bitnih radnih značajki metode za utvrđenu uporabu te metode
- postavljanje zahtjeva (kriterija) na te značajke, uvažavajući utvrđenu uporabu te metode

Radne značajke su:

- specifičnost/selektivnost
- linearnost
- mjerna preciznost: mjerna ponovljivost, međupreciznost, mjerna obnovljivost
- mjerna istinitost
- granica detekcije
- granica kvantifikacije
- robusnost

Međutim, nije potrebno za svaku uporabu metode ispitati sve radne značajke, već samo one koje su bitne. Laboratorijima u praksi najveći problem predstavlja postavljanje kriterija prihvaćanja na radne značajke metode, a ne njihov odabir. Kriteriji bi se trebali odrediti prije

provedbe validacijskih eksperimenata, uvažavajući sposobnost tumačenja rezultata dobivenih tom metodom, odnosno donošenja ispravnih odluka na temelju tih rezultata. [30]

➤ **Specifičnost/selektivnost**

Specifičnost /selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Za razliku od specifične metode kojom se može odrediti samo jedan specifičan analit, selektivnom metodom se može odrediti više komponenata istodobno. Selektivnost je nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda. [31] Selektivnost pokazuje koliko se danom metodom može odrediti željenog analita uz interferenciju drugih tvari sa sličnim karakteristikama (izomeri, produkti razgradnje, metaboliti). Selektivnost je potrebno procjenjivati tijekom validacije metode, a ukoliko nije moguće postići zadovoljavajuću selektivnost, odnosno specifičnost određene metode prema nekom analitu, potrebno je koristiti dvije ili više metoda kako bi se postigla potrebna razina razlikovanja analita i interferencija.[32]

➤ **Linearnost**

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala (najmanje 5 koncentracijskih razina uz 3 ponavljanja) te se može procijeniti matematički i grafički. Matematička procjena se radi preko jednadžbe pravca linearne regresije prikazane *jednadžbom 2.16.:*

$$y = ax + b \quad (2.16.)$$

u kojoj imamo y -os i x -os, dok je a nagib pravca, b odsječak na y -osi

Pritom se računa i koeficijent determinacije, R^2 , uz kriterij: $R^2 \geq 0.99$. Nagib pravca, a , ukazuje na osjetljivost metode, dok odsječak pravca, b , može ukazati na sustavnu pogrešku. Grafičkim prikazom prikazuju se odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili

logaritmu koncentracije - za linearna područja odstupanja su jednoliko raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti. [33]

➤ Preciznost

Preciznost se određuje kao izraz slaganja niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo: preciznost pod uvjetima ponovljivosti (jedan laboratorij, isti analitičar, ista aparatura, kratko razdoblje), međupreciznost (u istom laboratoriju u duljem razdoblju, različit analitičar, različiti instrumenti i kemikalije) i preciznost u uvjetima obnovljivosti. [32,34] Preciznost pod uvjetima obnovljivosti izvodi se pod propisanim, unaprijed određenim uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima u istom laboratoriju. [34]

Taj se parametar određuje u svrhu normiranja metode i rijetko je sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij. Eksperimentima preciznosti se kvantificiraju slučajne pogreške metode, a numerički je pokazatelj standardna devijacija, koeficijent varijacije ili varijanca. [31] Standardna devijacija i koeficijent varijacije se računaju prema *jednadžbama 2.17. i 2.18.*:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.17.)$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.18.)$$

gdje je s standardna devijacija, RSD koeficijent varijacije, n ukupni broj podataka u uzorku, x_i izmjerena vrijednost i -tog mjerenja, \bar{x} srednja vrijednost n mjerenja. [33] Za koncentracije u rasponu 10 do 100 ppm kao kriterij preciznosti uzimaju se vrijednosti koeficijenta varijacije, RSD : $RSD \leq 5\%$. [28]

➤ Istinitost (točnost)

Istinitost metode (točnost) definira se kao razlika između eksperimentalno izmjerene vrijednosti i prave, odnosno referentne vrijednosti. Numerički pokazatelj istinitosti metode je mjerno odstupanje (razlika između eksperimentalno izmjerene i referentne vrijednosti). Mjerno

odstupanje (engl. *bias*) može se izraziti u apsolutnoj vrijednosti, kao relativna vrijednost u postocima, b (%), te kao relativni analitički povrat, R (%), prikazano *jednadžbama 2.19 i 2.20.* :

$$b (\%) = \frac{x_i - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (2.19.)$$

$$R (\%) = \frac{x_i}{x_{ref}} \times 100 \quad (2.20.)$$

gdje je x_{ref} referentna, odnosno prava vrijednost i x_i eksperimentalno izmjerena vrijednost. [33]

Analitički povrat (engl. *recovery*) predstavlja postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. [34]

Drugi način za utvrđivanje točnosti je usporedba rezultata ispitivanja dobivenih novom metodom i rezultata dobivenih iz postojeće metode za koju se zna da je točna. Kao kriterij prihvaćanja točnosti uzima se vrijednost analitičkog povrata, R , u rasponima: 80-110 % (koncentracija od 10 ppm), 80-120 % (koncentracije ispod 1 ppm), 90-107% (koncentracije iznad 100 ppm). [28]

➤ **Granica detekcije i kvantifikacije**

Granica detekcije (engl. *limit of detection*) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*) je pak najmanja količina analita koja se može kvantitativno odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Postoji nekoliko različitih pristupa za određivanje granice detekcije:

- vizualnom metodom – analizom uzorka s poznatom koncentracijom analita određuje se najmanja količina analita koja se može detektirati
- metodom omjera signal/ šum – usporedbom izmjerenog signala uzorka s poznatom koncentracijom analita s izmjerenim signalom slijepe probe
- statističkom metodom – temeljeno na standardnoj devijaciji odgovora i nagiba kalibracijske krivulje.

Statistički se granice detekcije i kvantifikacije određuju na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema *jednadžbama 2.21. i 2.22.* :

$$GD = \frac{3.3 * \sigma}{a} \quad (2.21.)$$

$$GK = \frac{10 * \sigma}{a} \quad (2.22.)$$

gdje vrijednost 3.3, odnosno 10 predstavlja faktor s kojim se množi vrijednost standardne devijacije, σ , što se zatim dijeli s nagibom kalibracijske krivulje, a . Standardna devijacija računa se iz kalibracijske krivulje dobivene analizom uzoraka koje sadrže analit u rasponu granice detekcije, pri čemu se koristi standardna devijacija pravca ili odsječka na osi y . Parametar granice kvantifikacije je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima, koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš. [33]

➤ **Robusnost**

Robusnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati se kvantitativna promjena rezultata. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode [31, 32]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom poglavlju dan je pregled korištenih kemikalija i reagensa, instrumenata i opreme, metoda rada i potrebnih uvjeta za izvedbu eksperimenta.

3.1. Kemikalije i reagensi

U tablici 3.1. navedene su sve potrebne kemikalije i soli za pripremu otopina standarda.

Tablica 3.1. Popis korištenih kemikalija i soli

Kemikalija	Formula	CAS broj	Čistoća	Proizvođač	Država
metansulfonska kiselina	CH ₃ SO ₃ H	75-75-2	otopina, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
karbonatni/ bikarbonatni pufer	CO ₃ ²⁻ / HCO ₃ ⁻	497-19-8	koncentrat, visoki stupanj čistoće	Thermo Fisher	SAD
magnezijev klorid	MgCl ₂	7786-30-3	bezvodan(praškast), ≥98.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
natrijev klorid	NaCl	7647-14-5	bezvodan(praškast), ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
amonijev klorid	NH ₄ Cl	12125-02-9	praškast, ≥99.5 %	Sigma-Aldrich	SAD
kalcijev klorid	CaCl ₂	10043-52-4	praškast, ≥96.0 %	Sigma - Aldrich	SAD
kalijev klorid	KCl	7447-40-7	praškast, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
kalijev bromid	KBr	7758-02-3	praškast, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
natrijev fosfat	Na ₃ PO ₄	7601-54-9	krutina, ≥96.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
kalijev fluorid	KF	7789-23-3	praškast, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
natrijev nitrit	NaNO ₂	7632-00-0	praškast, ≥97.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
natrijev sulfat	Na ₂ SO ₄	7757-82-6	praškast, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
natrijev nitrat	NaNO ₃	7631-99-4	praškast, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	SAD
litijev karbonat	Li ₂ CO ₃	554-13-2	10 ppm Li ⁺ u 0.1 % HNO ₃ ; ≥99.9 %	Inorganic Ventures	SAD

3.2. Popis instrumenata i opreme

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištena je sljedeća analitička oprema:

- analitička vaga Sartorius, model A-120S, SAD
- tehnička vaga KERN, model PRJ 1200-3N, Njemačka
- filtracijski sustav za proizvodnju ultračiste vode bez organskih tvari Mili Q, Reagent Grade Water System, Milipore Co.
- ionski kromatografski sustav Dionex ICS- 3000 sa pripadajućim komponentama, Thermo Fisher, SAD
- anion-izmjenjivačka kromatografska kolona Dionex IonPac AS22, 2x250 mm, Thermo Fisher, SAD
- kation-izmjenjivačka kromatografska kolona Dionex IonPac CS12A, 4x250 mm, Thermo Fisher, SAD
- sušionik Instrumentaria, model ST- 05, Zagreb

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema otopina soli za pripremu standardnih otopina

Za pripremu vodenih otopina kationa korištene su sljedeće soli: MgCl_2 , NaCl , NH_4Cl , CaCl_2 , KCl , a za pripremu vodenih otopina aniona soli: KBr , Na_3PO_4 , KF , KCl , NaNO_2 , Na_2SO_4 , NaNO_3 . Za pripremu vodenih otopina soli koncentracije 1000 ppm odvagane su potrebne mase tih soli, ali prije same odvage soli su osušene u sušioniku 2 h na 105°C .

Primjer izračuna potrebne mase MgCl_2 za pripremu otopine soli Mg^+ :

$$m(\text{MgCl}_2) = ?$$

$$\gamma(\text{Mg}^{2+}) = 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 1000 \text{ ppm}$$

$$V(\text{tikvice}) = 100 \text{ mL} = 100 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$M(\text{Mg}) = 24.305 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{Cl}) = 35.453 \text{ g/mol}$$

$$\gamma(\text{Mg}^{2+}) = \frac{m(\text{Mg}^{2+})}{V_{ot}} \rightarrow m(\text{Mg}^{2+}) = \gamma(\text{Mg}^{2+}) \cdot V_{ot} = 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{L} = 100 \text{ mg}$$

$$w(\text{Mg}^{2+}) = \frac{M(\text{Mg})}{M(\text{MgCl}_2)} = \frac{24.305 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{24.305 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 2 \cdot 35.453 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0.255$$

$$w(\text{Mg}^{2+}) = \frac{m(\text{Mg}^{2+})}{m(\text{MgCl}_2)} \rightarrow m(\text{MgCl}_2) = \frac{m(\text{Mg}^{2+})}{w(\text{Mg}^{2+})} = \frac{100 \text{ g}}{0.255} = 391.7342 \text{ mg}$$

U tablici 3.2. i 3.3. su prikazane potrebne odvage soli za pripremu otopina soli kationa/aniona čija koncentracija iznosi $\gamma=1000$ ppm.

Tablica 3.2. Potrebe odvage soli za pripremu otopina kationa

sol	MgCl ₂	NaCl	NH ₄ Cl	CaCl ₂	KCl
kation	Mg ²⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Ca ²⁺	K ⁺
γ / ppm	1000	1000	1000	1000	1000
$m(\text{sol}) / \text{mg}$	391.7342	254.1975	296.4860	276.8962	190.6650

Otopina Li⁺ kationa je jedina koja se ne dobiva otapanjem soli, već iz otopine Li₂CO₃, čistoće ≥ 99.9 %.

Tablica 3.3. Potrebne odvage soli za pripremu otopina aniona

sol	KBr	Na ₃ PO ₄	KF	KCl	NaNO ₂	Na ₂ SO ₄	NaNO ₃
anion	Br ⁻	PO ₄ ³⁻	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻
γ / ppm	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
$m(\text{sol}) / \text{mg}$	148.9362	172.6229	305.7895	210.2962	149.9674	147.8659	137.0747

Nakon odvage, svaki je uzorak soli pojedinačno otopljen dodatkom Mili Q vode u tikvici od 100 mL.

3.3.2. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine pripremljene su iz temeljnih standardnih otopina, TSO, kationa i aniona pripadajućeg volumena što je prikazano u *tablici 3.4. i 3.5.*

Tablica 3.4. Koncentracija temeljnih standardnih otopina kationa uz pripadajući volumen potreban za pripremu standardnih otopina

Kation	TSO / ppm	V(TSO) / mL
Ca ²⁺	1000	10
Mg ²⁺	1000	10
NH ₄ ⁺	1000	1
K ⁺	1000	10
Na ⁺	1000	10
Li ⁺	1000	1

Tablica 3.5. Koncentracija temeljnih standardnih otopina aniona uz pripadajući volumen potreban za pripremu standardnih otopina

Anion	TSO / ppm	V(TSO) / mL
Br ⁻	1000	10
PO ₄ ³⁻	1000	10
NO ₃ ⁻	1000	10
NO ₂ ⁻	1000	10
Cl ⁻	1000	10
SO ₄ ²⁻	1000	10
F ⁻	1000	10

Za pripremu standardnih otopina uzet je volumen od 10 mL pripremljenih TSO u odmjernejoj tikvici od 100 mL, dok je ostatak tikvice do oznake nadopunjen Mili Q vodom. Jedini izuzetak su temeljne standardne otopine Li⁺ i NH₄⁺ koje su dodane u drugom volumenu.

Na taj način su pripremljene po 3 standardne otopine (za katione i anione), SO, koncentracije $\gamma(\text{SO})=100$ ppm, a tikvice su označene kao K^+ mix i A^- mix. Iz pripremljenih standardnih otopina, K^+ i A^- mix su dalje pripremljene po 3 radne standardne otopine, RSO, za svaku koncentraciju u vijalama od 5 mL. Raspon koncentracija RSO i potrebni volumeni SO za pripremu RSO prikazani su u *tablici 3.6*.

Tablica 3.6. Raspon koncentracija radnih standardnih otopina i potrebni volumeni standardnih otopina za njihovu pripremu

$\gamma(\text{RSO})/\text{ppm}$	10	20	30	50	70	100
$V(\text{SO})/\text{mL}$	0.5	1	1.5	2.5	3.5	5

Primjer računa za izračun potrebnog volumena standardne otopine, SO, za pripremu radne standardne otopine, RSO:

$$\gamma_1(\text{SO}) = 10 \text{ ppm}$$

$$V_1(\text{SO}) = 5 \text{ mL}$$

$$\gamma_2 = 100 \text{ ppm}$$

$$V_2 = ?$$

$$\gamma_1 \cdot V_1 = \gamma_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{\gamma_1 \cdot V_1}{\gamma_2} = \frac{10 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} = 0.5 \text{ mL}$$

Redom su uzeti volumeni standardne otopine A^- i K^+ mix-a od 0.5/1/1.5/2.5/3.5/5 mL u vijalama od 5 mL te su vijale nadopunjene Mili Q vodom, redom volumenima 4.5/4/3.5/2.5/1.5/0 mL. Pripremljena su po 3 uzorka za svaku koncentraciju radnih standardnih otopina.

Dodatno, pripremljene su radne standardne otopine litija, Li^+ , izravnim uzimanjem volumena standardne otopine Li_2CO_3 u kojoj je koncentracija litijevih iona $\gamma(\text{Li}^+)=10$ ppm (*tablica 3.7.*).

Tablica 3.7. Raspon koncentracija radnih standardnih otopina litija i potrebni volumeni standardne otopine Li₂CO₃ za njihovu pripremu

$\gamma(\text{RSO}) / \text{ppm}$	1	2	3	5	7	10
$V(\text{Li}_2\text{CO}_3) / \text{mL}$	0.5	1	1.5	2.5	3.5	5

3.3.3. Priprema mobilnih faza

a) Priprema otopine metansulfonske kiseline, MSA

Izračunata je potrebna masa MSA za pripremu otopine $c(\text{MSA}) = 2 \text{ mM}$ u tikvici od 2 L.

$$c(\text{MSA}) = 20 \text{ mM} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V = 2 \text{ L}$$

$$M(\text{MSA}) = 96.10 \text{ g/mol}$$

$$m(\text{MSA}) = ?$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = 20 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot 2 \text{ L} = 0.04 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \rightarrow m = n \cdot M = 0.04 \text{ mol} \cdot 96.10 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3.844 \text{ g}$$

Za pripremu otopine metansulfonske kiseline, MSA odvagana je masa $m = 3.844 \text{ g}$ metansulfonske kiseline čistoće $\geq 99.0 \%$, potom je prebačena u tikvicu od 2 L koja je do oznake nadopunjena Mili Q vodom.

b) Priprema karbonatnog pufera

$$V_1(\text{karbonatni koncentrat}) = ?$$

$$c_1(\text{karbonatni koncentrat}) = 450 \text{ mM}$$

$$V_2(\text{karbonatni pufer}) = 2 \text{ L} = 2000 \text{ mL}$$

$$c_2(\text{karbonatni pufer}) = 4.5 \text{ mM}$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{4.5 \text{ mM} \cdot 2000 \text{ mL}}{450 \text{ mM}} = 20 \text{ mL}$$

Za pripremu otopine karbonatnog pufera koncentracije 4.5 mM otpipetiran je volumen od 20 mL koncentrata karbonata u odmjerne tikvici od 2 L je, a ostatak do oznake na tikvici je nadopunjen Mili Q vodom.

3.3.4. Uvjeti i karakteristike potrebne za provedbu eksperimenta

Da bi se uspješno mogli razdvojiti anioni i kationu unutar kromatografskog sustava bilo je potrebno postići odgovarajuće uvjete za svaku od dviju kolona. Pripadajuća mobilna faza za razdvajanje aniona je karbonatni pufer, a razdvajanje se odvija u koloni Dionex IonPac AS22, dok je za razdvajanje kationa mobilna faza MSA u Dionex IonPac CS12A koloni. Sve potrebne karakteristike za kromatografsko razdvajanje, uz odgovarajuću mobilnu fazu, navedene su u *tablici 3.8. i 3.9.*

Tablica 3.8. Uvjeti za provedbu kromatografske analize

	KARBONATNI PUFER	MSA
kromatografska kolona	Dionex IonPac AS22, 2x250 mm	Dionex IonPac CS12A, 4x250 mm
način eluiranja	izokratno	izokratno
protok	0.3 mL/min	0.75 mL/min
koncentracija	4.5 mM	20 mM
vrsta supresora	AERS_Carbonate_2mm	CERS_2mm
struja supresora	11 mA	44 mA

Tablica 3.9. Karakteristike kromatografskih kolona

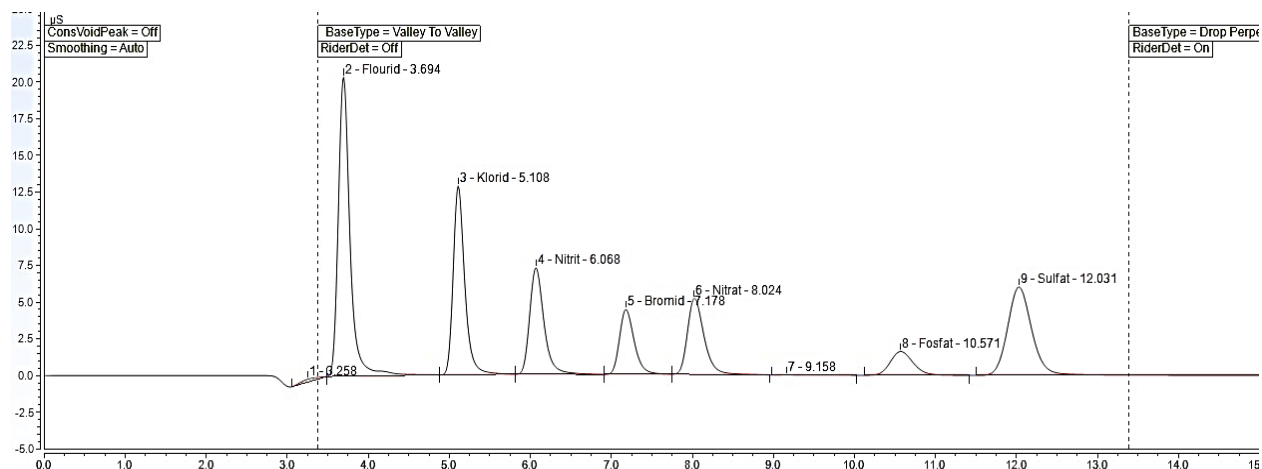
	Dionex IonPac AS22	Dionex IonPac CS12A
duljina / mm	250	250
promjer / mm	2	4
vrsta izmjene	anionska	kationska
vrsta materijala	polimer	polimer
konstrukcijski materijal	PEEK	PEEK
funkcionalna skupina	kvaterni amonijev ion	karboksilna i fosfonska kiselina
izmjenjivački kapacitet / μeq	52,5	2800
pH raspon	0-14	-
max. tlak / bar	207	275
protok / mL/min	1.2- 2.5	1.0- 2.0

4. REZULTATI I RASPRAVA

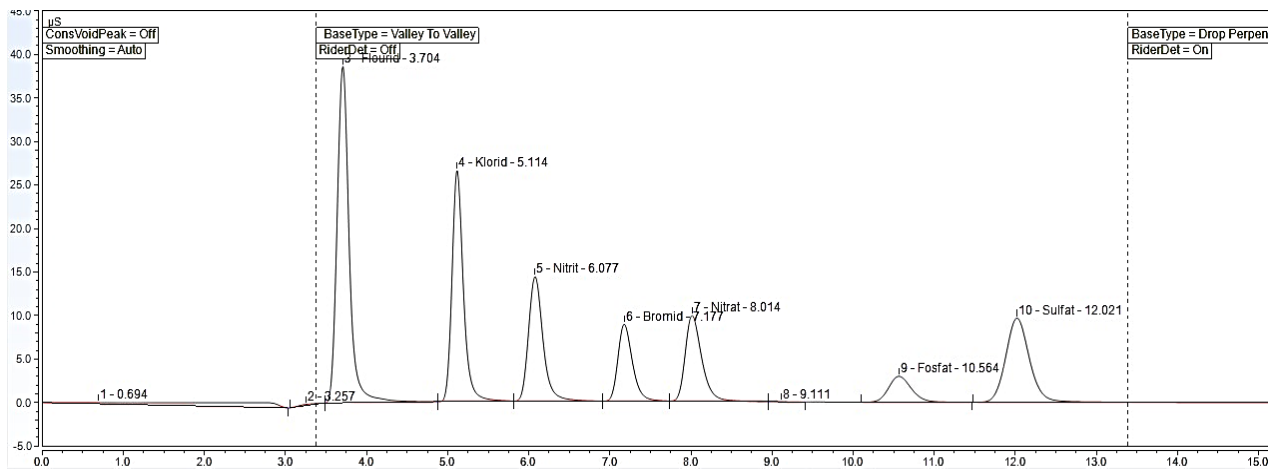
U ovom radu provedena je validacija metode ionske kromatografije za određivanje anorganskih kationa i aniona. U ovom poglavlju dan je pregled rezultata razdvajanja aniona i kationa prikazanih na kromatogramima te pregled dobivenih parametara validacije.

4.1. Rezolucija kromatografskih metoda

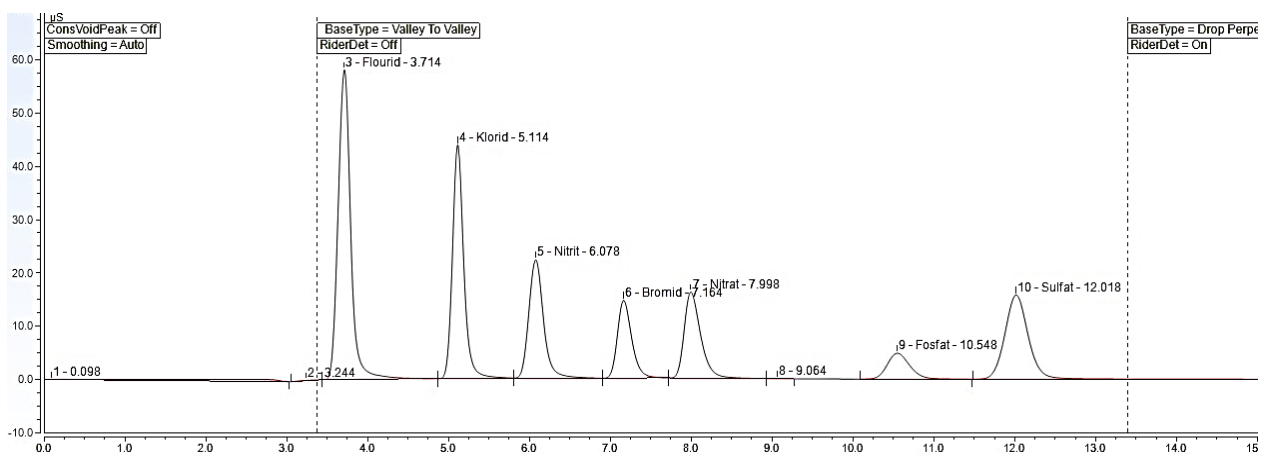
Kvaliteta razdvajanja aniona i kationa iz smjese kromatografskom analizom prikazana je na kromatogramima (slika 4.1. - 4.12.). Kvaliteta razdvajanja vidljiva je iz rezolucije pika, koja ovisi o širini pika i vremenu zadržavanja. Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) unutar kromatografske kolone različito je za svaki ion, što omogućuje njihovo međusobno i nastajanje karakterističnih pikova za svaki ion na kromatogramu (slika 4.1. - 4.12.).



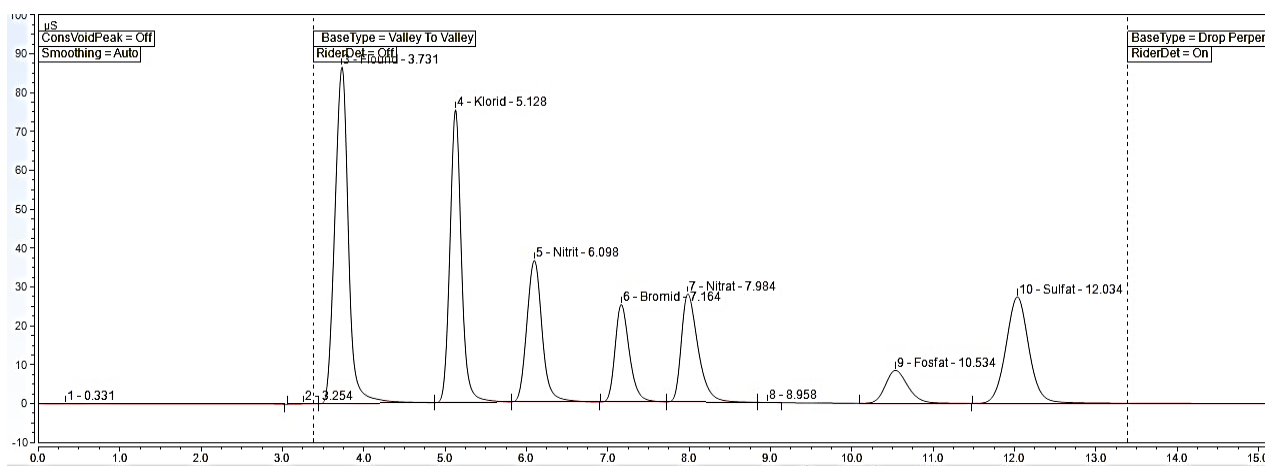
Slika 4.1. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 10 ppm-a



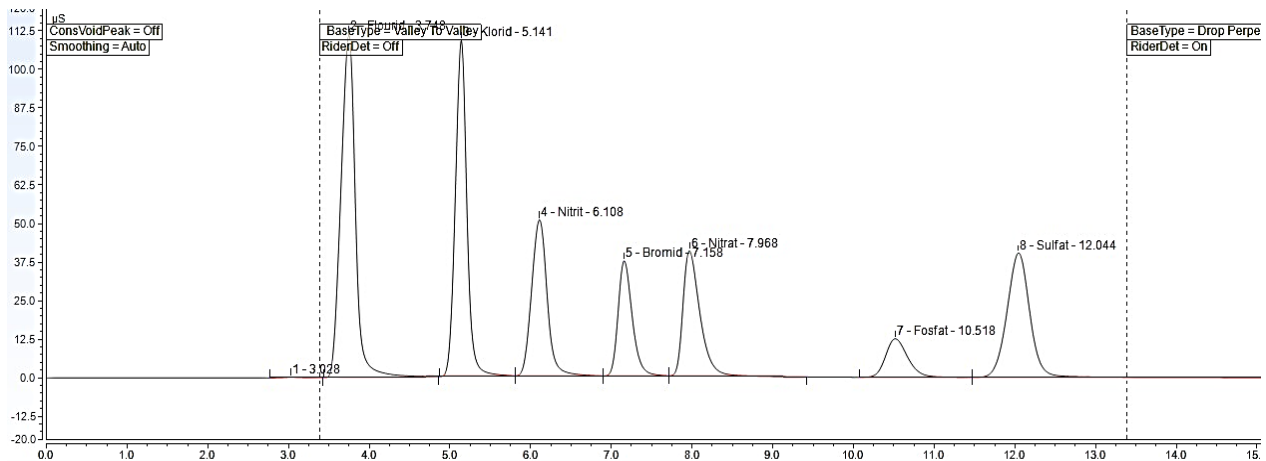
Slika 4.2. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 20 ppm-a



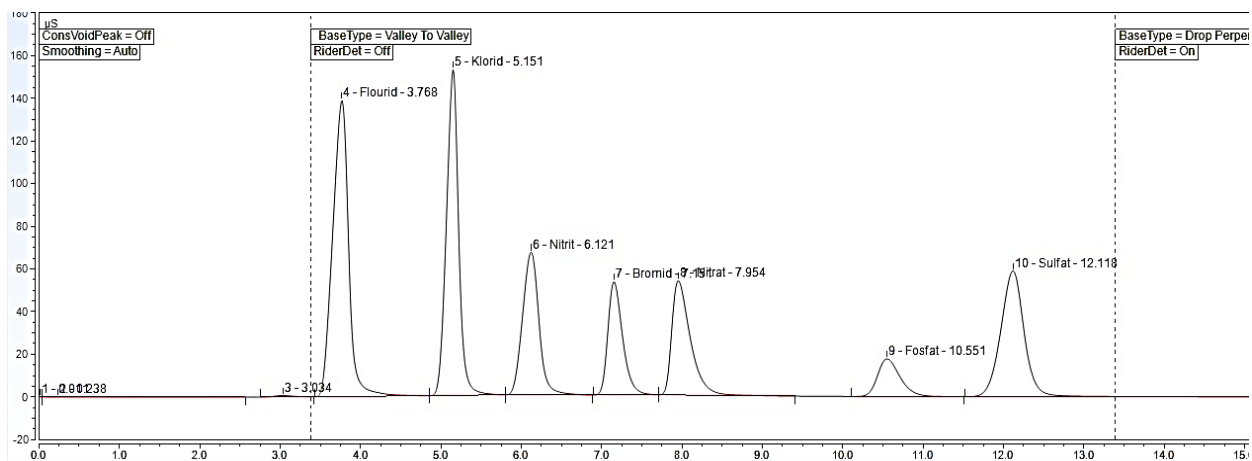
Slika 4.3. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 30 ppm-a



Slika 4.4. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 50 ppm-a



Slika 4.5. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 70 ppm-a

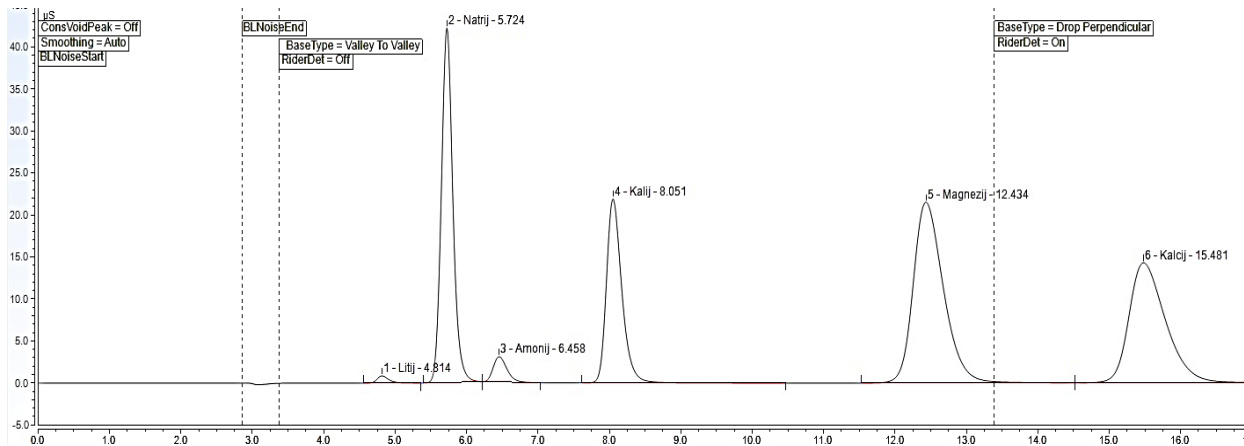


Slika 4.6. Kromatogram za smjesu aniona koncentracije 100 ppm-a

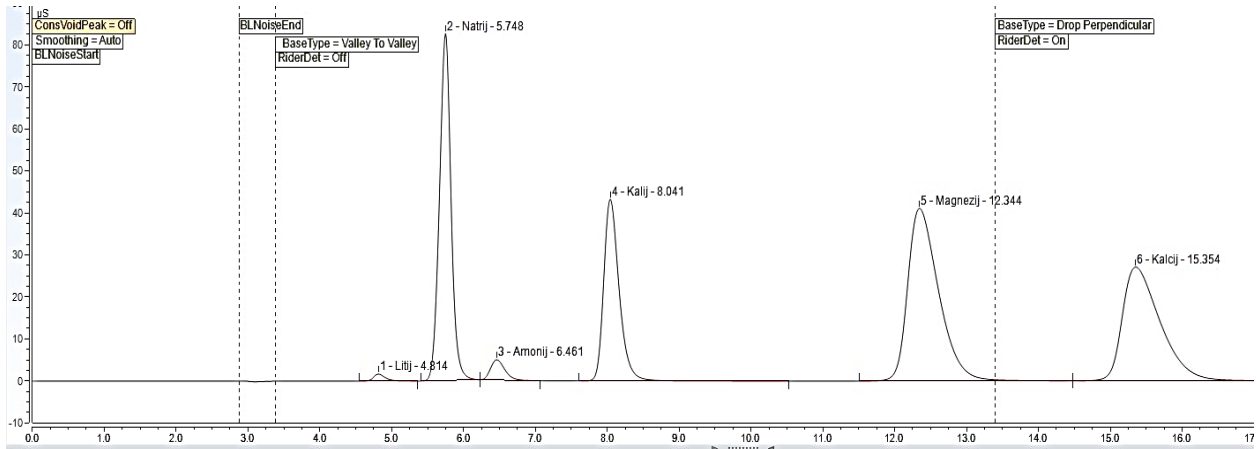
Na slici 4.1. do 4.6. su prikazani kromatogrami iz kojih je vidljiv redosljed razdvajanja aniona: fluorida, klorida, nitrita, bromida, nitrata, fosfata i sulfata. Kao i za anione, razdvajanje kationa je prikazano na slici 4.7. do 4.12.. Svaki pik na kromatogramu odgovara po jednom od spomenutih aniona, odnosno kationa iz početne smjese, a visina i širina pika su različite za svaki ion. Visina pika, odnosno površina ispod pika za svaki ion, proporcionalna je količini tog iona u uzorku. Sukladno tome, u smjesi aniona najveća je površina ispod pika kod fluorida i klorida, što je vidljivo na slici 4.1. do 4.6. S druge strane, u smjesi kationa najveću površinu ispod pika imaju natrij, magnezij i kalcij (slika 4.7. – 4.12.).

Širina pika se povećava s povećanjem vremena zadržavanja unutar kolone. Kod fosfata i sulfata, u smjesi aniona, prisutan je tzv. „*peak tailing*“, odnosno izduljenje druge polovice pika i nastajanje „repa“ zbog većeg vremena zadržavanja tih iona unutar kolone. Anioni koji imaju manje vrijeme zadržavanja unutar kolone obično imaju uže i simetričnije pikove, kao npr. fluorid i klorid (slika 4.1. – 4.6.). Slično kao fosfat i sulfat, magnezij i kalcij, također, imaju šire pikove i prisutan je tzv. „*peak tailing*“ (slika 4.7. – 4.12.).

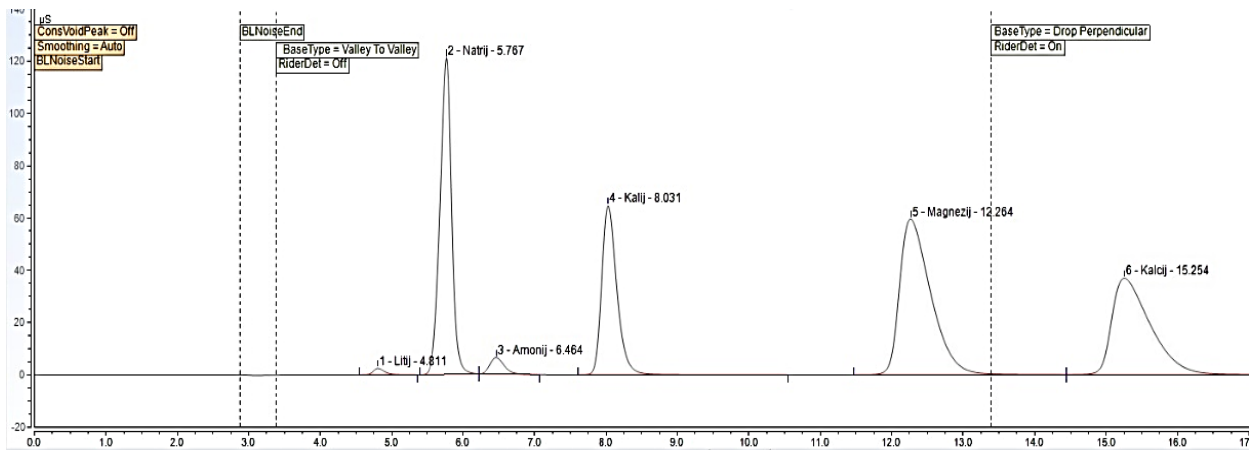
Općenito, ioni manje veličine (radijusa) i manjeg naboja imaju manje vrijeme zadržavanja u koloni. Iz prikazanih kromatograma (slika 4.1. – 4.6.) fluorid se prvi izdvaja jer ima manji naboj i radijus u odnosu na ostale anione, a fosfat i sulfat se zadnji izdvajaju jer imaju veći naboj i radijus. U slučaju kationa (slika 4.7. – 4.12.), magnezij i kalcij imaju veći naboj i radijus od ostalih kationa što produljuje njihovo vrijeme zadržavanja unutar kolone.



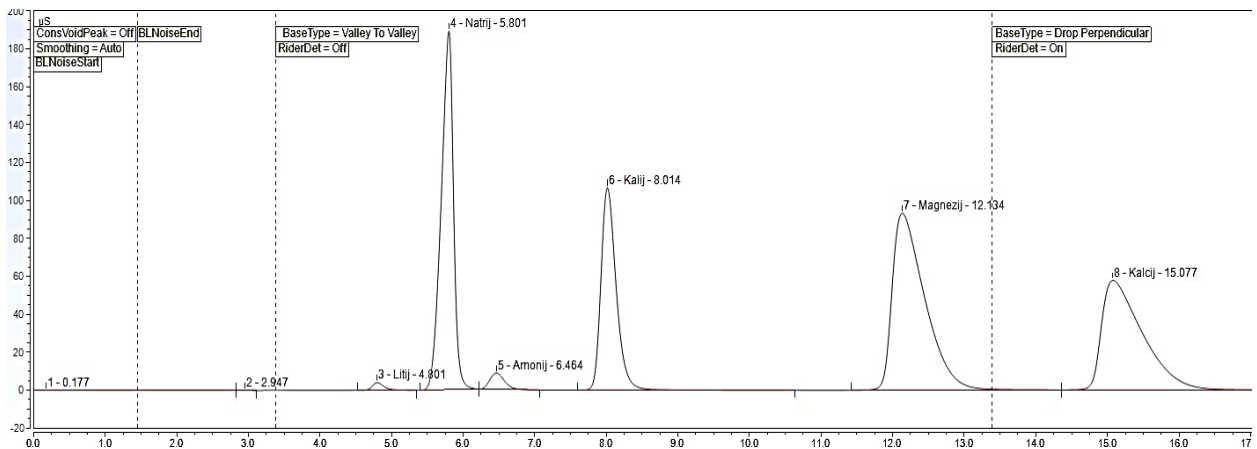
Slika 4.7. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 10 ppm-a



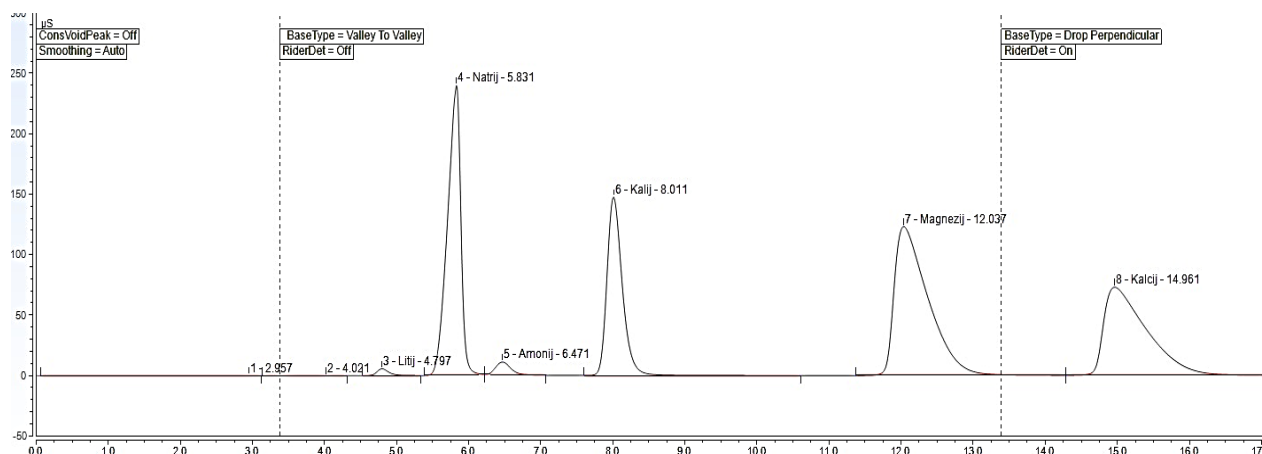
Slika 4.8. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 20 ppm-a



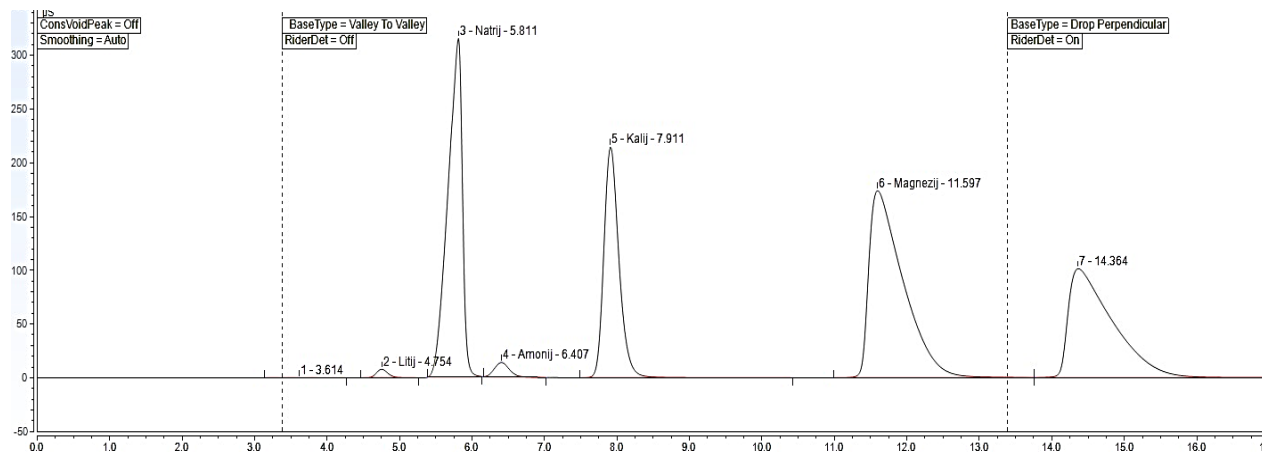
Slika 4.9. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 30 ppm-a



Slika 4.10. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 50 ppm-a



Slika 4.11. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 70 ppm-a



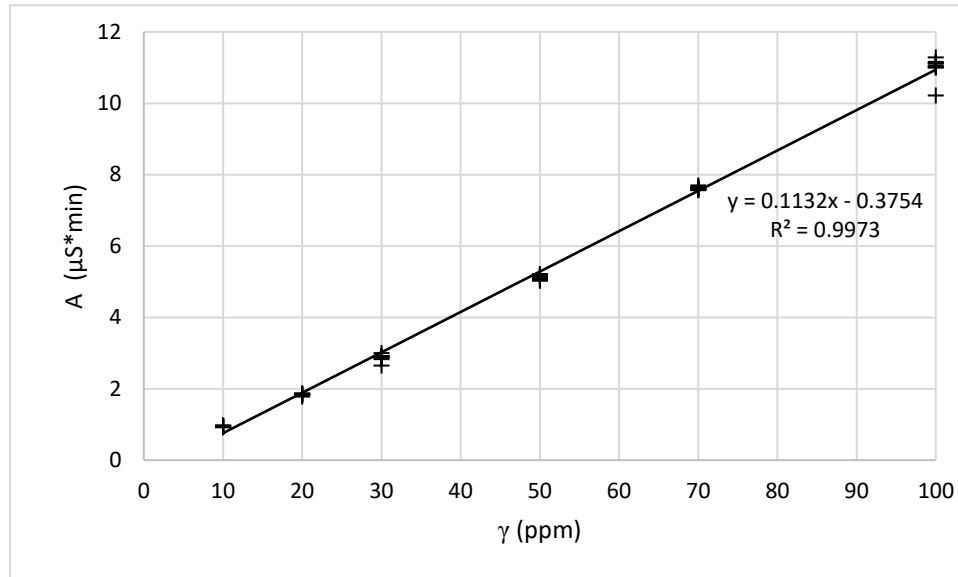
Slika 4.12. Kromatogram za smjesu kationa koncentracije 100 ppm-a

4.2. Validacija kromatografske metode

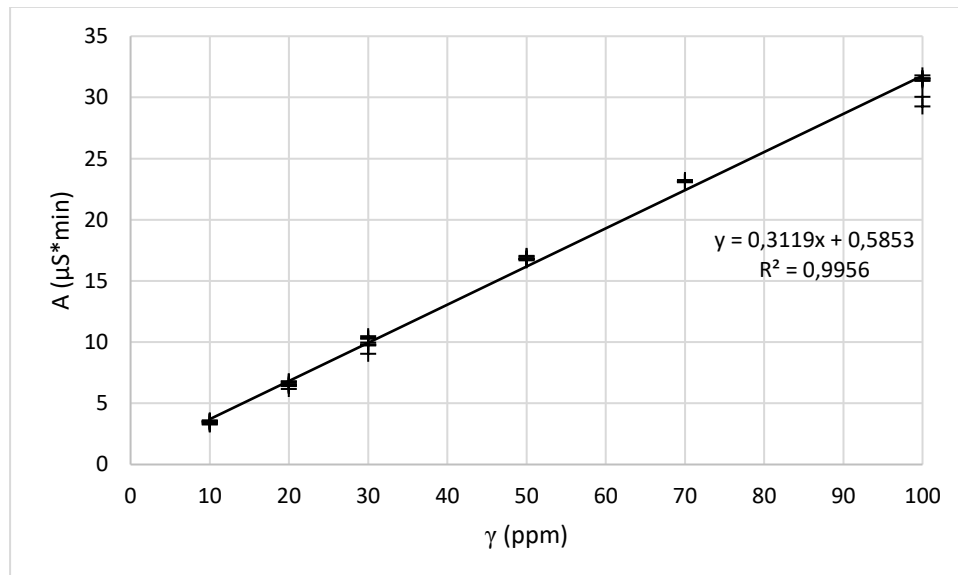
Za analizu aniona i kationa razvijena je i validirana metoda na ionskom kromatografu. Određene su linearnost, točnost i preciznost metoda te njihove granice kvantifikacije i detekcije. Granice kvantifikacije i detekcije određene su računski primjenom *jednadžbe 2.21.* i *2.22.* uz korištenje standardne devijacije uzorka najniže koncentracije pojedinog analita.

4.2.1. Linearnost

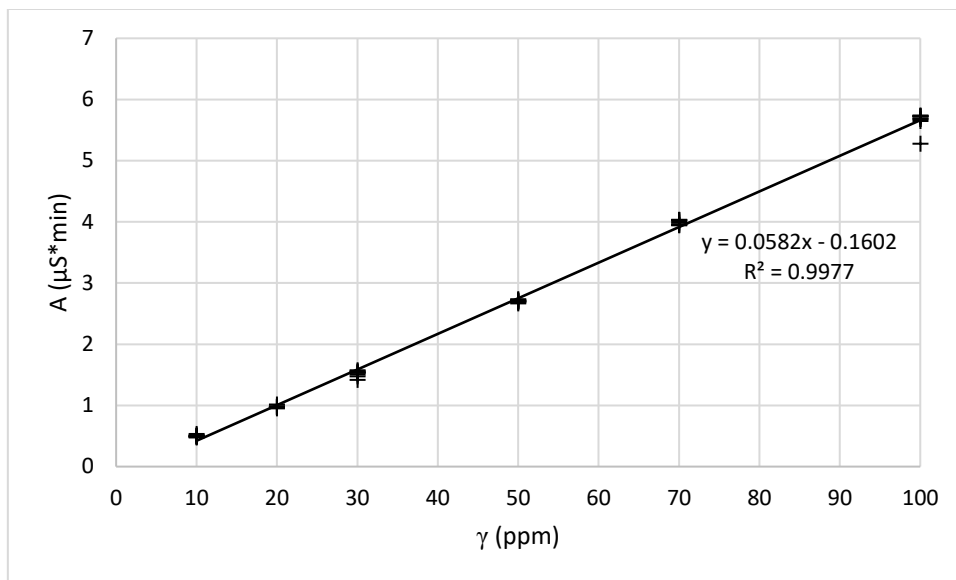
Linearnost je određena preko kalibracijskog pravca. Na *slici 4.13.* je prikaz kalibracijski pravac za bromid u području koncentracija od 10 do 100 ppm.



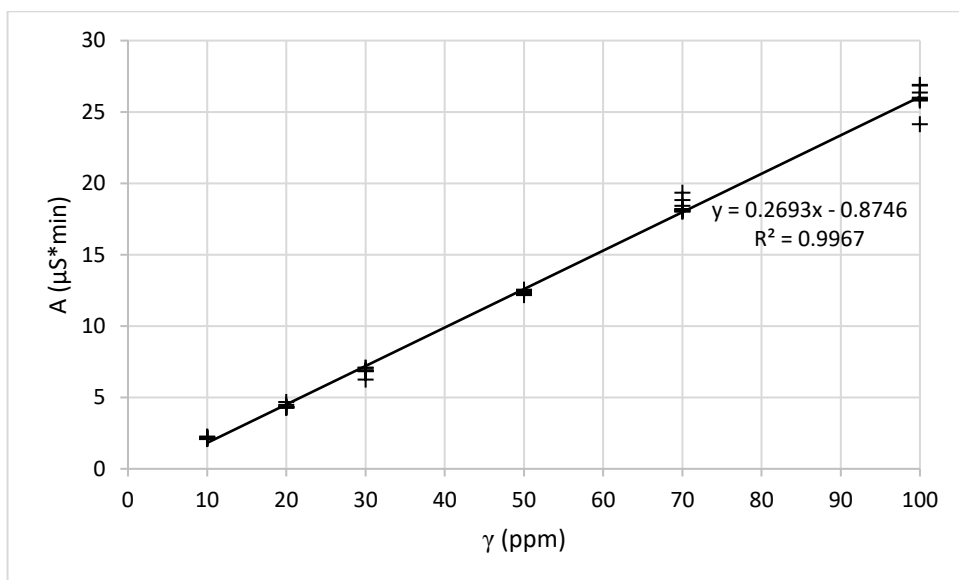
Slika 4.13. Kalibracijski dijagram za Br^-



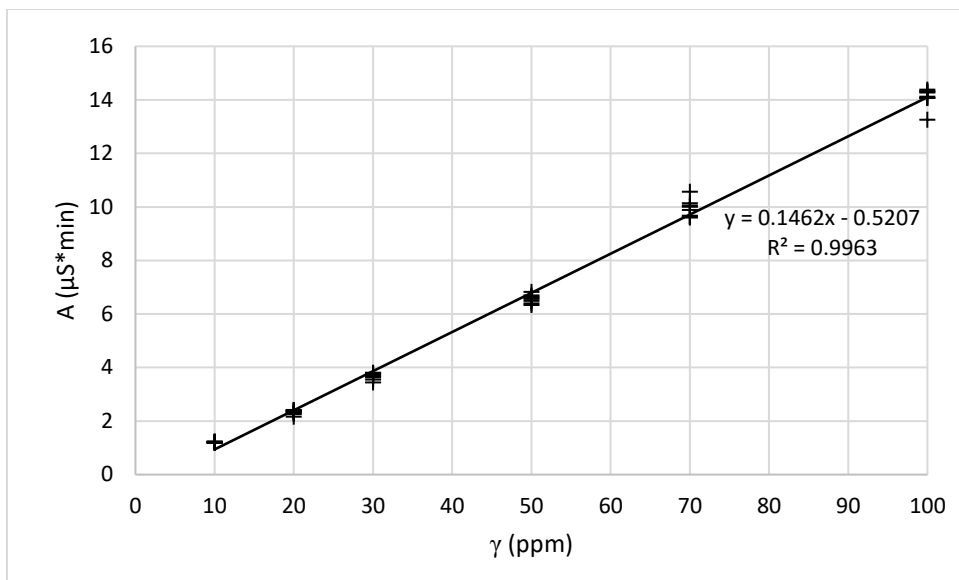
Slika 4.14. Kalibracijski dijagram za F^-



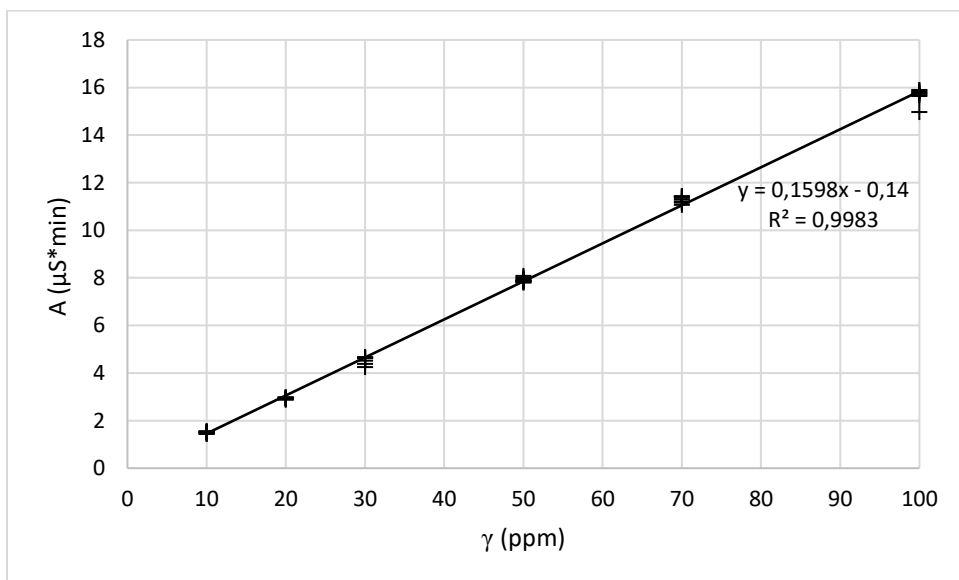
Slika 4.15. Kalibracijski dijagram za PO_4^{3-}



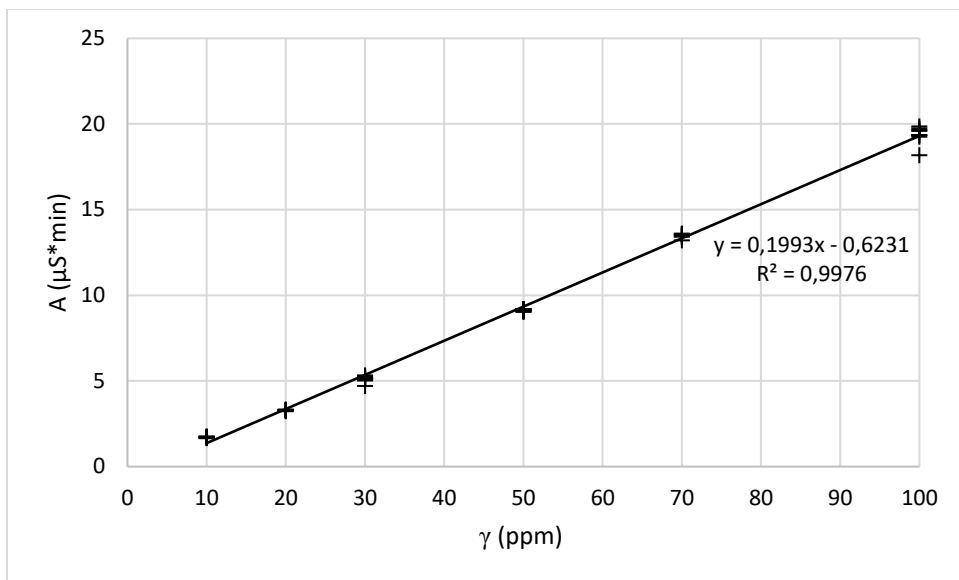
Slika 4.16. Kalibracijski dijagram za Cl^-



Slika 4.17. Kalibracijski dijagram za NO_3^-

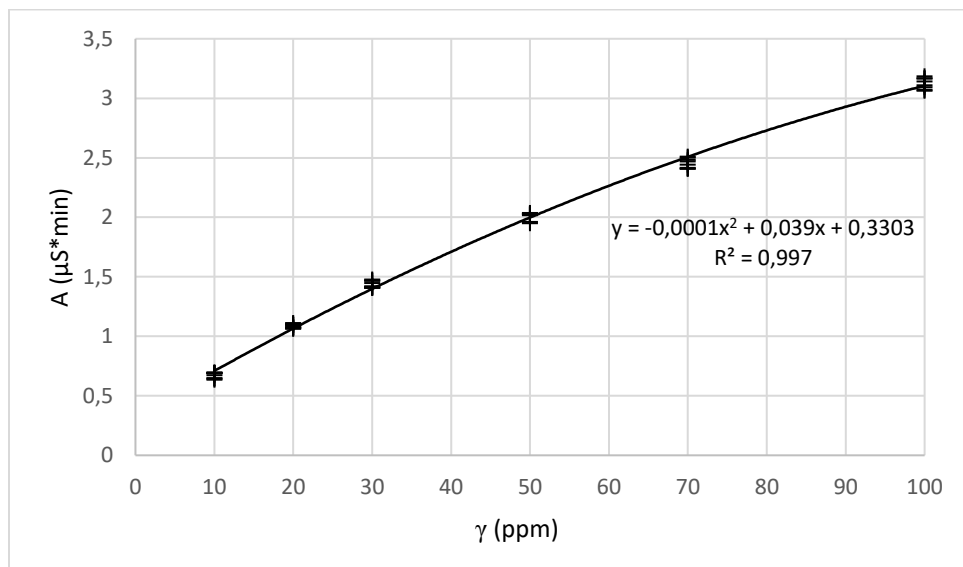


Slika 4.18. Kalibracijski dijagram za NO_2^-

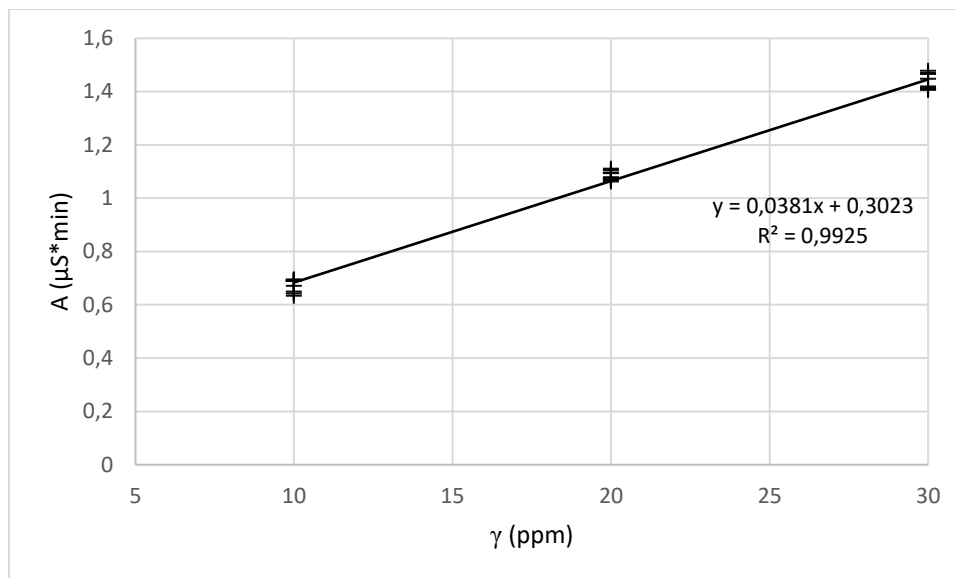


Slika 4.19. Kalibracijski dijagram za SO₄²⁻

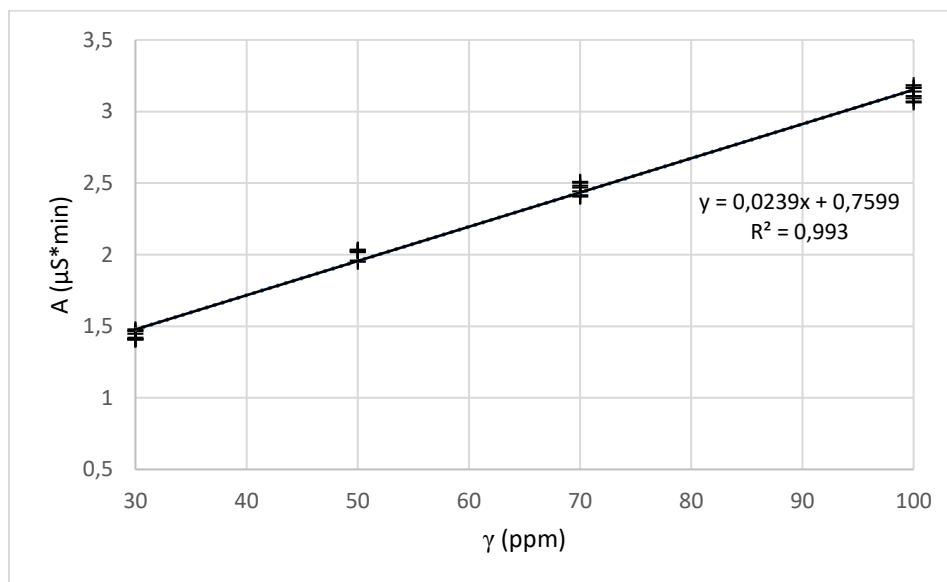
Iz kalibracijskih dijagrama bromida, fluorida, fosfata, klorida, nitrata, nitrita i sulfata (*slika 4.13.-4.19.*) vidljivo je da koeficijent determinacije, R^2 , za navedene anione zadovoljava uvjet: $R^2 \geq 0,99$. Kriterij linearnosti za anione je zadovoljen.



Slika 4.20. Kalibracijski dijagram za NH₄⁺



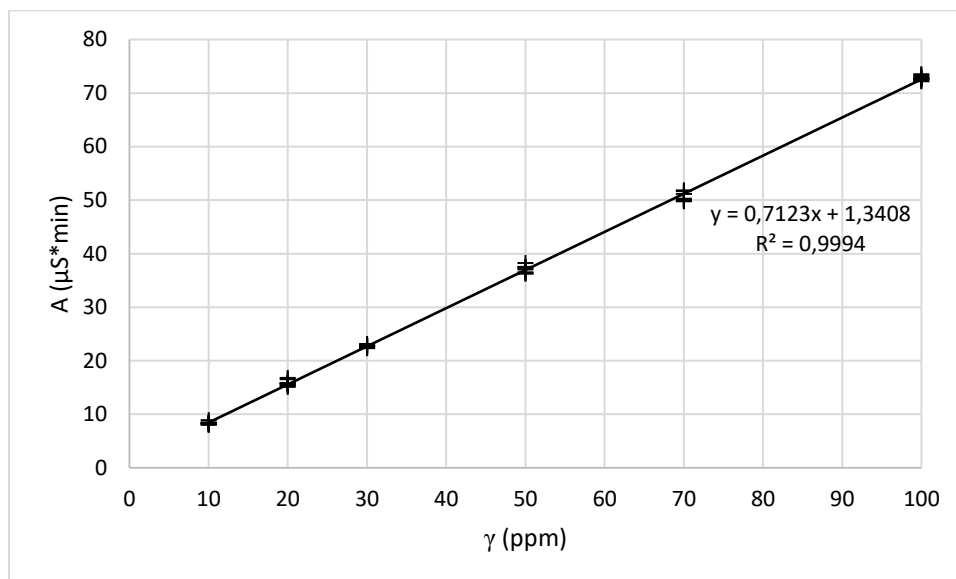
Slika 4.21. Kalibracijski dijagram za NH_4^+ pri manjim koncentracijama



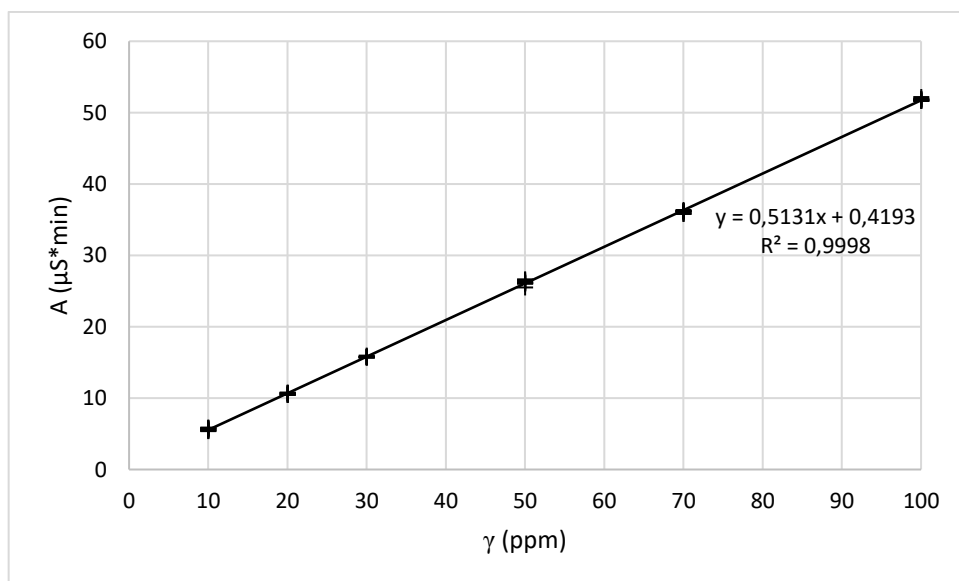
Slika 4.22. Kalibracijski dijagram za NH_4^+ pri većim koncentracijama

Na slici 4.20. je prikazan kalibracijski dijagram za amonij, iz kojeg se može vidjeti da koeficijent determinacije, R^2 , iznosi $R^2=0,997$ i zadovoljava uvjet: $R^2 \geq 0,99$. Kalibracijski dijagram za amonij prikazuje se preko kvadratne jednadžbe jer se amonij drugačije ponaša pri manjim i većim koncentracijama. S druge strane, mogu se izraditi dva kalibracijska dijagrama – jedan kalibracijski dijagram se odnosi na područje manjih koncentracija (slika 4.21.), a drugi

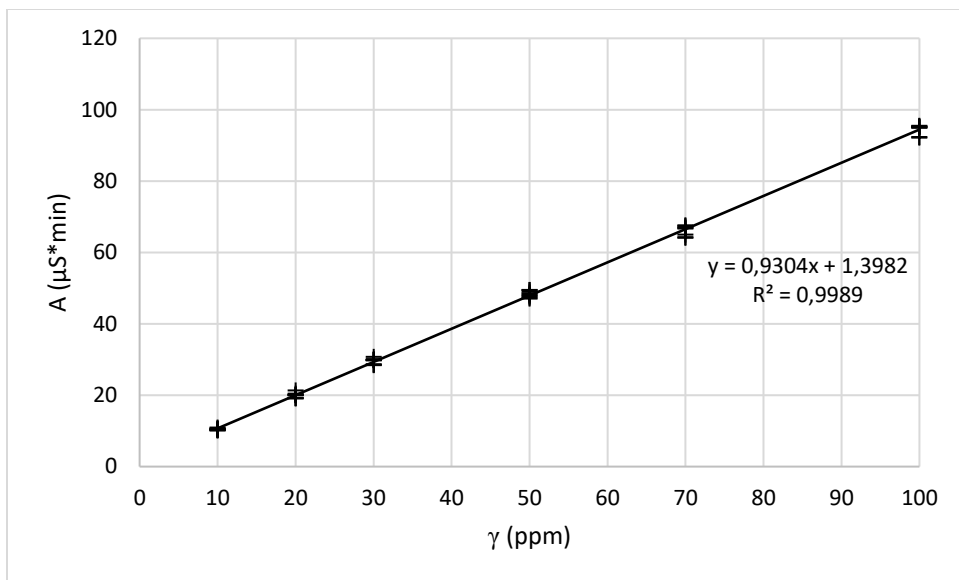
kalibracijski dijagram na područje većih koncentracija (slika 4.22.). Koeficijenti determinacije, R^2 , iznose: $R^2=0.9925$ (slika 4.21.) i $R^2=0.993$ (slika 4.22.). Kriterij linearnosti je zadovoljen.



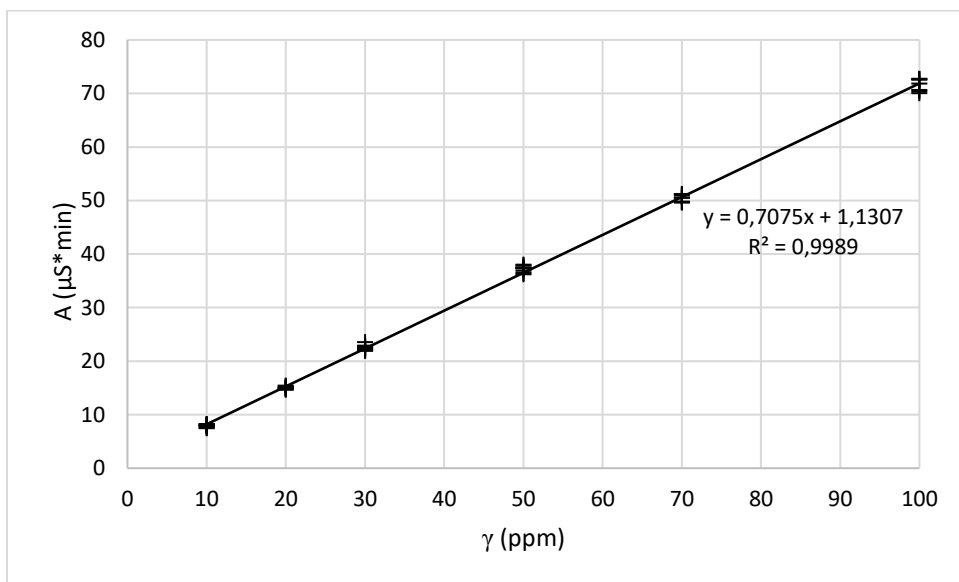
Slika 4.23. Kalibracijski dijagram za Ca^{2+}



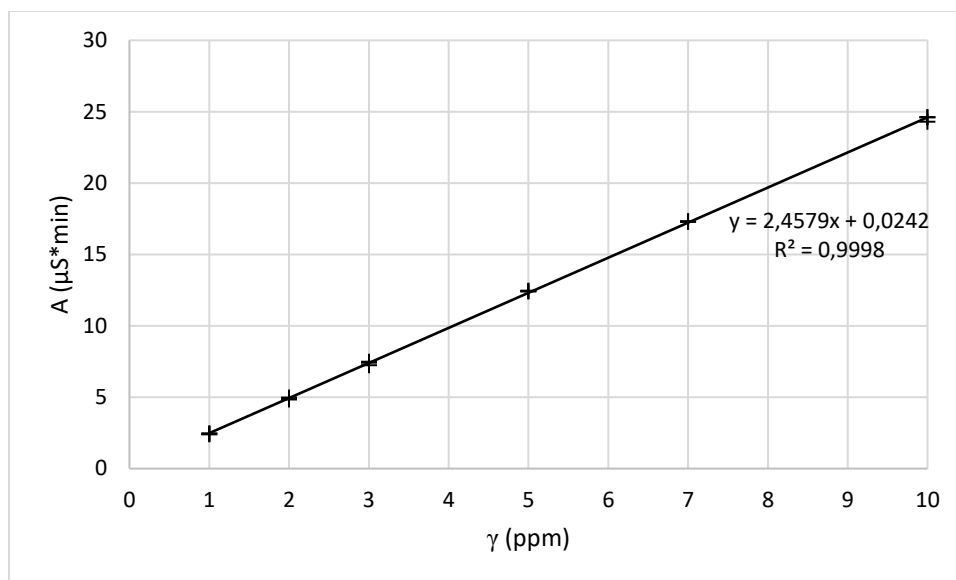
Slika 4.24. Kalibracijski dijagram za K^+



Slika 4.25. Kalibracijski dijagram za Mg^{2+}



Slika 4.26. Kalibracijski dijagram za Na^+



Slika 4.27. Kalibracijski dijagram za Li⁺

Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji za ostale katione (kalcij, kalij, magnezij, natrij, i litij) (slika 4.23.-4.27.) pokazuju da je kriterij linearnosti zadovoljen jer njihovi koeficijenti determinacije zadovoljavaju kriterij: $R^2 \geq 0.99$.

4.2.2. Preciznost

Preciznost je iskazana preko standardne devijacije, *stdev*, i relativnog standardnog odstupanja, *RSD* (%), za koje se kao kriterij prihvatljivosti uzima: $RSD \leq 5\%$. U tablici 4.1. su prikazane dobivene vrijednosti standardne devijacije i relativnog standardnog odstupanja za svaki pojedini kation u rasponu koncentracija od 10 do 100 ppm, osim za litij za koji je računato u rasponu od 1 do 10 ppm.

Tablica 4.1. Analiza preciznosti za katione

	<i>c</i> / ppm	<i>stdev</i>	<i>RSD</i> / %
NH ₄ ⁺	10	0.0245	3.6431
	20	0.0172	1.5857
	30	0.0295	2.0528
	50	0.0339	1.6880

	70	0.0418	1.7023
	100	0.0469	1.5011
Ca ²⁺	10	0.2702	3.2441
	20	0.5428	3.4323
	30	0.2455	1.0817
	50	0.6834	1.8425
	70	0.8655	1.7086
	100	0.4382	0.6021
K ⁺	10	0.1858	3.3021
	20	0.1268	1.1955
	30	0.1001	0.6341
	50	0.3327	1.2698
	70	0.1878	0.5205
	100	0.1741	0.3358
Mg ²⁺	10	0.2607	2.4970
	20	0.7104	3.5565
	30	0.8141	2.7558
	50	0.8823	1.8257
	70	1.4350	2.1701
	100	1.3846	1.4661
Na ⁺	10	0.2746	3.4611
	20	0.2556	1.7020
	30	0.5152	2.2892
	50	0.6114	1.6414
	70	0.6535	1.2948
	100	1.1572	1.6167
Li ⁺	1	0.0346	1.4238
	2	0.0762	1.5544
	3	1.1279	1.7304
	5	0.0335	0.2695
	7	0.0260	0.1505
	10	0.1790	0.7304

RSD vrijednost za svaki navedeni kation ne prelazi kriterij: $RSD \leq 5\%$, stoga je kriterij preciznosti zadovoljen. Iz podataka je vidljivo da je ipak najveća *RSD* vrijednost pri koncentracijama kationa od 10 ppm-a, a za neke katione i pri 20 ppm-a. Primjerice, najveću *RSD* vrijednost ima amonij pri koncentraciji od 10 ppm-a i iznosi: $RSD= 3.6431 \%$.

Tablica 4.2. Analiza preciznosti za anione

	<i>c</i> / ppm	<i>stdev</i>	<i>RSD</i> / %
Br ⁻	10	0.0173	1.8272
	20	0.0267	1.4474
	30	0.1006	3.5017
	50	0.0623	1.2115
	70	0.0461	0.6046
	100	0.3259	2.9631
F ⁻	10	0.1141	3.3154
	20	0.2000	3.0614
	30	0.4568	4.6038
	50	0.1269	0.7542
	70	0.0617	0.2667
	100	0.9077	2.9235
PO ₄ ³⁻	10	0.0165	3.3099
	20	0.0168	1.7155
	30	0.0514	3.3862
	50	0.0249	0.9191
	70	0.0383	0.9586
	100	0.1549	2.7410
Cl ⁻	10	0.0580	2.6784
	20	0.0655	1.5061
	30	0.2567	3.7493
	50	0.1224	0.9896
	70	0.4465	2.4315
	100	0.8555	3.2930
NO ₃ ⁻	10	0.0191	1.5798
	20	0.0809	3.4732
	30	0.1273	3.4629

	50	0.1597	2.4303
	70	0.3200	3.2285
	100	0.3591	2.5467
NO ₂ ⁻	10	0.0418	2.7794
	20	0.0321	1.0908
	30	0.1560	3.4291
	50	0.0929	1.1732
	70	0.1380	1.2205
	100	0.2994	1.9105
SO ₄ ²⁻	10	0.0334	1.9574
	20	0.0333	1.0111
	30	0.1821	3.5648
	50	0.0649	0.7113
	70	0.1283	0.9522
	100	0.5279	2.7249

RSD vrijednosti navedenih aniona, prikazane u *tablici 4.2.*, također ne prelaze zadani kriterij preciznosti: $RSD \leq 5\%$. Najveće relativno standardno odstupanje izmjereno je za fluorid pri koncentraciji od 30 ppm-a i iznosi: $RSD=4.6038\%$. Za razliku od kationa, kod aniona su zabilježene nešto veće *RSD* vrijednosti pri većim koncentracijama.

4.2.3. Točnost

Točnost metode izražava se preko mjernog odstupanja (*bias*), odnosno preko relativnog analitičkog povrata, *R* (%). Kao kriterij točnosti uzimaju se vrijednosti analitičkog povrata u rasponu [80-120] %. U *tablici 4.3.* i *4.4.* prikazane su izračunate vrijednosti analitičkog povrata za katione i anione.

Tablica 4.3. Rezultati analize točnosti kationa

Kation	Analitički povrat (min- max), %
NH ₄ ⁺	80.21-106.88
Ca ²⁺	94.12-108.51
K ⁺	96.41-106.13
Mg ²⁺	93.42-107.25
Na ⁺	89.83-105.75
Li ⁺	96.42-101.34

Tablica 4.4. Rezultati analize točnosti aniona

Anion	Analitički povrat (min- max), %
Br ⁻	89.15-119.56
F ⁻	85.88-105.86
PO ₄ ³⁻	90.27-118.76
Cl ⁻	88.28-116.92
NO ₃ ⁻	90.35-119.88
NO ₂ ⁻	91.51-106.01
SO ₄ ²⁻	89.23-118.97

S obzirom na kriterij analitičkog povrata, koji mora biti zadovoljen kako bi i točnost metode bila zadovoljena, svi rasponi vrijednosti analitičkog povrata zadovoljavaju kriterij: $R=[80-120\%]$.

4.2.4. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije, *GD*, i granica kvantifikacije, *GK*, određene su na temelju standardne devijacije otopine najmanje koncentracije, odnosno koncentracije od 10 ppm za sve katione i anione, osim za litij čija je najmanja koncentracija 1 ppm. Proračunate vrijednosti *GD* i *GK* su prikaze u *tablici 4.5.* i *4.6.*

Tablica 4.5. Proračunate vrijednosti *GD* i *GK* za katione

Kation	<i>GD</i> , ppm	<i>GK</i> , ppm
NH ₄ ⁺	2.1247	6.4385
Ca ²⁺	1.2518	3.7935
K ⁺	1.1945	3.6206
Mg ²⁺	0.9246	2.8019
Na ⁺	1.2808	3.8813
Li ⁺	0.0465	0.1410

Tablica 4.6. Proračunate vrijednosti *GD* i *GK* za anione

Anion	<i>GD</i> , ppm	<i>GK</i> , ppm
Br ⁻	0.5054	1.5316
F ⁻	1.2075	3.6591
PO ₄ ³⁻	0.9370	2.8393
Cl ⁻	0.7103	2.1523
NO ₃ ⁻	0.4316	1.3080
NO ₂ ⁻	0.8643	2.6192
SO ₄ ²⁻	0.5527	1.6749

Najnižu vrijednost granice detekcije, *GD*, za katione ima litij i iznosi *GD*=0.0465 ppm, dok najvišu granicu detekcije za katione ima amonij i iznosi *GD*=2.1247 ppm. Što se tiče granice kvantifikacije, *GK*, ona je također najniža za litij i iznosi *GK*=0.1410 ppm, a najviša za amonij i iznosi *GK*=6.4385 ppm. S druge strane, za anione je najniža granica detekcije kod nitrata i iznosi *GD*=0.4316 ppm, a najvišu granicu detekcije ima fluorid i iznosi *GD*=1.2075 ppm. Sukladno tome, nitrat ima najnižu granicu kvantifikacije koja iznosi *GK*=1.3080 ppm, a fluorid najvišu granicu kvantifikacije koja iznosi *GK*=3.6591 ppm.

5. ZAKLJUČAK

Metodom ionske kromatografije analizirani su anorganski kationi i anioni. Za sam proces ionske kromatografije bilo je potrebno razviti metodu kako bi separacija kationa i aniona u svakoj od kolona bila uspješna. Odabrane su mobilne faze: karbonatni pufer za anione i MSA za katione te su također odabrane kolone za separaciju: Dionex IonPac AS22 kolona za razdvajanje aniona i Dionex IonPac CS12A kolona za razdvajanje kationa. U radu je provedena validacija metode za određivanje kationa i aniona, ispitani su parametri validacije: linearnost, preciznost, točnost (analitički povrat), granica detekcije i kvantifikacije. Parametri validacije i validacijski kriteriji određeni su prema ICH smjernicama („*ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*“). S obzirom na dobivene rezultate, zadovoljen je kriterij linearnosti za sve katione i anione, što se može vidjeti iz vrijednosti koeficijenta determinacije, R^2 , koji prema kriteriju linearnosti mora iznositi: $R^2 \geq 0.99$. Jedini izuzetak čini amonij, koji je slaba baza, pa se s toga njegov kalibracijski dijagram temelji na kvadratnoj jednažbi. Preciznost je određena preko standardnog odstupanja, odnosno vrijednosti relativnog standardnog odstupanja, RSD , koja prema kriteriju mora iznositi: $RSD \leq 5\%$. RSD vrijednost za katione je bila unutar zadanog kriterija, uz najveću RSD vrijednost pri nižim koncentracijama (10 i 20 ppm). S druge strane, i za anione je relativno standardno odstupanje, RSD , bilo unutar zadanog kriterija, ali najveća odstupanja nisu samo pri najnižim koncentracijama. Npr., najveća RSD vrijednost izmjerena je za fluorid pri koncentraciji 30 ppm-a i iznosi: $RSD=4.6038\%$. Točnost metode određuje se preko vrijednosti analitičkog povrata, R (%). Kao kriterij točnosti uzimaju se dobivene vrijednosti analitičkog povrata u rasponu [80-120] %. Svi analizirani kationi i anioni zadovoljavaju kriterij točnosti. Litij ima najnižu granicu detekcije, GD , i kvantifikacije, GK , a amonij najvišu GD i GK . S druge strane, za anione najniže vrijednosti GD i GK ima nitrat, dok najviše vrijednosti GD i GK ima fluorid.

Iz kromatograma i za smjesu kationa i za smjesu aniona može se vidjeti da je došlo do izdvajanja svih kationa te svih aniona. Kromatografsko razdvajanje je dobro, što se iz kromatograma vidi iz jasno razdvojenih pikova, a svaki pik pojedinačno predstavlja jedan kation, odnosno jedan anion. Iz kromatograma se može vidjeti sljedeći redoslijed izdvajanja aniona: fluorid, klorid, nitrit, bromid, nitrat, fosfat i sulfat. Iz kromatograma smjese kationa vidljiv je

redosljed izdvajanja kationa: litij, natrij, amonij, kalij, magnezij i kalcij. Redosljed izdvajanja kationa i aniona ovisi o vremenu zadržavanja iona u kromatografskoj koloni.

Zaključno, ionska kromatografija je jedna od najučinkovitijih analitičkih metoda za separaciju i detekciju iona i polarnih molekula. Samo neke od prednosti ionske kromatografije su: visoka osjetljivost, preciznost, selektivnost i pH stabilnost separacijskih kolona (posebice materijala na bazi polistiren/divinilbenzen kopolimera), uz mogućnost korištenja snažnih kiselina i baza kao eluenta. Međutim, uvijek postoji mogućnost da dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjima, što može biti posljedica pogrešaka prilikom priprema otopina, promjena okolišnih uvjeta, pogreške samog instrumenta ili analitičara.

6. LITERATURA

[1] A. Braithwaite, F.J. Smith, Chromatographic Methods, Kluwer Academic Publishers, Fifth Edition, Dordrecht, 1999.

[2] <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>

(pristup: 18.7. 2024.)

[3] T. Bolanča, Š. Ukić, Ionska kromatografija (udžbenik), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015.

[4] J. R. J. Pare, J. M. R. Belanger, Instrumental Methods in Food Analysis, Chapter 1 Chromatography: Principles and Applications, Elsevier Science B.V. **18** (1997) 1-35.

[5] O. Coskun, Separation Techniques: Chromatography, Northern Clinics of Istanbul **3(2)** (2016) 156-160.

[6] <https://www.aitimejournal.com/applications-of-chromatography/36304/>

(pristup: 23.12.2024.)

[7] A. Dyer, Ion Exchange, Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng. 1 (2013) 156.

[8] P. N. Nesterenko, B. Paull, Liquid Chromatography (Second Edition), Chapter 9 Ion Chromatography, Elsevier (2017) 205-244.

[9] D. T. Gjerde, G. Schmuckler, J. S. Fritz, Anion Chromatography with low- conductivity eluents II, Journal of Chromatography A **187(1)** (1980) 35-45.

[10] P. R. Haddad, Ion Chromatography, Anal. Bioanal. Chem. **379** (2004) 341-343.

[11] P.R. Haddad, CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Mechanisms: Ion Chromatography, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press (2000) 696-705.

[12] H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman, Anal. Chem 47 (1975) 1801.

[13] R. Michalski, P. Pecyna- Utylska, Ion chromatography as a part of green analytical chemistry, Archives of Environmental Protection **46(4)** (2020) 3-9.

[14] P. R. Haddad, Ion Chromatography, Anal. Bioanal. Chem. **379** (2004) 341-343.

- [15] A. Schnepf, M. Kolb, A. Seubert, M. Laubli, Practical Ion Chromatography (3rd edition), Metrohm Monograph, Herisau (Switzerland) (2020) .
- [16] R. Michalski, P. Pecyna- Utylska, J. Kernert, Determination of ammonium and biogenic amines by Ion Chromatography, A Review, Journal of Chromatography A (2021).
- [17] B. Paull, P. N. Nesterenko, Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation, Chapter 8: Ion Chromatography, Elsevier (2013) 157-191.
- [18] D. A. Skoog, D. M. West, F. James Holler, S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry (Ninth Edition), Brooks/Cole, Belmont (USA), 2014.
- [19] <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/ion-pair-chromatography-how-ipc-works-strengths-limitations-and-applications-358440> (pristup: 22.7.2024.)
- [20] J. Stahlberg, Chromatography: Liquid, Ion Pair Liquid Chromatography, Encyclopedia of Separation Science (2000) 676-684.
- [21] A. Bartha, J. Stahlberg, Electrostatic retention model of reversed- phase ion- pair chromatography, Journal of Chromatography A, **668** (1994) 255-284.
- [22] G. Lodi, G. Storti, L. A. Pellegrini, M. Morbidelli, Ion Exclusion Chromatography: Model Development and Experimental Evaluation, Industrial & Engineering Chemistry Research **56** (6) (2017) 1621-1632.
- [23] J. Weiss, Handbook of Ion Chromatography (Fourth Edition), Wiley- VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 2016.
- [24] A. V. Moura, J. D. Santos Da Silva, P. Gubert, Ion Chromatography: Principles and Instrumentation, Orbital: Electron J. Chem **14**(2) (2022) 110-115.
- [25] <https://scienceinfo.com/ion-chromatography-principle/#instrumentation-of-ion-chromatography> (pristup: 23.7.2024.)
- [26] J. S. Fritz, D. T. Gjerde, Ion Chromatography (Third Edition), Wiley- VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 2000.
- [27] J. Weiss, D. Jensen, Modern stationary phases for ion chromatography, Anal. Bioanal. Chem **375** (1) (2003) 81-98.

- [28] M. Yuwono, G. Indrayanto, Validation of Chromatographic Methods of Analysis, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Elsevier **32** (2005) 243- 258.
- [29] B. Magnusson, U. Ornemark, The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd Edition (2014) 11-14.
- [30] V. Gašljević, Validacija i mjerna nesigurnost, Biochemia Medica **20(1)** (2010) 57- 63.
- [31] NATA: Technical Note #17- Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods (2012) 10-14.
- [32] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (2005) .
- [33] M. Đukić, S. Vasiljević, Z. Sovrlić, D. Adamović, Verifikacija i validacija analitičkih metoda u skladu sa standardom ISO/IEC 17025, Bakar **48** (2023) 25-34.
- [34] Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, Narodne novine broj 2/05.

