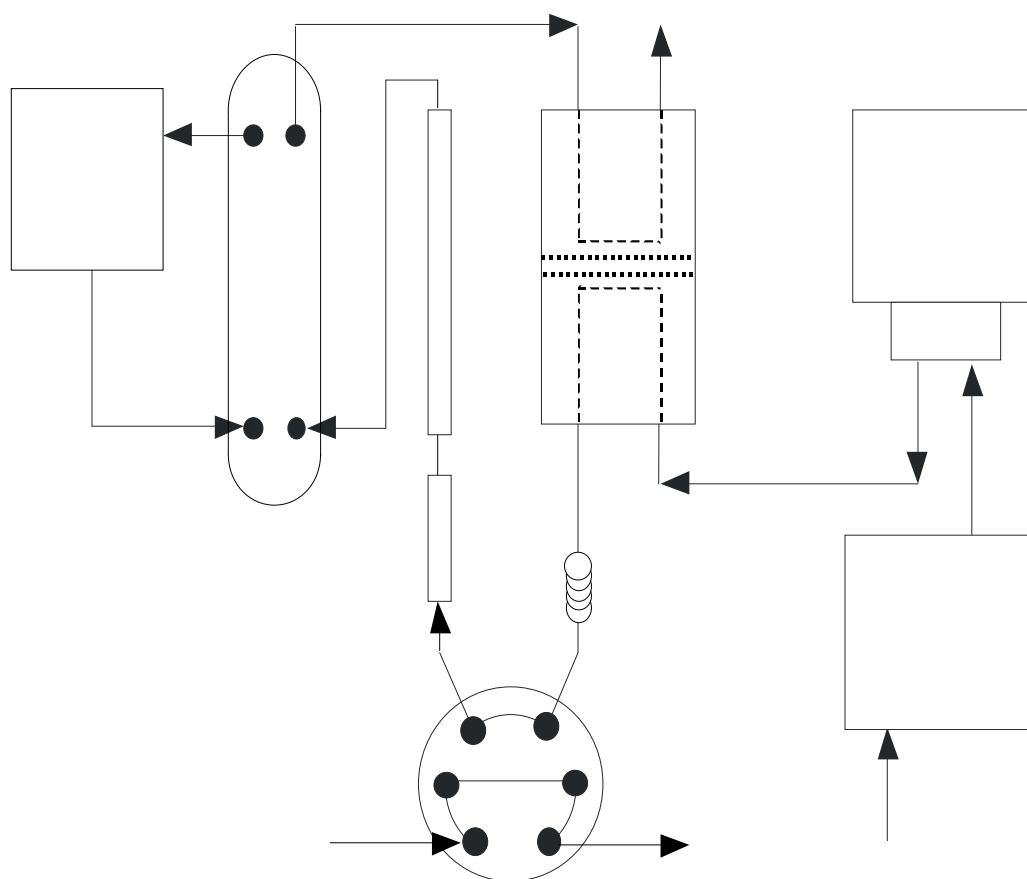


# IONSKA KROMATOGRAFIJA



TOMISLAV BOLANČA  
ŠIME UKIĆ

ZAGREB, 2013.

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD U IONSKU KROMATOGRFIJU</b> .....	1
1.1.	Povijesni pregled razvitka ionske kromatografije .....	2
1.2.	Ionski kromatografski sustav .....	2
<b>2.</b>	<b>POKRETNNA FAZA</b> .....	4
2.1.	Pumpe .....	4
2.2.	Prigušivač pulsova .....	5
2.3.	Gradijentna elucija .....	6
2.4.	Gradijentno miješanje eluensa .....	8
2.4.1.	Miješanje eluensa pri visokom tlaku .....	8
2.4.2.	Miješanje eluensa pri niskom tlaku .....	8
2.5.	On-line priprava eluensa .....	9
2.5.1.	Priprava KOH eluensa .....	9
2.5.2.	Priprava metansulfonskog eluensa .....	10
2.5.3.	Priprava K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> eluensa .....	11
2.5.4.	Priprava KHCO <sub>3</sub> /K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> eluensa .....	12
2.6.	Kolonske klopke .....	13
2.6.1.	Anionska kolonska klopka .....	13
2.6.2.	Kationska kolonska klopka .....	14
2.7.	Otplinjivač .....	15
<b>3.</b>	<b>UZORAK</b> .....	17
3.1.	Unošenje uzorka u ionski kromatografski sustav .....	17
3.2.	Priprema uzorka .....	17
3.2.1.	Upotreba kolona za uklanjanje nepoželjnih komponenti iz matrice .....	18
3.2.2.	Upotreba kolona za pretkoncentraciju uzorka .....	20
3.2.3.	<i>On-line</i> priprema uzorka .....	20

<b>4.</b>	<b>NEPOKRETNNA FAZA</b> .....	22
4.1.	Ionski izmjenjivači .....	22
4.1.1.	Izmjenjivači s polimernim kosturom.....	23
4.1.2.	Izmjenjivači sa silikatnim kosturom .....	24
4.1.3.	Lateks izmjenjivači .....	26
4.2.	Kapacitet.....	27
4.3.	Bubrenje i stupanj umreženosti .....	28
4.4.	Selektivnost .....	29
<b>5.</b>	<b>IONSKO KROMATOGRFSKO RAZDVAJANJE</b> .....	31
5.1.	Teorija odsječaka.....	37
5.2.	Teorija brzine .....	39
5.2.1.	Utjecaj efekta vrtložne difuzije .....	41
5.2.2.	Utjecaj uzdužne difuzije.....	42
5.2.3.	Utjecaj otpora međufaznom prijenosu .....	43
5.3.	Kapilarna ionska kromatografija .....	45
5.4.	Teorija linearne jakosti otapala .....	46
5.5.	Hooverova teorija .....	47
5.6.	Teorija dvokompeticijskog eluensa.....	50
5.7.	Teorija multikompeticijskog eluensa.....	51
5.8.	Teorija oblika pika .....	55
<b>6.</b>	<b>DETEKCIJA SIGNALA</b> .....	59
6.1.	Povlačenje i šum signala .....	59
6.2.	Osjetljivost .....	60
6.3.	Linearno područje odziva.....	60
6.4.	Volumen protočne ćelije .....	61
6.5.	Elektrokemijske metode detekcije .....	61
6.5.1.	Konduktometrijska detekcija.....	62
6.5.1.1.	Ionska kromatografija bez supresora.....	65
6.5.1.2.	Ionska kromatografija s kemijskim supresorom .....	66
6.5.1.3.	Supresori.....	67
6.5.2.	Amperometrijska detekcija .....	69

6.5.2.1.	Pulsna amperometrijska detekcija .....	71
6.5.2.2.	Integrirana amperometrijska detekcija .....	72
6.5.2.3.	3D amperometrija.....	73
6.6.	UV/VIS metode detekcije .....	75
6.6.1.	Osnove UV/VIS spektrofotometrije.....	75
6.6.2.	Apsorbancija.....	77
6.6.3.	UV/VIS detekcija .....	78
6.6.4.	Detektor s nizom dioda .....	79
6.6.5.	Čistoća pika .....	80
<b>7.</b>	<b>RAZVOJ METODA .....</b>	<b>82</b>
7.1.	Strategije razvoja ionskih kromatografskih metoda.....	83
7.1.1.	Metode sekvencijalnog dizajna .....	83
7.1.2.	Metode simultanog dizajna .....	84
7.2.	Kriteriji uspješnosti razdvajanja i vremena analize .....	84
7.3.	Simpleks .....	87
7.4.	Genetički algoritmi.....	89
7.4.1.	Prirodni evolucijski procesi.....	89
7.4.2.	Genetički algoritmi.....	90
7.5.	Umjetne neuronske mreže .....	94
7.5.1.	Biološki neuron .....	94
7.5.2.	Umjetni neuron.....	95
7.5.3.	Umjetne neuronske mreže .....	95
<b>8.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>98</b>

# 1. UVOD U IONSKU KROMATOGRAFIJU

Kromatografija je fizikalno - kemijska metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza) [1,2]. Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, a ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi, koja može, ali ne mora sudjelovati u separacijskom procesu. Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju, primjerice *in situ* polimerizacijom nakon nanošenja.

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

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

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

Mehanizmi separacije 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), ionsku izmjenjivačku kromatografiju (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni), kromatografija isključenjem (do razdvajanja dolazi poradi isključenja zbog razlika u

veličini, obliku ili naboju čestica) i afinitetnu kromatografiju (za mehanizam separacije se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganda) [2].

### **1.1. POVIJESNI PREGLED RAZVITKA IONSKE KROMATOGRAFIJE**

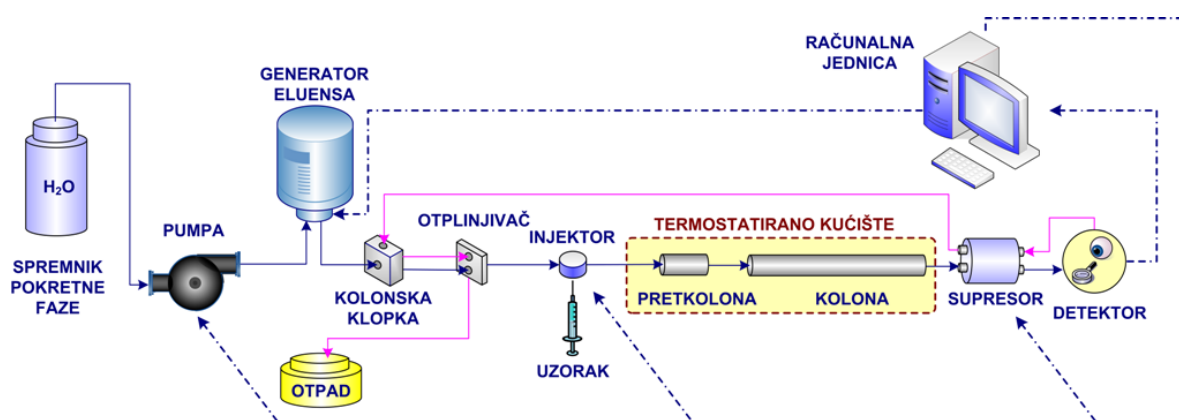
Ionsku kromatografiju (IC) kao novu analitičku metodu su prvi put predstavili Small, Stevens i Baumann [3]. Za vrlo kratko vrijeme ionska kromatografija se razvila od detekcijske postupka za određivanje nekoliko kationa i aniona u modernu tehniku za određivanje niza ionskih vrsta. Godine 1979. Fritz [4] je opisao tehniku za određivanje anorganskih aniona u kojoj je separacijsku kolonu direktno vezao s konduktometrijskom ćelijom. U tom ionskom kromatografskom sustavu nepokretnu fazu su činile smole s niskim izmjenjivačkim kapacitetom, tako da se mogao upotrijebiti eluens s niskom ionskom jakošću. Molarna provodnost određivanih iona bila je također niska te samim time nije bila moguća osjetljivija detekcija analita. Koncem sedamdesetih godina IC je prvi put upotrijebljena za analizu organskih iona. Zahtjevi za kromatografskom tehnikom koja bi omogućila razdvajanje i analizu organskih kiselina doveli su do razvoja metode temeljene na mehanizmu ionskog isključivanja koju su prvi opisali Wheaton i Baumann [5]. Širina IC primjene se uvelike povećala uvođenjem elektrokemijskih i spektrometrijskih detektora. Tako je 1983. predstavljen pulsni amperometrijski detektor, što je omogućilo vrlo osjetljivu detekciju karbonata [6]. Primjena poslijekolonske obrade uzorka u kombinaciji s fotometrijskim detektorom omogućila je određivanje teških i prijelaznih metala. Osobitu popularnost ionska kromatografija počela je stjecati uvođenjem segmenata za prigušenje pozadinskog šuma, tzv. supresora (1970-ih diskontinuirani kemijski, 1980-ih kontinuirani kemijski te 1990-ih samoregenerirajući elektrokemijski supresori).

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

### **1.2. IONSKI KROMATOGRAFSKI SUSTAV**

Na slici 1 prikazan je blok dijagram osnovnih komponenti modernog ionskog kromatografa s konduktometrijskom detekcijom. Voda kao pokretna faza crpi se iz spremnika visokotlačnom pumpom s prigušivačem pulsova i potiskuje dalje kroz sustav. Eluens željene koncentracije nastaje elektrolitičkim putem u računalno kontroliranoj jedinici otkud nastavlja dalje kroz sustav. Ako sustav sadrži jedinicu za generiranje eluensa u pravilu odmah nakon

nje mora se nalaziti tzv. kolonska klopka, koja uklanjanja pojedine smetajuće ionske vrste i reducira trend povećanja pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon kolonske klopke iz eluensa se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. U injektorskoj jedinici dolazi do uvođenja uzorka u tok eluensa, koji dalje biva nošen strujom pokretne faze kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu unutar kojih dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka. Pretkolona i kolona najčešće se nalaze u termostatiranom kućištu. Na izlasku iz kolone nalazi se 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.



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

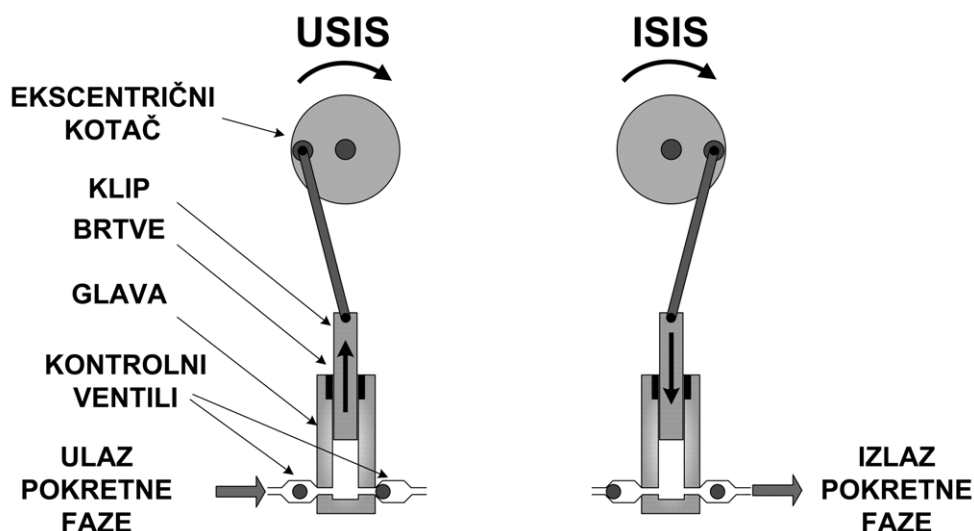
Iako ionski kromatograf ne koristi izrazito visoke tlakove, poput primjerice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), izvedbeni materijali moraju biti dovoljno čvrsti. Stoga su dijelovi koji dolaze u dodir s mobilnom fazom obično izrađeni od polietereketona (PEEK) i drugih vrsta plastike te nekih drugih materijala poput safira, rubina ili čak keramike koji se koriste u glavama pumpi, sigurnosnim ventilima i injektoru.

## 2. POKRETNNA FAZA

Pokretna faza se nalazi u rezervoarima te s pomoću sustava peristaltičkih pumpi unosi u ionski kromatografski sustav.

### 2.1. PUMPE

Ionske kromatografske pumpe su dizajnirane uz pomoć ekscentričnog kotača koji je spojen na klip (slika 2). Rotacija motora se pretvara u linearno gibanje klipa. Par kontrolnih ventila upravlja smjerom toka kroz glavu pumpe. Brtvljenje pumpe okružuje tijelo klipa i tako sprječava prokapljanje pokretne faze iz glave pumpe.



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

U jednoglavim klipnim pumpama, pokretna faza se dostavlja samo za pola crpnog ciklusa. Od izuzetnog je značaja osigurati konstantan protok eluensa kroz ionski kromatografski sustav. Iz tog razloga ugrađuju se prigušivači pulsova kako bi ublažili visoku razinu tlaka na vrhu crpnog ciklusa i osigurali tok eluensa kada se pumpa puni. Upotreba pumpi s dvije glave dodatno smanjuje pulsacije u sustavu protoka eluensa, iz razloga što glave rade 180° izvan faze jedna sa drugom (jedna glava pumpe pumpa dok druga puni i obrnuto).

Na slici 2 prikazan je osnovni princip rada pumpe. Tijekom usisnog hoda klip se izvlači iz glave pumpe, uzrokujući da se izlazni kontrolni ventil smjesti na svoje ležište dok u

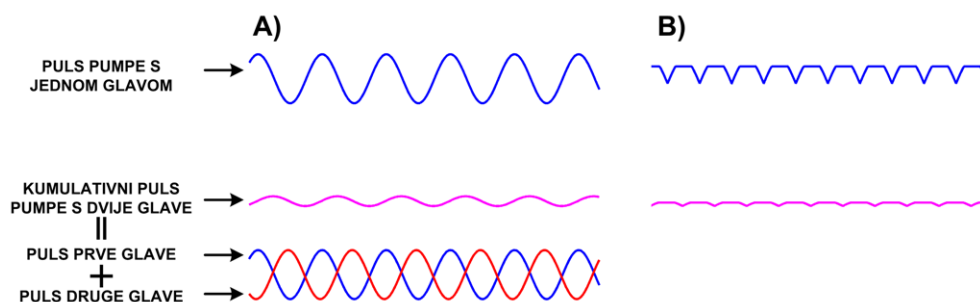


isto vrijeme ulazni kontrolni ventil izlazi iz svog ležišta. Time je omogućeno eluensu da ispunji glavu pumpe. Zatim klip putuje natrag u glavu pumpe pri isisnom hodu. Nastali povećani tlak unutar glave pumpe tjera pokretnu fazu da teče od glave pumpe dalje kroz sustav.

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

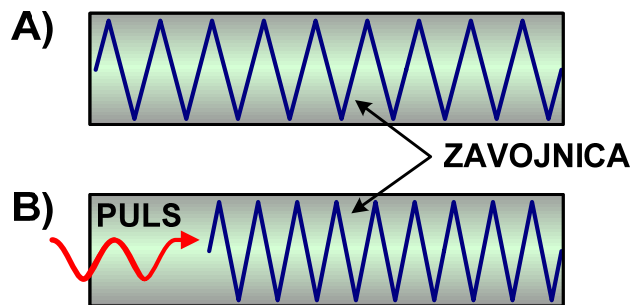
## 2.2. PRIGUŠIVAČ PULSOVA

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



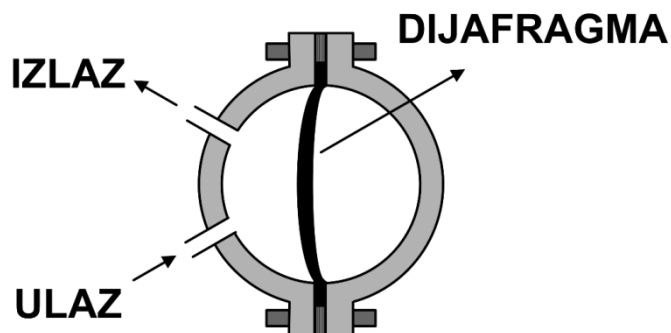
**Slika 3.** Oblik pulsova uz korištenje pumpi s jednom i dvije glave: A) bez prigušivača i B) s prigušivačem.

Na slici 4 je prikazana izvedba prigušivača pulsova u obliku zavojnice. U trenutku kada puls pokretne faze nagrne u zavojnicu, zavojnica se savine i na taj način elastično preuzme višak energije, omogućujući ravnomjerniji protok. Najveći nedostatak ove izvedbe prigušivača je vrlo velik mrtvi volumen.



**Slika 4.** Shematski prikaz prigušivača pulsova u obliku zavojnice: A) stanje zavojnice bez pulsnog udara, B) sabijanje zavojnice pod navalom pulsa. Crvenom strelicom označen je smjer navale pulsa na zavojnicu.

Na slici 5 je prikazana izvedba prigušivača pulsova s dijafragmom. U trenutku kada pokretna faza nagne u obliku pulsa u ćeliju, dijafragma sa savine i preuzme višak energije elastično izravnavajući puls. Ovakva izvedba prigušivača ima malen mrtvi volumen te se najčešće i koristi.



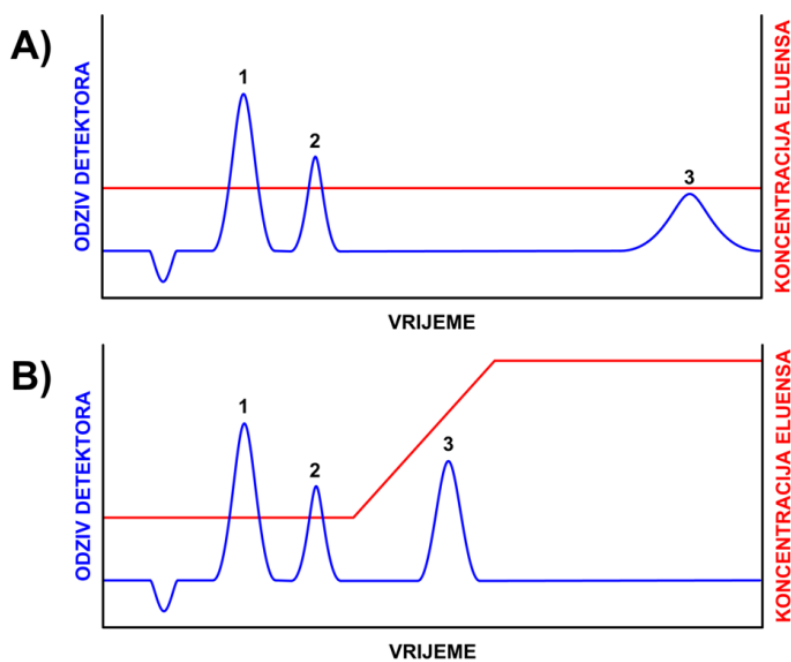
**Slika 5.** Shematski prikaz prigušivača pulsova s dijafragmom.

### 2.3. GRADIJENTNA ELUCIJA

Kromatografska elucija pri kojoj sastav eluensa ostaje nepromijenjen tijekom analize naziva se *izokratna elucijom* i predstavlja iskonski pristup kromatografskoj problematici (slika 6). Međutim, pri ionskim kromatografskim analizama često je potrebno razdvojiti tvari čiji se afiniteti prema aktivnim mjestima nepokretne faze znatno razlikuju. U takvim je slučajevima niska koncentracija kompeticijskih iona u eluensu, koja pogoduje razdjeljivanju

iona slabo zadržanih na nepokretnoj fazi, obično nepogodna za analizu čvrsto zadržanih iona jer njihova, pri tim uvjetima iznimno spora elucija, znatno produljuje vrijeme trajanja analize. Druga pak krajnost jest ispiranje, tj. elucija, pri visokim koncentracijama kompeticijskih iona u eluensu. Takav eluens će u prihvatljivom vremenskom roku eluirati snažno zadržane ione, međutim neće se postići razlučivanje slabo zadržanih iona. Rješenje te problematike osmislio je švedski kemičar Arne Tiselius sa suradnicima 50-ih godina prošlog stoljeća [7]. Oni su predložili pristup u kojem koncentracija kompeticijskih iona tijekom analize prestaje biti konstantna i postaje funkcija vremena (*gradijentna elucija*; slika 6). Stoga gradijentna elucija uglavnom započinje ispiranje eluensom niske moći ispiranja da bi se omogućilo kvalitetno razdjeljivanje slabo zadržanih komponenti. Potom se koncentracija kompeticijskih iona u eluensu vremenski ravnomjerno ili neravnomjerno povećava poradi bržeg ispiranja jače vezanih komponenti.

Za većinu metoda detekcije gradijentni pristup u suštini predstavlja problem. Ukoliko je metoda detekcije osjetljiva isključivo na analit, a ne i na komponente eluensa, moguće je ostvariti znatnije promjene u sastavu eluensa, bez znatnijeg utjecaja na kvalitetu detekcije analita. Međutim, ukoliko se metoda detekcije bazira na praćenju svojstva koje je zajedničko ionima analita i eluensa, dio signala analita može biti prikriven; uslijed gradijentne promjene sastava eluensa dolazi do znatne promjene signala bazne linije kromatograma.



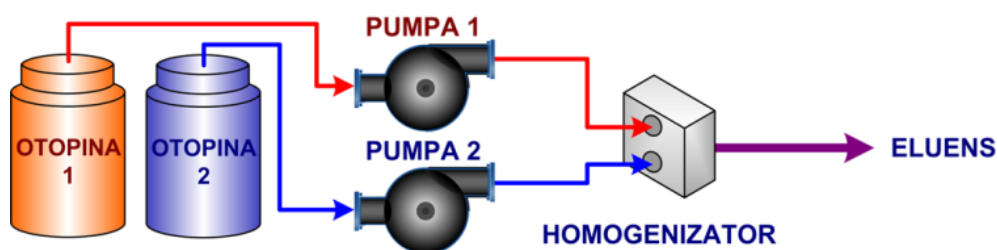
**Slika 6.** Shematski prikaz izokratne (A) i gradijentne (B) elucije triju komponenti.

## 2.4. GRADIJENTNO MIJEŠANJE ELUENSA

Kao što je već rečeno, gradijentna elucija zahtijeva promjenu sastava eluensa tijekom kromatografske analize. Postoje dva osnovna načina na koji se mogu prirediti eluensi za gradijentnu eluciju: miješanje eluensa pri visokom tlaku i miješanje eluensa pri niskom tlaku.

### 2.4.1. Miješanje eluensa pri visokom tlaku

Sustavi miješanja eluensa pri niskom tlaku sastoje se od dvije zasebne pumpe koje pumpaju eluens iz različitih rezervoara, nakon čega slijedi homogeniziranje (slika 7). Gradijent se dobiva različitim brzinama rada pumpi, pri čemu ukupna brzina protoka eluensa mora odgovarati željenoj nakon miješanja.

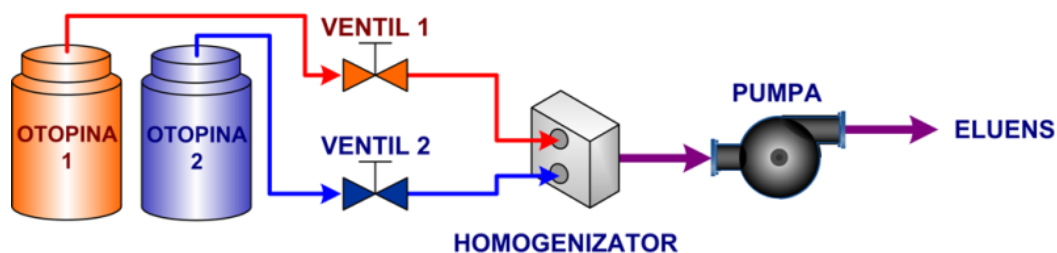


Slika 7. Sustav miješanja eluensa pri visokom tlaku.

Prednosti korištenja sustava miješanja eluensa pri visokom tlaku su visoka ponovljivost i obnovljivost pripreme pokretne faze, vrlo brz odziv promjena koncentracija. Također postoji i mogućnost korištenja jedne pumpe za on-line pripravu uzorka dok se druga u tom slučaju koristi za izokratnu eluciju. Nedostaci korištenja ovog pristupa su nepotpuno miješanje, manja preciznost miješanja omjera manjih od 10% te, možda i najvažnije, visoka cijena spomenute konfiguracije uređaja (dvije pumpe; ukoliko je potrebna ternarna pokretna faza tada čak i tri).

### 2.4.2. Miješanje eluensa pri niskom tlaku

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



**Slika 8.** Sustav miješanja eluensa pri niskom tlaku.

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

## 2.5. ON-LINE PRIPRAVA ELUENSA

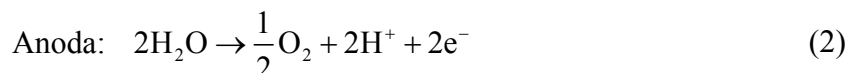
Umjesto tradicionalne *off line* priprave eluensa, danas se sve više koristi *on-line* pristup koji svoj glavni procvat može zahvaliti osmišljavanju priprave eluensa elektrolitičkim putem. Ovaj pristup donio je iznimnu uštedu vremena i napora u pripremi eluensa, veću čistoću samih eluensa, a time i veću pouzdanost IC analiza. Iako danas elektrolitička priprava eluensa obuhvaća tek malen broj različitih eluensa (KOH, NaOH, LiOH,  $K_2CO_3$ , metansulfonska kiselina) ta činjenica ne sputava njenu popularnost jer spomenuti eluensi pokrivaju većinu rutinskih IC analiza.

### 2.5.1. Priprava KOH eluensa

U ovom poglavlju opisati ćemo *on-line* pripravu KOH eluensa elektrolitičkim putem. Način priprave NaOH i LiOH eluensa je analogan.

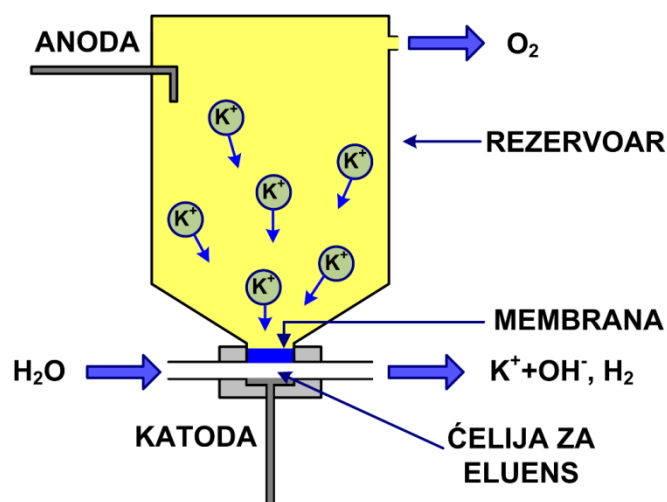
Generator KOH eluensa sastoji se od visokotlačne ćelije za pripravu eluensa i rezervoara  $K^+$  elektrolita pod niskim tlakom (slika 9). Ćelija i rezervoar odijeljeni su polupropusnom membranom koja omogućava prijelaz isključivo kationa kalija iz rezervoara u ćeliju za generaciju eluensa. U ćeliji za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

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



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

Koncentracija nastalog KOH je direktno proporcionalna jakosti struje i obrnuto proporcionalna protoku pokretne faze. Dakle, znajući protok pokretne faze i uspostavljajući potrebiti potencijal, kompjuterski je vrlo lako kontrolirati jakost struje elektrolize a samim time i željenu koncentraciju KOH u eluensu.

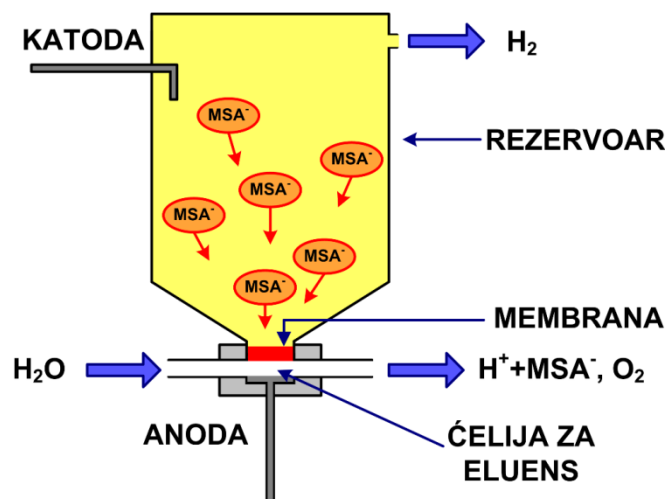


Slika 9. *On-line* generacija KOH eluensa.

### 2.5.2. Priprava metansulfonskog eluensa

Iako je metansulfonska kiselina (MSA), za razliku od KOH, eluens koji se upotrebljava u analizi kationa, koncept njene *on-line* priprave jako je sličan konceptu opisanom u prethodnom poglavlju. U rezervoaru se kao elektrolit nalazi metansulfonat ion (slika 10). Platinska elektroda u rezervoaru sada je katoda, dočim je ona u ćeliji za pripravu eluensa anoda. Samim time reakcije opisane izrazima (1) i (2) sada se odvijaju na suprotnim

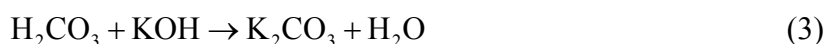
mjestima. Koncentracija nastale MSA u eluensu također je ovisna je o jakosti struje i protoku pokretne faze. Vodik nastao na anodi napušta sustav kroz otvor za plinove, a kisik nastao u ćeliji za pripravu eluensa uklanja se otplinjivačem.



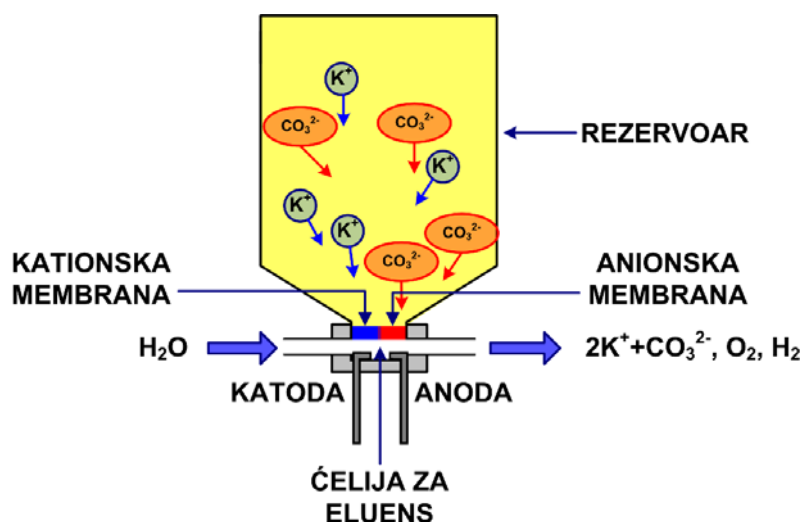
Slika 10. On-line generacija MSA eluensa.

### 2.5.3. Priprava K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eluensa

Kod *on-line* priprave K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eluensa koncept se donekle razlikuje od prethodna dva. U rezervoaru kao elektrolit nalaze se kalijevi i karbonatni ioni. Polupropusna membrana koja istovremeno i odjeljuje i povezuje visokotlačnu ćeliju za pripravu eluensa i elektrolitski rezervoar sada je podijeljena na dva segmenta: segment koji isključivo dopušta izmjenu kationa i onaj koji dopušta samo izmjenu aniona (slika 11). Kationski i anionski segment membrane odijeljeni su fizički. I katoda i anoda nalaze se u ćeliji za pripravu eluensa: katoda direktno ispod membrane koja omogućava izmjenu kationa, a anoda ispod anionske membrane. Uslijed uspostavljenog električnog polja dolazi do elektrolize vode opisane izrazima (1) i (2). Pod utjecajem električnog polja kalijevi ioni kroz polupropusnu membranu migriraju prema hidroksidnim ionima tvoreći KOH. Karbonatni ioni, pak, migriraju kroz anionsku membranu prema vodikovim ionima tvoreći karbonatnu kiselinu, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Reakcijom neutralizacije dolazi do stvaranja K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eluensa:



Koncentracija nastalog K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> također je proporcionalna jakosti struje elektrolize i obrnuto proporcionalna protoku pokretne faze. Nastali kisik i vodik iz sustava se uklanjaju otplinjivačem.



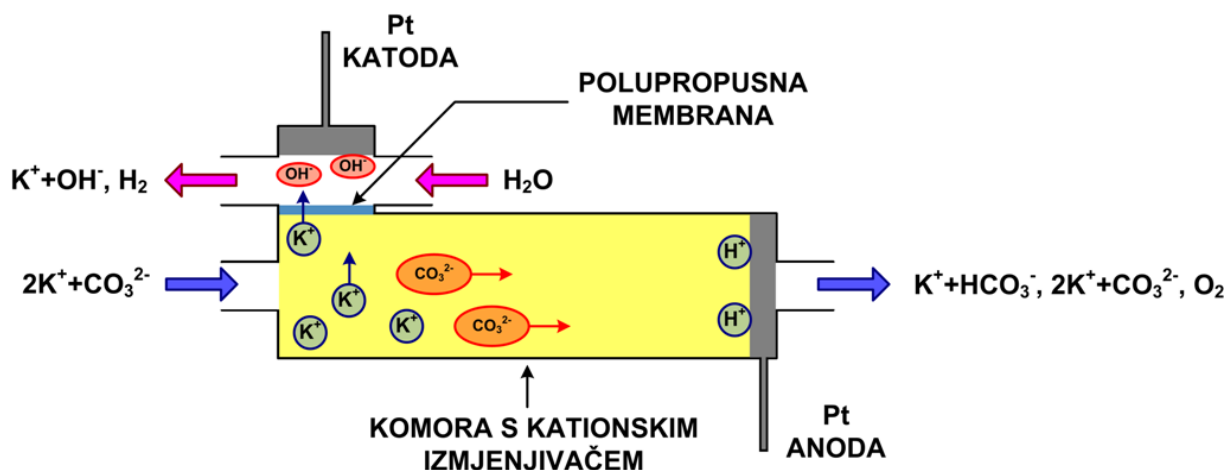
Slika 11. *On-line* generacija  $K_2CO_3$  eluensa.

#### 2.5.4. Priprava $KHCO_3/K_2CO_3$ eluensa

Iz karbonatnog eluensa moguće je *on-line* pripremiti još jedan često korišten eluens:  $KHCO_3/K_2CO_3$ . Međutim tada je u kromatografski sustav potrebno dodati i segment koji je u stanju mijenjati pH vrijednost eluensa. Danas se najčešće koristi elektrolitski mjenjač pH vrijednosti opis čijeg principa rada slijedi.

Elektrolitski mjenjač pH vrijednosti sastoji se od komore ispunjene kationskim izmjenjivačem na čijem izlazu se nalazi anoda (slika 12). Katodni dio smješten je pri ulazu u komoru i nije sastavni dio komore već je od nje odijeljen polupropusnom membranom selektivnom za katione.  $K_2CO_3$  eluens, nastao prema postupku opisanom u prethodnom poglavlju, prolazi preko kationskog izmjenjivača, pri čemu se ioni kalija zadržavaju na izmjenjivaču. Uspostavljanjem potencijala na elektrodama, dolazi do elektrolize vode, a pod utjecajem električnog polja određena količina iona kalija migrirati će kroz polupropusnu membranu u katodno područje. Tamo s hidroksidnim ionima nastalim na katodi (jednadžba (1)) tvore otopinu KOH koja odlazi u otpad. Nestašica kalijevih iona u eluensu kompenzirana je vodikovim ionima nastalim na anodi prema jednadžbi (2). Na taj se način uz  $K_2CO_3$  u eluensu pojavljuje i  $KHCO_3$ . Koncentraciju nastalog  $KHCO_3$  moguće je podešavati mijenjajući jakost struje elektrolize.





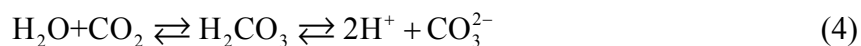
Slika 12. *On-line* generacija  $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$  eluensa.

## 2.6. KOLONSKE KLOPKE

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

### 2.6.1. Anionska kolonska klopka

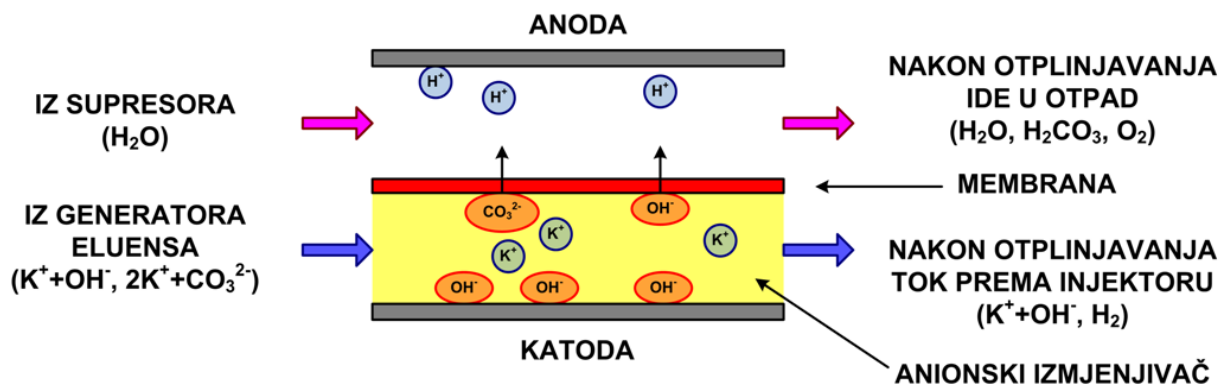
Anionska kolonska klopka služi za uklanjanje anionskih nečistoća, u prvom redu karbonata čije prisutnost je posljedica otapanja  $\text{CO}_2$  iz zraka u vodi:



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

Prolaskom eluensa preko izmjenjivača, na njemu zaostaju anionske nečistoće. Ukoliko se na elektrodama uspostavi napon doći će do elektrolize vode prema jednadžbama (1) i (2), a pod utjecajem električnog polja anionske nečistoće početi će se gibati kroz polupropusnu membranu u anodno područje. Njihovo mjesto na izmjenjivaču zauzeti će hidroksidni ioni

nastali elektrolizom; na taj omogućena je kontinuirana regeneracija anionskog izmjenjivača. Kao produkta elektrolize u anodnom području uz kisik nastaju i ioni vodika. Reakcijom anionskih nečistoća s ionima vodika nastaju slabo disocirane vrste  $\text{H}_2\text{CO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}$ .

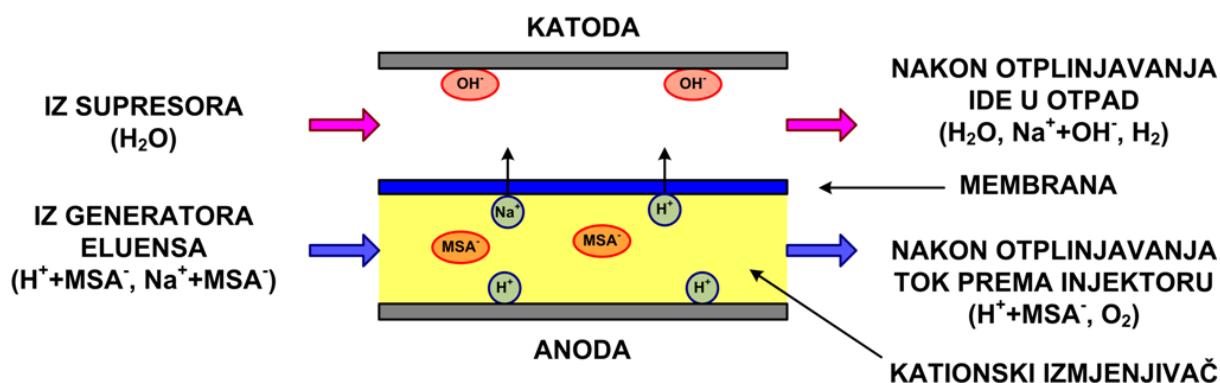


Slika 13. Princip djelovanja anionske kolonske klopke.

## 2.6.2. Kationska kolonska klopka

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

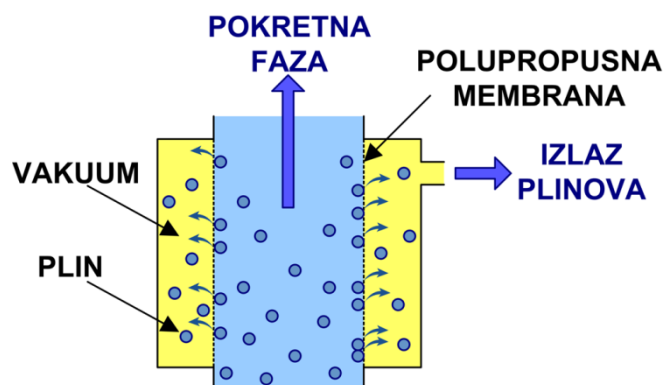
Kontinuirana regeneracija kationskog izmjenjivača ostvarena je vodikovim ionima koji nastaju kao produkt anodne reakcije elektrolize vode.



Slika 14. Princip djelovanja kationske kolonske klopke.

## 2.7. OTPLINJIVAČ

Prisutnost plinova u pokretnoj fazi može imati utjecaja na konstantnost protoka, efektivnu koncentraciju eluensa (nastanak karbonata otapanjem  $\text{CO}_2$  iz zraka), a velik utjecaj ima i na većinu detektora uzrokujući neravnu baznu liniju: U konačnici, prisutnost plinova može dovesti do nekonzistentnosti u vremenima zadržavanja analiziranih komponenti i površinama njihovih pikova. Stoga je poželjno da svaki ionski kromatografski sustav ima ugrađen otplinjivač pokretne faze, neovisno o tome da li je pokretna faza već otplinjena prije dovođenja u kromatografski sustav. Pojava mjehurića plina osobito je izgledna kod miješanja nedostatno otplinjanih eluensa pri niskim tlakovima (poglavlje 2.4.2.), u sustavima koji koriste karbonatne eluense ili u sustavima s *on-line* generacijom eluensa gdje plinovi nastaju kao nusprodukt elektrokemijskih reakcija (poglavlje 2.5) [8,9].



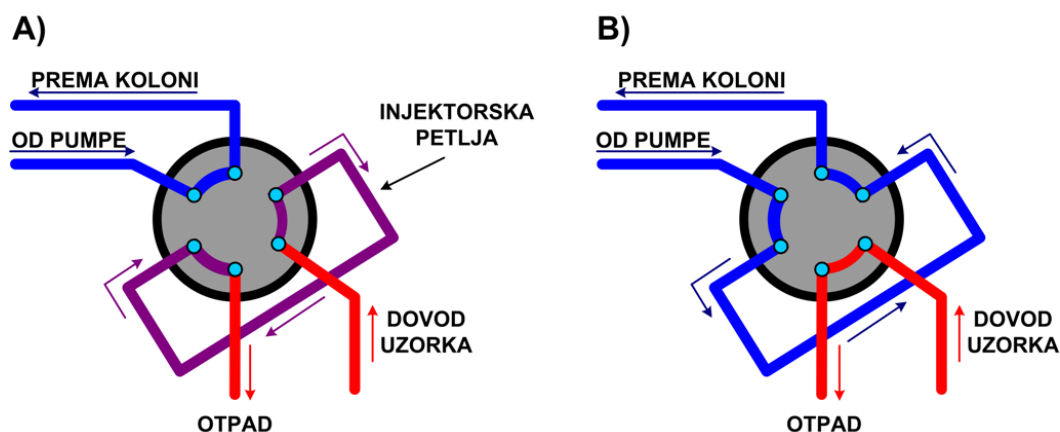
Slika 15. Shematski prikaz otplinjivača.

U pravilu se otplinjavanje izvodi koristeći razliku u tlakovima. Pokretna faza provodi se kroz komore u kojima je polupropusnim membranama odijeljena od područja znatno nižeg tlaka, primjerice vakuum područja (slika 15). Uslijed razlike tlakova dolazi do dekompresije plinovitih komponenti koje kroz polupropusnu membranu prelaze u vakuum područje dočim otplinjena pokretna faza nastavlja teći dalje kroz sustav.

### 3. UZORAK

#### 3.1. UNOŠENJE UZORKA U IONSKI KROMATOGRAFSKI SUSTAV

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



**Slika 16.** Unošenje uzorka u ionski kromatografski sustav:

A) punjenje injektorske petlje i B) injektiranje.

#### 3.2. PRIPREMA UZORKA

Jedan od najvažnijih koraka u razvoju robusne ionske kromatografske metodologije jest mogućnost razlučivanja kada je neželjeni odziv posljedica utjecaja matrice, a kada posljedica nefunkcioniranja instrumenta. Matrica može uzrokovati kraća vremena zadržavanja, širenje pika i njegovu asimetričnost, preklapanje pikova, lošu obnovljivost, neravnu baznu liniju i onečišćenje detektora.

Do skraćivanja vremena zadržavanja dolazi kada matrica sadrži sastojke koji se jače vežu za nepokretnu fazu nego li analit. Kako njih nije lako eluirati, smanjuju kapacitet kolone

i time skraćuju vrijeme zadržavanja iona analita. Prisutnost velike koncentracije elektrolita može smanjiti gustoću naboja na površini nepokretne faze, time smanjiti kapacitet, a u ekstremnim slučajevima i preopteretiti kolonu. Rezultat je širenje pika i asimetričnost. Prisutnost matrice može utjecati na razlučivanje, osobito pika nezadržanih sastojaka i prvog sljedećeg pika koji na kromatogramu, dok je loša obnovljivost i osjetljivost najčešće posljedica onečišćenja detektora. Većina takvih problema može se riješiti i/ili pravilnim odabirom nepokretne faze i primjenom odgovarajuće metodologije pripreme uzorka.

### 3.2.1. Upotreba kolona za uklanjanje nepoželjnih komponenti iz matrice

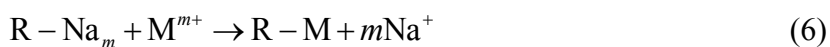
Nerijetko uz tvari koje želimo odrediti u uzorku, matrica uzorka sadrži visoke koncentracije tvari koje svojim signalom onemogućavaju detekciju i kvantifikaciju primarno traženih sastojaka uzorka. U pravilu je ovakve tvari iz matrice moguće ukloniti upotrebom kolona punjenim prikladnim ionskim izmjenjivačem. Postoji čitav niz takvih kolona, a ovdje ćemo ukratko opisati nekoliko najprimjenjivijih:

1. **Jako kiseli izmjenjivač u H<sup>+</sup> formi** iznimno je selektivan prema viševalentnim kationima poput zemnoalkalijskih i prijelaznih metala.



Slovom R označen je ionski izmjenjivač, dok  $m$  označava valenciju metalnog kationa. Ovaj se izmjenjivač može koristiti i za uklanjanje karbonata jer prema reakciji (4) oslobođeni vodik s ionskog izmjenjivača reagira s ionima karbonata dajući karbonatnu kiselinu, koju je onda upuhivanjem dušika ili nekog inertnog plina moguće istjerati iz sustava u vidu CO<sub>2</sub>.

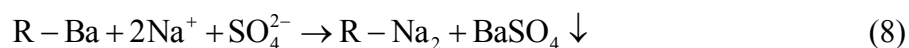
2. **Jako kiseli izmjenjivač u Na<sup>+</sup> formi** također je jako selektivan prema viševalentnim kationima poput zemnoalkalijskih i prijelaznih metala, a za razliku od izmjenjivača u H<sup>+</sup> formi, ne mijenja pH vrijednost otopine. Stoga je pogodan u slučajevima kada analiziramo tvari osjetljive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



3. **Jako kiseli izmjenjivač u  $\text{Ag}^+$  formi** uklanja čitav niz aniona koji s srebrnim ionima tvore teško topljiv talog:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeCN}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{SCN}^-$  i  $\text{WO}_3^{2-}$ .



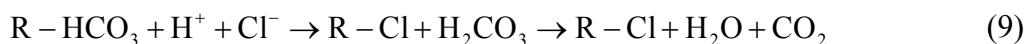
4. **Jako kiseli izmjenjivač u  $\text{Ba}^{2+}$  formi** uklanjanja sulfata i kromate prevodeći ih u teško topive barijeve soli.



5. **Polivinilpirolidon (PVP) polimer** iznimno je selektivan prema fenolima, azo tvarima, aromatskim karboksilnim kiselinama i aromatskim aldehidima.

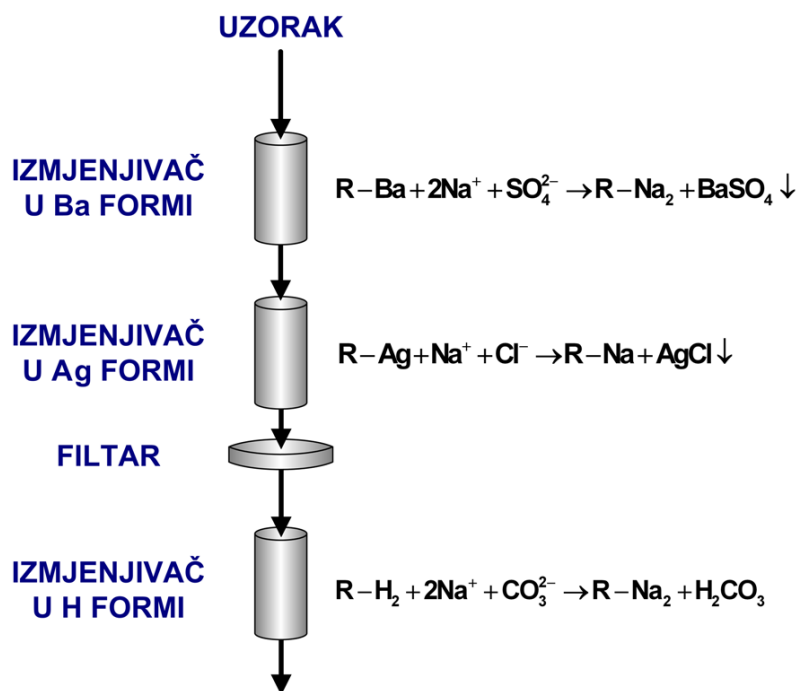
6. **Kolona s divinilbenzen kao reverznom fazom** ima visoku selektivnost prema hidrofobnim tvarima, osobito nezasićenim i aromatskim ugljikohidratima.

7. **Jako bazični anionski izmjenjivač u  $\text{HCO}_3^-$  formi** selektivan je prema svim anionima, a može se koristiti i za neutralizaciju kiselih uzoraka.



8. **Iminodiacetatne smole u amonijačnoj formi** pri pH vrijednostima većim od 4 propuštaju alkalije i zemnoalkalije, a zadržavaju sve ostale metale.

Iako danas postoji čitav niz kolona koji već u svojem punjenju imaju različite kombinacije prethodno spomenutih izmjenjivača i na taj način objedinjuju njihove efekte, identični učinak može se postići i jednostavnim spajanjem niza kolona u seriju. Primjer jednog takvog spajanja prikazan je na slici 17. Umetnuti filter prikazan na slici (u pravilu 0,22  $\mu\text{m}$ ) praksa je koja onemogućava daljnje napredovanje koloidnih  $\text{AgCl}$  čestica kroz sustav.



**Slika 17.** Uklanjanje različitih komponenti iz matrice serijskim povezivanjem niza kolona.

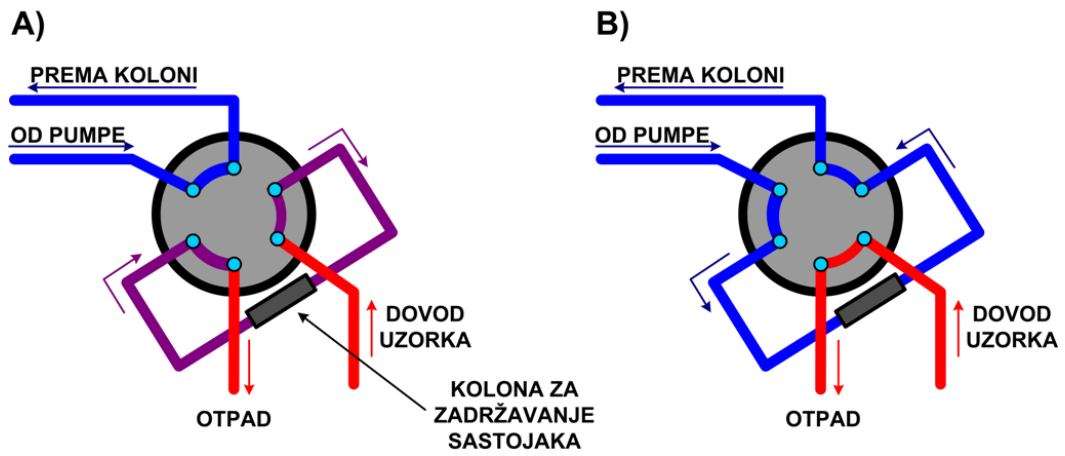
### 3.2.2. Upotreba kolona za pretkoncentraciju uzorka

Osnovne principe zadržavanja uzorka na koloni, primijenjene u prethodnom poglavlju za uklanjanje smetajućih tvari iz matrice, moguće je primijeniti i za pretkoncentraciju analita. Primjerice iminodiacetate smole u amonijačnoj formi koriste se za pretkoncentraciju metala (osim alkalija i zemnoalkalija).

### 3.2.3. *On-line* priprema uzorka

Osim u *off-line* modu, izdvajanje matrice ali i pretkoncentraciju moguće je izvesti i u *on-line* modu. Metodika je iznimno slična. Osnovna suštinska razlika između uklanjanja matrice i pretkoncentracije jest u tome što se u postupku uklanjanja matrice zadržani sastojci ispuštaju u otpad, dok se kod pretkoncentracije zadržani sastojci unose u ionski kromatografski sustav. Na slici 18 prikazana je *on-line* pretkoncentracija uzorka.





Slika 18. *On-line* pretkoncentracija uzorka.

## 4. NEPOKRETNNA FAZA

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

### 4.1. IONSKI IZMJENJIVAČI

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

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

- sposobnost brze izmjene iona
- kemijsku postojanost unutar velikog raspona pH vrijednosti
- dobru mehaničku čvrstoću i otpornost prema osmotskom šoku
- otpornost prema deformacijama pri punjenju u kolone i podređenost protoku pokretne faze

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

**Tablica 1.** Klasifikacija tipova kostura u ionskoj kromatografiji.

Materijali bazirani na silikatima	Organski materijali	Anorganski materijali
funkcionalizirani silikati polimerni silikati	sintetske polimerne smole celuloza dekstrani	alumosilikati netopive soli heteropolimerne kiseline gline hidratizirani oksidi

#### 4.1.1. Izmjenjivači s polimernim kosturom

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

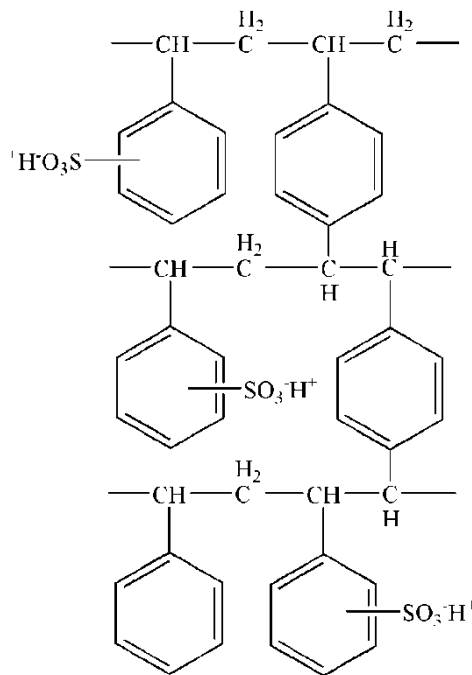
Najprimjenjivaniji funkcionalne skupine kod kationskih izmjenjivača su sulfonatna, karboksilna ili fosfonatna skupina, dok je kod anionskih to amino skupina.

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

- stiren-divinilbenzen kopolimer
- etilvinilbenzen-divinilbenzen kopolimer
- polimetakrilatna smola
- polivinilna smola

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

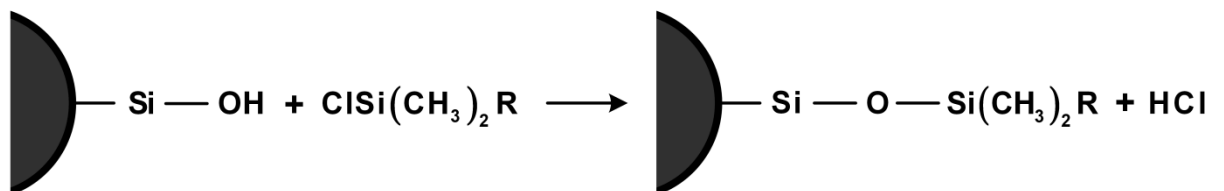
Kopolimerizacija stirena s divinilbenzenom potrebna je poradi postizanja visoke mehaničke čvrstoće izmjenjivačkog kostura. Divinilbenzen strukture poprečno povezuju polistirenske lance donoseći pridonoseći dodatnoj mehaničkoj stabilnosti strukture kostura. Postotak divinilbenzena u strukturi naziva se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



**Slika 19.** Struktura polistiren-divinilbenzenskog ionskog izmjenjivača sa sulfonatnom funkcionalnom skupinom.

#### 4.1.2. Izmjenjivači sa silikatnim kosturom

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



**Slika 20.** Silanizacija silikatnog kostura.

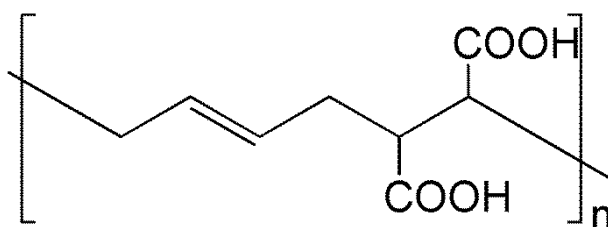
Većina komercijalno dostupnih izmjenjivača silikatnog tipa nastaju reakcijom odgovarajućeg organosilanskog reagensa sa silanolnim skupinama na površini silikatnog kostura (slika 20).

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

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

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

Kod anionskih izmjenjivača s polimerom presvučenim silikatnim kosturom kao polimerna faza koristi se lauril metakrilat.

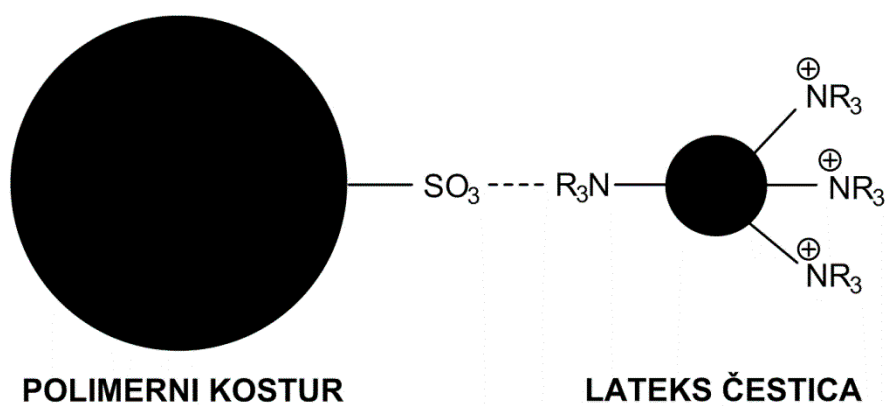


**Slika 21.** Kopolimer butadiena i maleinske kiseline.

### 4.1.3. Lateks izmjenjivači [9]

Osnove lateks izmjenjivača prezentirati ćemo kroz strukturu anionskog lateks izmjenjivača. U osnovi lateks izmjenjivača nalaze se sitne čestice (5-25  $\mu\text{m}$ ) prethodno već opisanog sulfoniranog polistiren-divinilbenzenskog kopolimera (poglavlje 4.1.1.). Na njima su, baš poput kakve ovojnice, utjecajem elektrostatskih ili van der Waalsovih sila aglomerirana iznimno sitna zrnca (0,1  $\mu\text{m}$ ) nazvana lateks česticama (slika 22). Lateks čestice su sastavljene od polivinilbenzilklorida ili polimetakrilata, a iznimno su visoke poroznosti i potpuno su aminirane; funkcionalne skupine na kojima dolazi do izmjene aniona su kvaterne aminoskupine. Selektivnost izmjenjivača ovisna je u prvom redu upravo o prirodi kvaternih amino skupina.

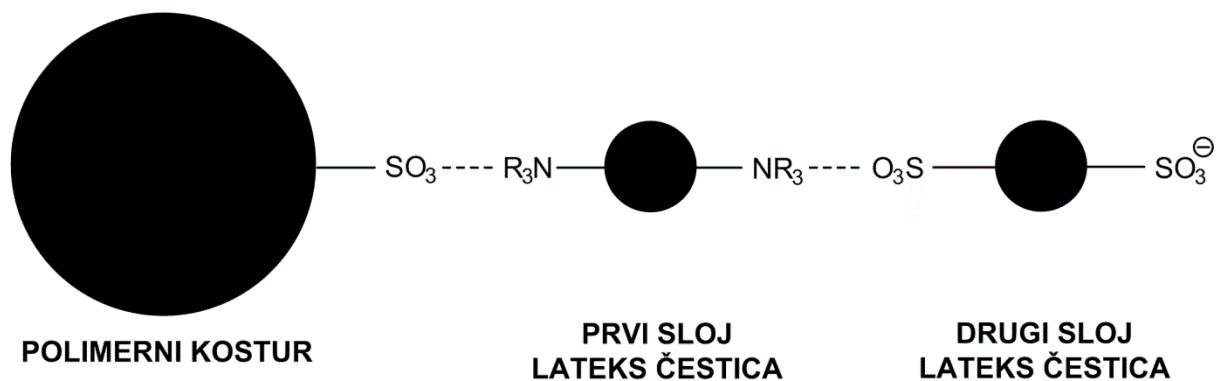
Dva parametra imaju izniman utjecaj na kromatografsku efikasnost opisanog izmjenjivača: stupanj sulfoniranosti polistiren-divinilbenzenskog kopolimera i veličina zrnaca lateksa. Sulfoniranost površine onemogućava difuziju anorganskih čestica u unutrašnjost nepokretne faze tako da je difuzija isključivo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



Slika 22. Anionski lateks izmjenjivač.

Kationski izmjenjivač zasnovan na lateks principu ima slabo sulfoniranu površinu kopolimernog polistiren-divinilbenzen središta. Sukladno situaciji kod anionskog izmjenjivača, elektrostatskim i van der Waalsovim silama oko centralne polistiren-divinilbenzen čestice aglomerirana su potpuno aminirana zrnca lateksa. Na njih je pak vezan dodatni sloj sulfoniranih lateks čestica (slika 23). Funkcionalne skupine u slučaju kationskog

lateks izmjenjivača su dakle sulfonatne skupine. Trenutno se ovakvi kationski izmjenjivači koriste samo za analizu alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa jer omogućavaju zadovoljavajuće visoko razlučivanje spomenutih komponenti.



**Slika 23.** Kationski lateks izmjenjivač.

Opisani lateks izmjenjivači nude nekoliko prednosti pred ostalim punilima kolona (poput izmjenjivača sa silikatnim kosturom ili direktno aminiranih smola):

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

#### **4.2. KAPACITET [11,12]**

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

Ukupni kapacitet se odnosi na ukupnu količinu iona izraženu u mikroekvivalentima, koju može izmijeniti jedinična količina izmjenjivača. Ukoliko se ta količina odnosi na masu suhog izmjenjivača, dobiva se njegov maseni kapacitet ( $\mu\text{eq/g}$ ), dok se volumni kapacitet

odnosi na volumen stupca nabubrenog izmjenjivača ( $\mu\text{eq/g}$ ). Ukupni kapacitet je materijalna konstanta i karakterističan je za svaku vrstu izmjenjivača.

Iskoristivi kapacitet se odnosi na dio ukupnog kapaciteta izmjenjivača, koji se može koristiti u određenoj primjeni. Ovisan je o količini izmjenjivača i uvjetima rada te nije materijalna konstanta.

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

#### **4.3. BUBRENJE I STUPANJ UMREŽENOSTI [11,12]**

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

Uzrok bubrenju je dvojak:

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



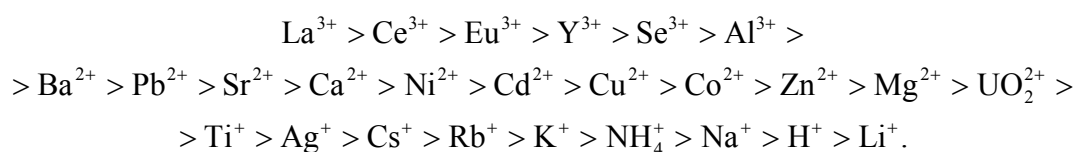
Na jačinu bubrenja utječu svi faktori koji mijenjaju razliku osmotskih tlakova i djelovanje odbojne elektrostatske sile, a to su:

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

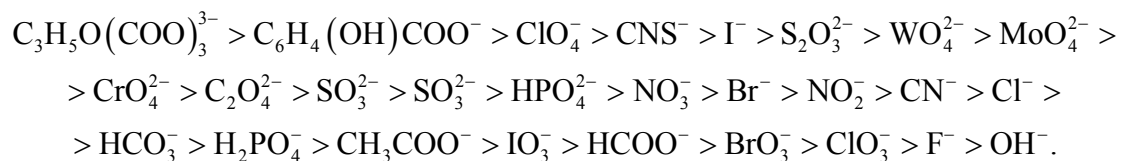
U ionskoj kromatografiji se koriste smole s velikim stupnjem poprečnog umreženja, koje su među ostalim i mehanički otpornije na povećan tlak prisutan u ionskoj kromatografskoj koloni. Stupanj umreženosti ionskog izmjenjivača u ionskoj kromatografiji utječe na selektivnost ionskog izmjenjivača, iz razloga što više ili manje dopušta pristup određenih iona funkcionalnim skupinama ionskog izmjenjivača.

#### 4.4. SELEKTIVNOST [11,12]

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



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



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

## 5. IONSKO KROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE

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

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

Za ionsku kromatografiju najvažnije svojstvo je svojstvo protuiona da izmjene mjesta ionima koji posjeduju naboj istog predznaka, a nalaze se u otopini koja je u kontaktu s izmjenjivačem. Nakon što je ion iz otopine zamijenio na aktivnom mjestu postojeći protuion, on biva zadržan na ionskom izmjenjivaču uslijed elektrostatskih sila. Ukoliko uzorak sadrži više komponenti koje imaju različit afinitet prema izmjeni na nepokretnoj fazi, svaka od tih komponenti biti će na aktivnim mjestima zadržana različitim vremenskim periodom. Na taj način dolazi do razdvajanja komponenti uzorka na ionskom izmjenjivaču [10].

Uz pretpostavku da su pokretna i nepokretna faza u kontaktu dovoljno dugo da se uspostavi ravnotežno stanje procesa ionske izmjene, raspodjela komponenti između dviju faza može se izraziti *konstantom razdjeljenja*,  $K_c$ , jednakom omjeru koncentracija razdijeljene komponente  $i$  u nepokretnoj ( $c_s$ ) i pokretnoj fazi ( $c_M$ ):

$$K_{c,i} = \frac{c_{s,i}}{c_{M,i}} \quad (10)$$

Velike vrijednosti  $K_c$  predstavljaju komponente s izraženim afinitetom prema nepokretnoj fazi, dok su suprotno tome  $K_c$  vrijednosti bliske nuli karakteristika komponenti koje preferiraju pokretnu fazu. Upravo razlike u vrijednostima konstante razdjeljenja pojedinih komponenti preduvjet su koji omogućava njihovu kromatografsku separaciju.

Ne za razliku od ovakvog hipotetskog slučaja, kada pokretna i nepokretna faza borave u kontaktu dovoljno dugo da se između njih uspješno uspostavi ravnoteža izmjene, stvarni ionsko-kromatografski proces jest dinamički sustav u kojem se za izmjenjive komponente neprestano stvaraju nove okolnosti izmjene. Stoga je ravnotežu bolje promatrati kao odraz

vremena koji pojedina komponenta provede u nepokretnoj fazi. Komponente s većom konstantom razdjeljenja zasigurno će provoditi više vremena u nepokretnoj fazi od onih s manjom konstantom. Kako se komponenta kreće samo dok se nalazi u pokretnoj fazi, prve će sustav napuštati one komponente koje u pokretnoj fazi provedu najviše vremena. Time dolazi do međusobnog razdvajanja komponenti, ovisno o afinitetu prema nepokretnoj fazi [10].

Vrijeme koje komponenta provede u sustavu naziva se *vremenom zadržavanja*,  $t_R$ , i pri identičnim uvjetima analize karakteristika je pojedine komponente. Pretpostavimo da je promatrani kromatografski sustav kolona obujma  $V$ , u kojoj volumen nepokretne faze iznosi  $V_S$ , a volumen pokretne  $V_M$ . Sve komponente koje se razdvajaju na koloni prolaze identičnim volumenom, jednakim umnošku vremena zadržavanja komponente u koloni i brzine njenog protoka kroz kolonu:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prikazujući množine kao umnožak koncentracije i volumena dobije se:

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

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

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

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

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

Iz izraza (20) jasno se vidi da faktor zadržavanja u biti predstavlja omjer vremena kojeg uzorak provede u nepokretnoj fazi i onog provedenog u pokretnoj fazi. Za razliku od vremena zadržavanja, faktor zadržavanja ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, pa je stoga često prikladniji izraz za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Ujedno, poznavanje faktora zadržavanja različitih komponenti dobar je pokazatelj njihovog razdjeljivanja odabranom kromatografskom metodom [14]. Mjera sposobnosti razdjeljivanja naziva se selektivnost,  $\alpha$ , i definirana je kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi komponenta koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena.

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

Selektivnost, jednako kao i faktor zadržavanja, ovisi o sastavu nepokretne i pokretne faze, ali i o temperaturi sustava [15]. U slučaju kada selektivnost poprima vrijednost 1, razdvajanje komponenti nije moguće, jer pri tim uvjetima analize ne postoji kromatografski bitna razlika između ispitivanih komponenti.

Osim selektivnosti, koja je više kvalitativna mjera razdvajanja, kao mjera kvantitativnog razdvajanja koriste se razlučivanje,  $R_S$ , i broj teorijskih odsječaka,  $N$ .

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

Uz pretpostavku idealne elucije, raspodjela unutar kromatografskih zona biti će Gaussova normalna raspodjela, a odzivi analize simetrične Gaussove funkcije. Tada se djelotvornost kolone može izraziti u terminima vremena zadržavanja komponente  $i$  i standardne devijacije njene raspodjele oko centra zone. Broj teorijskih odsječaka u tom slučaju jednak je:

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

Standardna devijacija Gaussove krivulje raspodjele odgovara njenoj poluširini u točkama infleksije [19] (slika 24). U kromatografskoj praksi ponekad se, umjesto vrijednosti standardne devijacije, rabe vrijednosti širina, kako u točki infleksije tako i u nekim drugim točkama; primjerice na poluvisini kromatografske krivulje ili pak pri baznoj liniji. Uzimajući u obzir odnose tih širina i standardne devijacije funkcije raspodjele:

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

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

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

broj teorijskih odsječaka može se izraziti kao:

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

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

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

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

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

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

odnosno, izraženo preko standardne devijacije raspodjele mase komponente unutar kromatografske zone [10]:

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

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

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

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

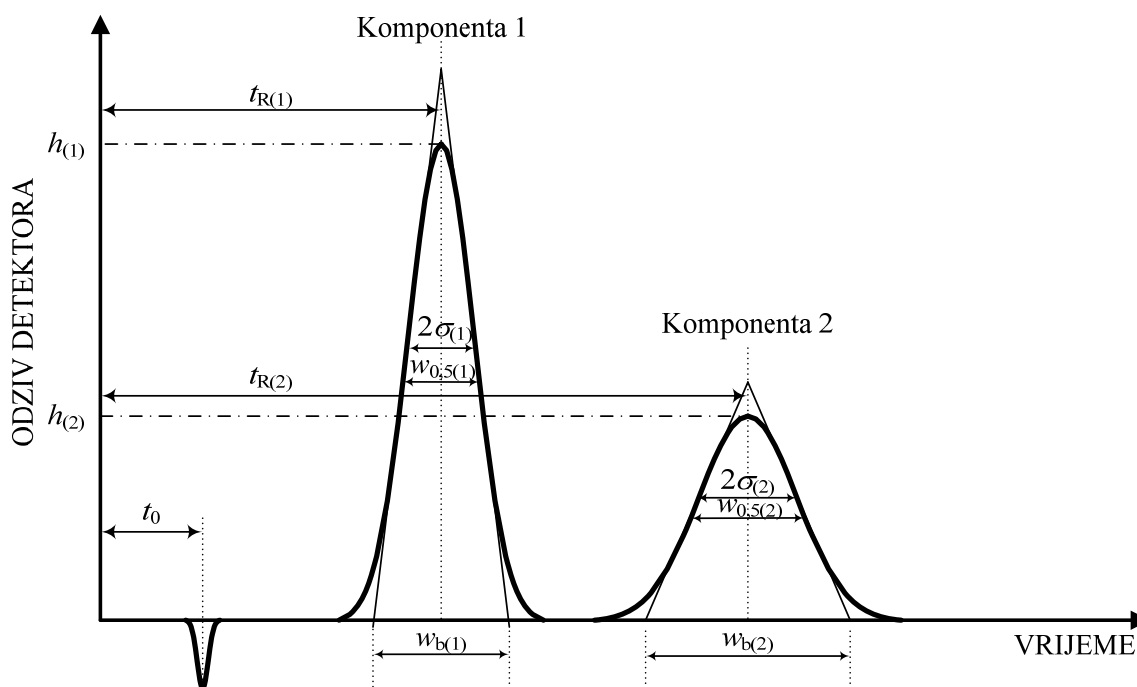
$$N_{ef} = N \left( \frac{k}{1+k} \right)^2 \quad (31)$$

Razlučivanje je pak jednako omjeru udaljenosti vremena zadržavanja dviju susjednih komponenti i dvostruke vrijednosti sume standardnih devijacija krivulja odziva:

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

Slično kao i kod izračuna broja teorijskih odsječaka, uvažavajući odnose (23), (24) i (25), razlučivanje se može računati preko širina krivulja odziva:

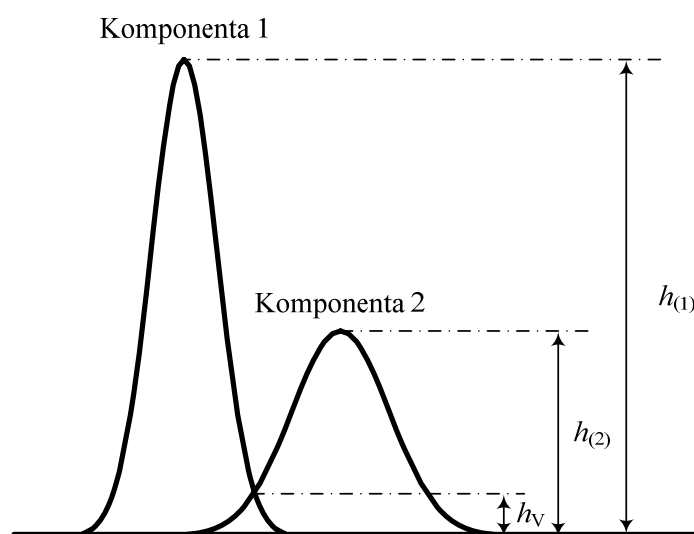
$$R_s = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{ii(1)} + w_{ii(2)}} = 1,18 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{b(1)} + w_{b(2)}} \quad (33)$$



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

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

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



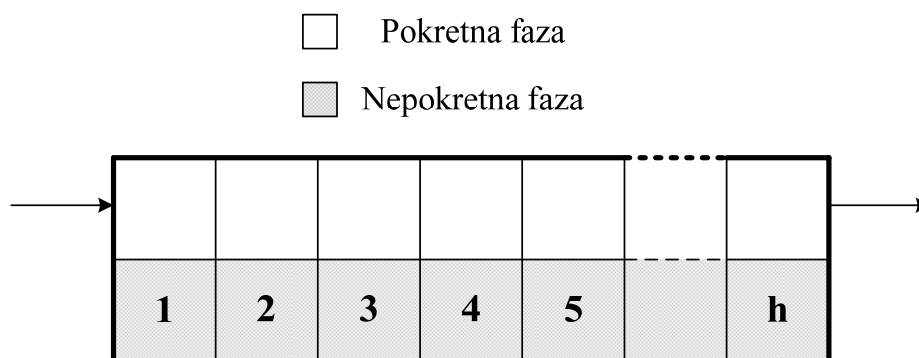
**Slika 25.** Procjena razlučivanja na temelju visina susjednih krivulja i njihove preklopljenosti



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

## 5.1. TEORIJA ODSJEČAKA

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



**Slika 26.** Hipotetska kolona sastavljena od  $h$  teorijskih odsječaka

Razmotrit će se jedna takva kolona prikazana na slici 26. Neka svaki odsječak,  $h$ , sadrži konstantni volumen pokretne,  $V_{M,h}$ , i nepokretne faze,  $V_{S,h}$ .

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

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

Konstanta razdjeljenja iona između dviju faza jednaka je za svaki odsječak i neovisna o njegovoj koncentraciji. Jednako kao o konstanti razdjeljenja, može se govoriti i o vjerojatnosti,  $p$ , da će se ion  $i$  nakon uravnoteženja nalaziti u mobilnoj fazi:

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

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

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

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

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

Obrnuto tome, ukoliko je poznat broj odsječaka od kojih se sastoji kolona,  $Z$ , lako se može izračunati koliko je prijenosa potrebno izvršiti ne bi li komponenta eluirala iz sustava.

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

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

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

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

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

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

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

Vjerojatnost da će se ion nalaziti u koloni jednaka je sumi vjerojatnosti da će se nalaziti u pojedinom odsječku:

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

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

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

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

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

Standardna devijacija binomne raspodjele dana je kao [1010]:

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

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

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

Iako model teorijskih odsječaka na kromatografskoj koloni daje rezultate koji se odlično slažu s eksperimentom, on ima i neke ozbiljne nedostatke. Dok korektno opisuje odnos između širenja vrpce i zadržavanja komponente u koloni, nije u stanju predvidjeti magnitudu razdiobe, drugim riječima visinu teorijskog odsječka. Također, model ne uzima u obzir utjecaj promjene nekih vrlo bitnih radnih varijabli, poput protoka ili veličine čestica punila. Stoga je njegova stvarna vrijednost predviđanja mala. Možda najveća odlika modela jest upravo njegova jednostavnost [10].

## 5.2. TEORIJA BRZINE

U nastojanju da se što kvalitetnije opiše širenje kromatografske zone, veliku važnost ima teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu (engl. *rate theory*). Ova teorija postupno se razvijala istraživanjima i zapažanjima niza znanstvenika tijekom duljeg vremenskog perioda,

te se o isključivo jednom autoru ne može govoriti [24-31, 32]. Iako je s vremenom proširivana, teorija je svoje osnovne pretpostavke do današnjih dana očuvala nepromijenjenima.

Za razliku od teorije odsječaka, teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu uzima u obzir varijable poput protoka, veličine čestica punila, neidealnog punjenja kolona, te brzine prijenosa tvari između faza. Prema Van Deemter-ovoj jednadžbi općenit razlog nastajanja i širenja zone ili visine teoretskog odsječka (*HETP*) leži u kombiniranom djelovanju triju efekata pri lineanoj brzini protoka  $u$  [10, 17].

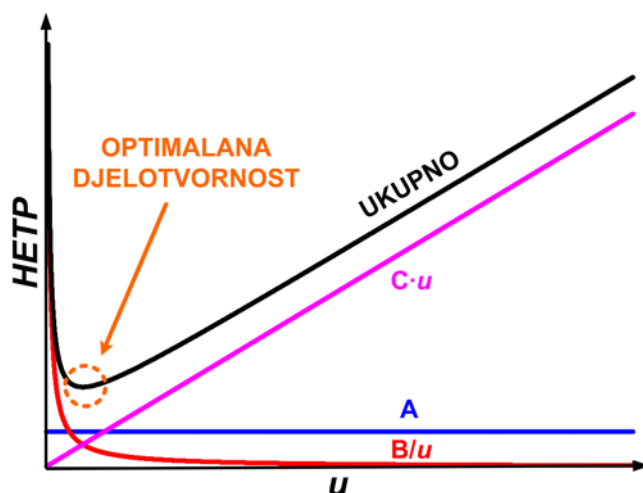
$$HETP = A + B \cdot \frac{1}{u} + C \cdot u \quad (46)$$

$A$  - vrtložnoj difuziji (engl. *eddy diffusion*)

$B$  - uzdužnoj difuziji (engl. *longitudinal diffusion*)

$C$  - otporu međufaznom prijenosu tvari (engl. *mass transfer resistance*)

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



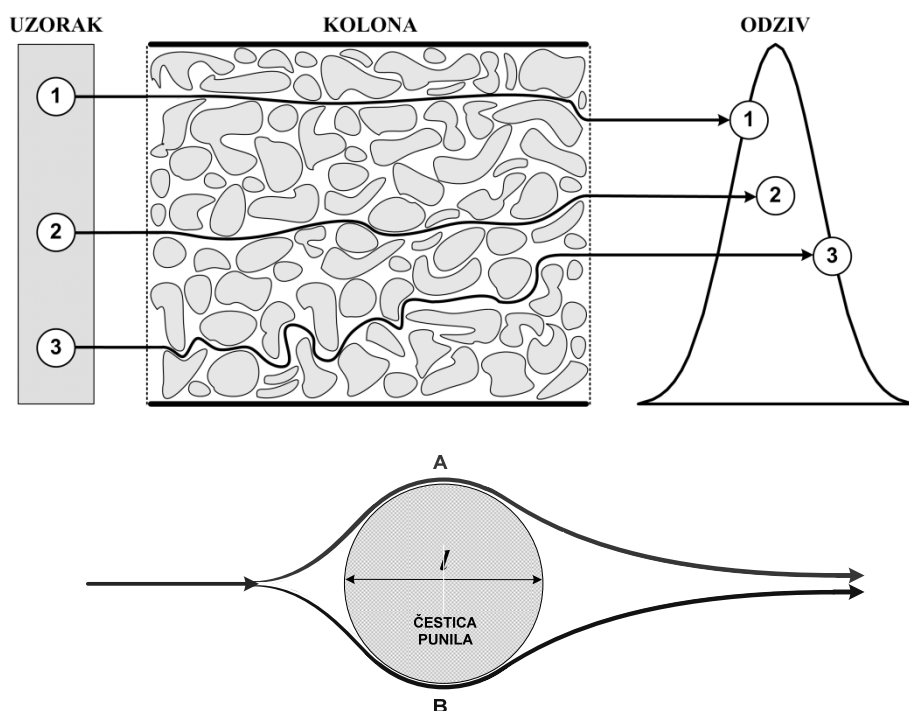
**Slika 27.** Povećanje kromatografske učinkovitosti odabirom optimalnog protoka eluensa,  $u$ .

### 5.2.1. Utjecaj efekta vrtložne difuzije

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

Za takav *problem slučajnog odabira puta* (engl. *random walk problem*), teorija vjerojatnosti nudi ovisnost između standardne devijacije,  $\sigma_E$ , duljina svih putova kojima komponenta može zaobići prepreku uzdužne dimenzije  $l$ , te broja mogućih putova,  $N$ :

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



Slika 28. Slučajan odabir puta.

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

Pretpostavit će se da su sve čestice punila sfernog oblika, identičnih dimenzija i idealno položene unutar kolone. Duljina prepreke na koju komponenta nailazi tada se može zamijeniti njenim promjerom,  $D_p$ , dok je broj prepreka po duljini kolone jednak omjeru duljine kolone,  $L$ , i promjera prepreke:

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

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

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

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

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

### 5.2.2. Utjecaj uzdužne difuzije

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

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

gdje  $D$  predstavlja difuzijski koeficijent tvari, a  $\sigma_L^2$  varijancu uzdužne difuzije. U pokretnoj fazi komponenta putuje karakterističnom brzinom, pa se vrijeme potrebno da bi napustila kolonu duljine  $L$  može izraziti iz opće definicije brzine:

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

Stoga se može pisati:

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

### 5.2.3. Utjecaj otpora međufaznom prijenosu

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

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

Problem ima mnogo zajedničkog i sa slučajem hipotetske kolone, uz iznimku da se ne promatraju segmenti duljine kolone, već vremenski segmenti. Neka je stoga slovom  $p$  označen udio vremena što ga komponenta provede u pokretnoj fazi:

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

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

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

U skladu s time, oduzimanjem vremena nezadržanog sastojka od vremena elucije središta zone komponente dobije se vrijeme koje komponenta provede u nepokretnoj fazi:

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

Neka je srednja vrijednost trajanja intervala koje je komponenta provela u nepokretnoj fazi označena sa  $\tau_S$ . Tada se brojnost intervala nakon kojih je slijedilo otpuštanje komponente u pokretnu fazu,  $N_0$ , lako može prikazati kao omjer ukupnog vremena provedenog u nepokretnoj fazi (55) i srednje vrijednosti trajanja takvih intervala:

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

Za broj koraka u kojima komponenta prelazi u pokretnu fazu mora u sustavu postojati identičan broj koraka kojima je komponenta prelazila u nepokretnu fazu,  $N_v$ . Stoga je ukupan broj koraka,  $N_U$ , tijekom kojih se odlučivalo gdje će komponenta u sljedećem biti, dvostruka vrijednost izraza (56):

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

Za određivanje standardne devijacije kromatografske zone uslijed otpora međufaznom prijenosu tvari,  $\sigma_T$ , potrebno je još poznavati duljinu koraka. Duljina koraka jest udaljenost za koju boravak u stacionarnoj fazi tijekom jednog koraka odvlači komponentu od centra zonei može se izraziti kao:

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

Uvrštavanjem jednadžbe (57) u jednadžbu standardnog odstupanja za problem slučajnog odabira puta (47) dobije se konačni izraz:

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

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

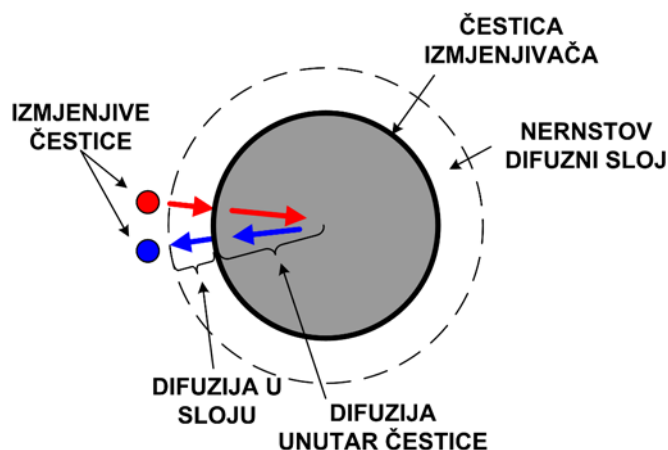
$$\sigma_{UK}^2 = \sigma_L^2 + \sigma_E^2 + \sigma_T^2 = 2D \cdot \frac{L}{v_0} + L \cdot D_p + 2(1-p) \cdot p \cdot L \cdot v_0 \cdot \tau_s \quad (60)$$

Uvažavajući jednadžbu (29) broj teorijskih odsječaka tada iznosi:

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

U kromatografskoj praksi ovakav izraz ima u prvom redu dijagnostičku vrijednost; može ukazati koji od triju efekata najviše utječe na širenje kromatografske zone ispitivanog sustava. No, nikako se ne smije zaboraviti da i neki vanjski čimbenici poput detektora ili kapilara sustava mogu također dovesti do širenja zone. Na slici 29 je prikazan međufazni prijenos tvari.





**Slika 29.** Međufazni prijenos tvari.

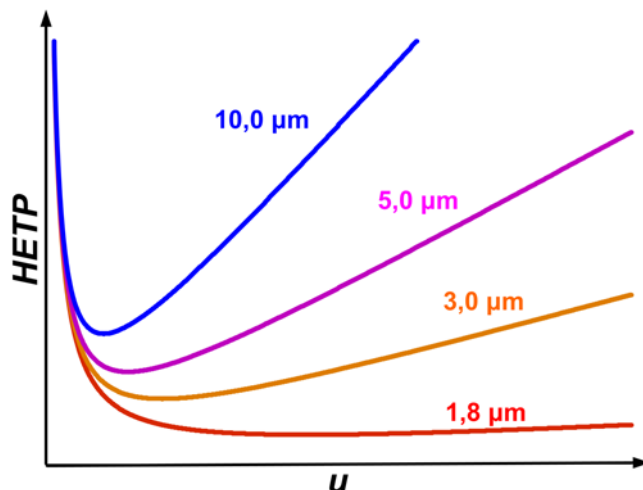
Brzina kojom se odvijaju izmjene važan je faktor upotrebe izmjenjivača, osobito za postupak u koloni. U izmjeni iona postoje tri procesa (slika 29):

- difuzija iona A i B u otopini kroz difuzijski tzv. Nernstov difuzijski sloj (difuzija u filmu)
- difuzija iona A i B unutar izmjenjivača (difuzija u zrnju)
- zamjena protuiona A za ion B iz otopine.

### 5.3. KAPILARNA IONSKA KROMATOGRAFIJA

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

Osnova kapilarne ionske kromatografije leži u smanjivanju cjelokupnog ionskog kromatografskog sustava, a to je jednostavno objasniti na osnovi Van Demteer-ovog prikaza (slika 30).



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

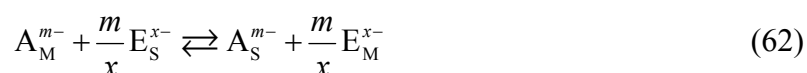
Kao što je vidljivo iz slike 30 čestice nepokretne faze manjeg promjera omogućavaju ne samo povećanu kromatografsku učinkovitost, nego i rad pri većim protocima eluensa bez smanjivanja same učinkovitosti (povećana brzina bez smanjenja razlučivanja). Iz prethodnih razmatranja poznate su sljedeće činjenice, a evidentan je i njihov kromatografski učinak:

- Broj teoretskih odsječaka kolone obrnuto je proporcionalan veličini čestice nepokretne faze.
- Broj teoretskih odsječaka je također obrnuto proporcionalan kvadratu širine pika, dok je visina pika obrnuto proporcionalna širini pika.

#### 5.4. TEORIJA LINEARNE JAKOSTI OTAPALA

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

Promotrit će se ravnoteža procesa ionske izmjene dviju hipotetskih komponenti  $A^{m-}$  i  $E^{x-}$ :



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

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

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

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

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

Logaritmiranjem izraz poprima sljedeći oblik:

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

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

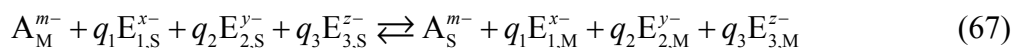
$$\log k_A = C - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x-}) \quad (66)$$

Veličina  $C$  sumarna je konstanta sviju konstantnih članova jednadžbe (65). S ciljem da se omogući primjena na polikomponentne eluense, LSS teorija je doživjela nekoliko modifikacija [36].

## 5.5. HOOVEROVA TEORIJA

Teoriju je 1982. predložio T. B. Hoover [39] i za razliku od LSS teorije primjenjiva je za višekomponentne eluense. Teorija uzima u obzir utjecaj svih komponenti eluensa na vrijeme zadržavanja. Za svaku komponentu eluensa eksperimentalno se određuje koeficijent selektivnosti odgovarajućeg ionsko izmjenjivačkog procesa (u otopinama u kojima se nalaze isključivo ioni komponente koja se određuje).

Zamislit će se hipotetski proces ionske izmjene aniona analita,  $A^{m-}$ , s trokomponentnim eluensom ( $E_1^{x-}$ ,  $E_2^{y-}$ ,  $E_3^{z-}$ ):



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Izraz (74) analitički se može riješiti samo za neke jednostavnije primjere kombinacija kompeticijskih iona u eluensu. Za ostale slučajeve potrebno je numeričko rješavanje. Hoover

je u svojem izvodu pretpostavio da je sustav sastavljen od jednog dvovalentno ( $E_2^{2-}$ ;  $y = 2$ ) i dvaju jednovalentno nabijenih aniona ( $E_1^-$ ;  $x = 1$ ,  $E_3^-$ ;  $z = 1$ ), pa izraz (74) poprima konkretniji izgled:

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

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

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

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

Mayer i Tompkins dokazali su da je prilagođeni volumen zadržavanja neke komponente u sustavu jednak njenoj konstanti razdjeljenja [39]:

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

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

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

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

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

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

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

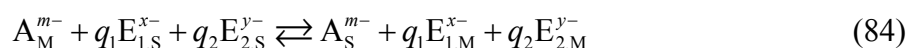
odnosno, za predloženu specifičnu kombinaciju eluensa:

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

Uvrštavanjem izraza (78) u izraz za prilagođeni faktor zadržavanja komponente A (83) dobiju se varijacije konačnih verzija Hooverova modela, naravno ovisne o nabojnom broju analita,  $m$ .

## 5.6. TEORIJA DVOKOMPETICIJSKOG ELUENSA

Kao modifikaciju Hooverove teorije, 1984. godine Janke i Pagenkopf uvode teoriju dvokompeticijskog eluensa (engl. *dual eluent species*, DES) [41-43]. DES teorija pojednostavljuje Hooverovu teoriju utoliko što reducira broj parametara koje je potrebno eksperimentalno odrediti sa tri na dva:  $K_{A/E_1}$  i  $K_{E_2/E_1}$  [36].



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

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

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

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

Jenke i Pagenkopf predložili su da se promatra sustav od jednog jednovalentno nabijenog ( $E_1^-$ ;  $x = 1$ ) i jednog dvovalentno nabijenog ( $E_2^{2-}$ ;  $y = 2$ ) kompeticijskog iona u eluensu, pa jednadžba (87) poprima izgled:

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

Rješenje jednadžbe glasi:

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

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

## 5.7. TEORIJA MULTIKOMPETICIJSKOG ELUENSA

Do danas najkompleksniju od svih teorija uveli su Hajós i suradnici 1995. godine [44]. Naziva se teorijom multikompeticijskog eluensa (engl. *multiple species eluent/analyte*; MSEA), jer uzima u obzir interakcije svih tvari koje se nalaze u eluensu sa svim komponentama analita.

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

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

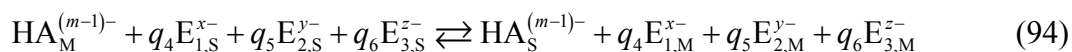
$$X_2 = \frac{y \cdot c_S(E_2^{y-})}{x \cdot c_S(E_1^{x-}) + y \cdot c_S(E_2^{y-}) + z \cdot c_S(E_3^{z-})} = \frac{y \cdot c_S(E_2^{y-})}{Q_B} \quad (91)$$

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

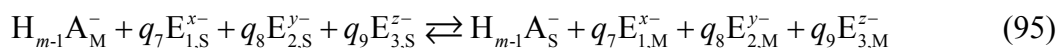
Sukladno jednadžbi (80), a uzimajući u obzir jednadžbe (90)-(92), koeficijent selektivnosti izmijenjenog aniona,  $A^{m-}$ , s obzirom na pojedini kompeticijski ion bio bi:

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

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



...



kao i nedisocirani oblik  $H_m A$ . Oznake  $q_4$ - $q_9$  predstavljaju odgovarajuće stehiometrijske koeficijente kemijskih jednadžbi. Analogno izrazu (93), za preostale ionske oblike koeficijenti selektivnosti bili bi:



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

...

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

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

$$\begin{aligned}
K_{c,A_{uk}} &= \frac{c_S(A^{m-}) + c_S(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_S(H_{m-1}A^-)}{c_M(A^{m-}) + c_M(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_M(H_{m-1}A^-) + c_M(H_mA)} \\
&= \frac{c_S(A^{m-}) + c_S(HA^{(m-1)-}) + \dots + c_S(H_{m-1}A^-)}{c_M(A_{uk})}
\end{aligned} \tag{98}$$

Izraz  $c_M(A_{uk})$  predstavlja kumulativnu koncentraciju svih oblika komponente A u pokretnoj fazi. Molarni udio pojedinog oblika ( $i$ ) komponente A u pokretnoj fazi označit će se grčkim slovom  $\Phi$ :

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

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

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

...

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

odnosno kombinacijom izraza (98)-(101):

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

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

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

Za krajnji izgled modela, potrebno je uz anion  $E_1^{x-}$ , ukomponirati i preostala dva kompeticijska iona eluensa. Identično kao i prilikom izvođenja prethodno navedenih modela vremena zadržavanja, to je moguće izvesti kombinacijom izraza za koeficijente selektivnosti tih iona prema ionu  $E_1^{x-}$  (jednadžbe (70) i (71)), te izraza za kapacitet nepokretnog sloja (68). Kao rezultat takve kombinacije dobiva se funkcija (74) čije je analitičko rješavanje moguće samo za jednostavnije primjere sastava eluensa. Hajós i suradnici, slično kao i Hoover, modelirali su s eluensom sastavljenim od jednog dvovalentno i dvaju jednovalentno nabijenih iona ( $E_1^-$ ;  $x=1$ ,  $E_2^{2-}$ ;  $y=2$ ,  $E_3^-$ ;  $z=1$ ), te je za taj slučaj rješenje jednadžbe (74) dano izrazom (78). Uvrštenjem izraza za  $c_S(E_1^-)$  (78) u jednadžbu (103) dobije se konačna verzija MSEA modela:

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

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

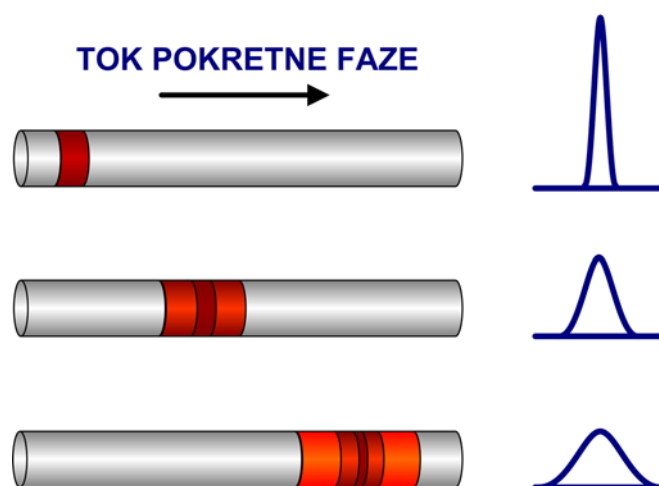
Zbog pojednostavljenja izraza uvedene su dvije nove veličine:

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

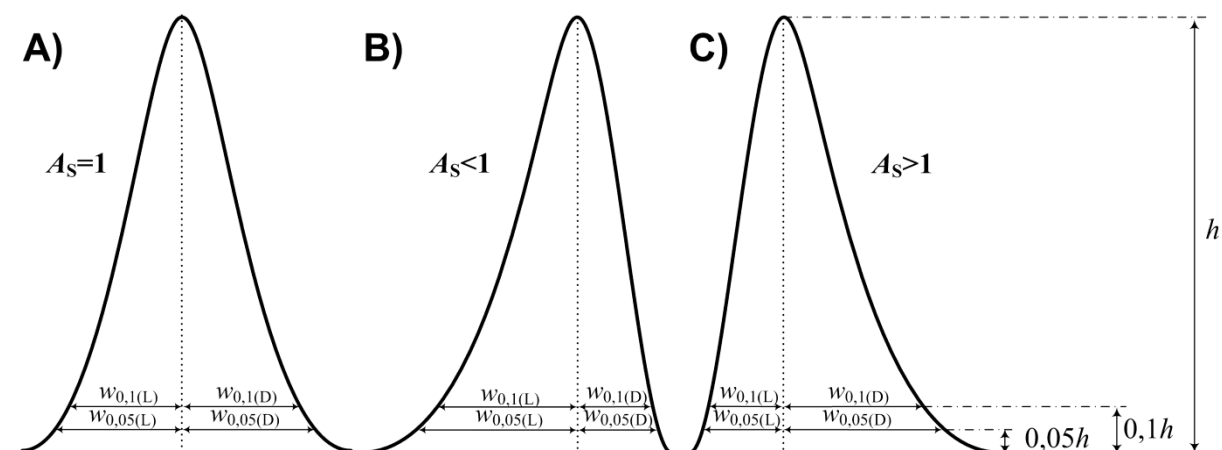
$$p_2 = 8c_M(E_2^{2-})K_{E_2/E_1}Q_B \quad (106)$$

## 5.8. TEORIJA OBLIKA PIKA

Poznato je da se komponente kroz kromatografsku kolonu kreću u zonama unutar kojih se prema određenom koncentracijskom profilu raspoređuju oko njenog središta (slika 31). U idealnom slučaju koncentracijski profil odgovara Gaussovoj funkciji razdiobe (slika 32A). Svako odstupanje od idealnosti dovodi u većoj ili manjoj mjeri do deformacije pika, odnosno do pojave njegovog pružanja (engl. *peak fronting*; slika 32B) ili pak povlačenja (engl. *peak tailing*; slika 32C).



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



**Slika 32.** Faktor asimetrije pika pri tri različita elucijska profila:

A) simetričan pik, B) profil pružanja pika i C) profil povlačenja pika.

Kromatografska veličina koja najbolje opisuje odstupanje od idealnosti naziva se *faktorom asimetrije*,  $A_S$  (u daljnjem tekstu pisano i kao asimetrija). Asimetrija je bezdimenzijska veličina koja definirana dvojako, ovisno o standardu koji se koristi. Prema američkoj i europskoj farmakopeji asimetrija se računa kao omjer širine kromatografske krivulje na 5% njene visine ( $w_{0,05(D)} + w_{0,05(L)}$ ) i dvostruke vrijednosti njene lijeve širine pri istoj visini [45]:

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

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

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

U praktičnim analizama, kromatografska kolona smatra se kvalitetnom ukoliko faktor asimetrije poprima vrijednost u intervalu 0,9-1,2 [9].

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

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

gdje  $\mu^0$  predstavlja standardni kemijski potencijal (ovisan o temperaturi i tlaku sustava). U trenutku uspostavljanja ravnoteže ionske izmjene između dviju faza kromatografskog sustava,

dolazi do izjednačavanja vrijednosti kemijskih potencijala izmijenjene komponente u objema fazama.

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

Jednostavnim matematičkim preoblikovanjem izraza (110) može se uočiti da je i omjer koncentracija komponente razdijeljene između nepokretne i pokretne faze sustava (konstanta razdjeljenja,  $K_c$ ) funkcija tlaka i temperature:

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

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

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

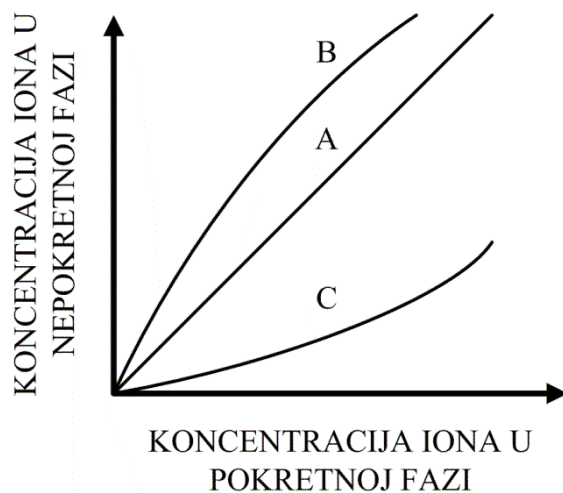
$$\mu = \mu^0 + RT \ln a \quad (113)$$

Grčkim slovom  $\gamma$  označen je koeficijent aktiviteta. Identično prethodnom izvodu ((109)-(111)) može se izraziti stvarni koeficijent raspodjele termodinamičke ravnoteže,  $K_c^*$ :

$$K_c^* = \frac{\gamma_S \cdot c_S}{\gamma_M \cdot c_M} \quad (114)$$

Izrazito malo kromatografskih sustava pokazuje idealno ponašanje (slika 32A). Znatno uobičajenija jest situacija prikazana krivuljom B, gdje nagib krivulje nije stalan već opada s porastom koncentracije komponente u pokretnoj fazi. Upravo promatrajući takve različite oblike izotermi, može se pokušati objasniti što se to događa unutar kolone, a uvjetuje pojavu pružanja i povlačenja pika. Za razliku od izoterme A, koja predstavlja konstantnost međufazne raspodjele komponenti i samim time simetričan koncentracijski profil unutar zone, izoterma B jasno ukazuje da pri nižim koncentracijama ispitivane tvari u pokretnoj fazi, konstanta razdjeljenja poprima znatno veće vrijednosti nego li je to slučaj za više koncentracijsko područje. Stoga će se komponente koje nadolaze unutar nove zone u većoj mjeri raspodijeliti na postojeća aktivna mjesta ionskog izmjenjivača, a za njihovo eluiranje biti će potrebna veća količina eluensa. U takvom specifičnom slučaju maksimum eluiranja pomiče se ka višim vremenima zadržavanja, a elucijska krivulja pokazuje trend početnog razvlačenja (slika 32B). Kao posljedica pružanja pika, područje nakon koncentracijskog maksimuma zone, sadrži veću koncentraciju eluirane tvari nego što bi to bio slučaj kod simetrične raspodjele. Samim time koeficijent raspodjele (prema krivulji izoterme) ima manju

vrijednost, manji je intenzitet raspodjele prema nepokretnoj fazi, a time krivulja elucije dobiva izraženiji silazni trend. Rabeći sličnu logiku, lako se može uočiti zašto izoterma C (slika 33) uzrokuje pojavu povlačenja kromatografske krivulje.



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

Osim takvih pojava, vezanih uz prirodu tvari koja se izmjenjuje i njenih interakcija s česticama pokretne i nepokretne faze, u kompleksnim sustavima sastavljenim od više ispitivanih komponenti, međusobne interakcije komponenti dodatan su čimbenik koji može utjecati na oblik pika, osobito u situacijama kada dolazi do nepotpunog razdvajanja komponenti.

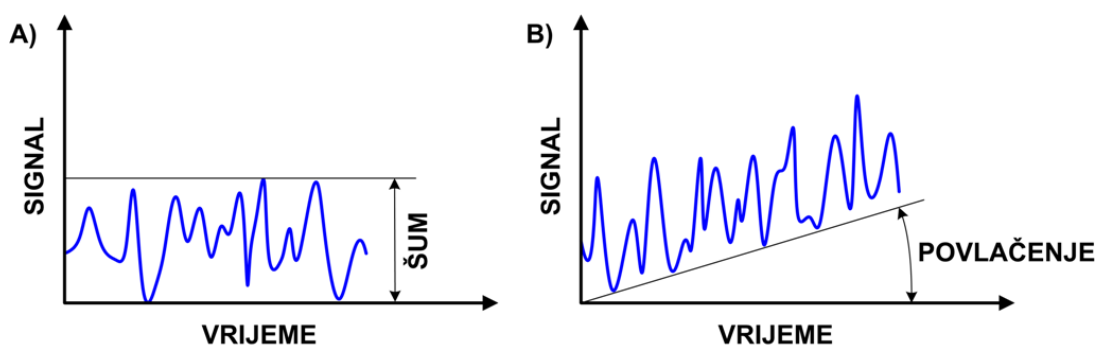
## 6. DETEKCIJA SIGNALA

Bez obzira o kojoj se vrsti detekcije radilo uvijek vrijede osnovni principi detekcije, a to je da svaki dobar detektor mora se odlikovati:

- niskom razinom niskom razinom šuma i povlačenja signala,
- visokom osjetljivošću,
- širokim dinamičkim područjem linearnosti,
- mali mrtvi volumen protočne ćelije.

### 6.1. POVLAČENJE I ŠUM SIGNALA

Šum bazne linije je kratkotrajna fluktuacija i odstupanje od ravne linije uzrokovano slučajnom pogreškom detektora: nestabilnošću električnog napajanja, nestabilnosti elektroničkih krugova, nestabilnosti izvora zračenja, temperaturom... Šum u pravilo ima puno veću frekvenciju negoli signal kromatografskih pikova, a mjeri se od vrha jednog nasumičnog pika do njegovog dna (ili početka drugog nasumičnog pika). Šum direktno utječe na osjetljivost detektora. Na slici 34 prikazan je šum i povlačenje signala.



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

Za razliku od šuma koji predstavlja kratkotrajnu fluktuaciju signala (visokofrekventnu), povlačenje signala je odstupanje bazne linije od horizontalnog položaja. Uzrok tome je najčešće loše uravnoteženje (ekvilibracija) kromatografskog sustava odnosno nekonstantnost temperature, sastava mobilne faze ili nekog drugog faktora unutar kromatografskog sustava kroz duži vremenski period. Gradijentna elucija može jako utjecati na povlačenje signala iz

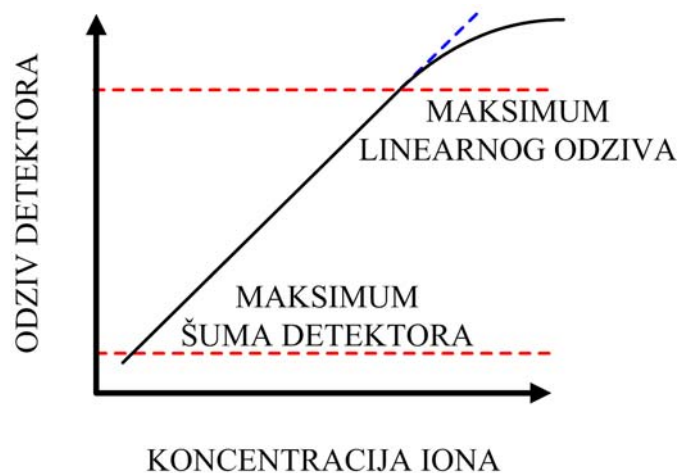
razloga što je njezin osnovni princip zasnovan na promjeni sastava mobilne faze za vrijeme analize. Za rješavanje tog problema postoje različite mogućnosti.

## 6.2. OSJETLJIVOST

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

## 6.3. LINEARNO PODRUČJE ODZIVA

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



Slika 35. Linearno područje odziva.

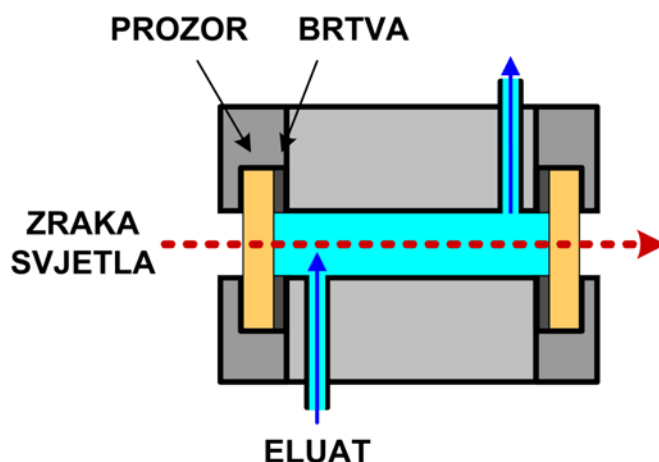


## 6.4. VOLUMEN PROTOČNE ČELIJE

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

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

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



Slika 36. Protočna ćelija za spektrometrijska mjerenja.

Ukoliko ćelija ima veliki mrtvi volumen dolazi do nepotrebnog širenja zone pika, a što direktno utječe na razdvajanje (razlučivanje), osjetljivost (niski široki pikovi, koje je teško razlučiti od šuma).

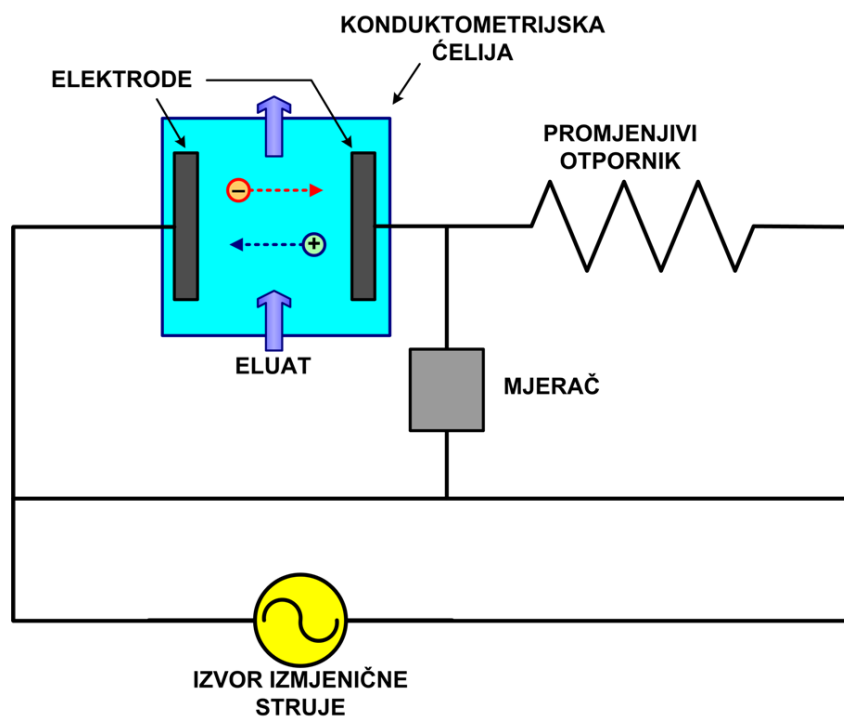
## 6.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE DETEKCIJE

Osnovna podjela elektrokemijskih metoda detekcije je na metode u masi otopine, koje mjere svojstvo cijele otopine, i na površinske metode, u kojima je signal funkcija fenomena koji se događa na površini između elektrode i otopine koja je u kontaktu s elektrodom. Mjerenja provodnosti otopine, koja je proporcionalna ukupnoj koncentraciji otopljenih iona, primjer je elektrokemijske metode u masi otopine. Primjer površinske elektrokemijske metode nalazimo pak u određivanje pH korištenjem pH elektrode.

### 6.5.1. Konduktometrijska detekcija

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

Konduktometrijski detektor sastoji se od konduktometrijske ćelije s dvije elektrode (slika 37) koje su sastavni dio Wheatstonovog mosta, gdje se impedancija mijenja s promjenom koncentracije iona unutar ćelije. Za mjerenje se koristi izmjenična struja iz razloga što bi istosmjerna polarizirala elektrode, a to bi uzrokovalo stvaranje plinova unutar mobilne faze, odnosno povećani šum signala.



Slika 37. Shematski prikaz konduktometrijskog detektora.

Relacija između napona i jakosti struje je dana Ohmovim zakonom:

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

gdje je  $R$  električni otpor [ $\Omega$ ],  $U$  električni napon [V], a  $I$  jakost struje [A]. Recipročna vrijednost otpora naziva se električkom vodljivošću,  $G$ , i ima jedinicu siemens, S, po definiciji jednaku  $\Omega^{-1}$ :

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

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

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

Veličina  $\rho$  naziva se električnom otpornošću [ $\Omega \text{ m}$ ], a omjer udaljenosti i površina elektroda konstantom ćelije,  $K_C$ :

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

Konstanta ćelije u pravilu se ne određuje pomoću kalibracijskih otopina. Recipročna vrijednost električne otpornosti predstavlja pak električnu provodnost,  $\kappa$  [ $\text{S m}^{-1}$ ], vjerojatno najčešću varijablu u konduktometriji:

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

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

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

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

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

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

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

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

gdje je  $\Lambda_{\infty}$  molarna provodnost elektrolita pri beskonačnom razrjeđenju, a  $K$  Kohlrauschova konstanta. Prema Kohlrauschovom zakonu molarna provodnost elektrolita pri beskonačnom razrjeđenju jednaka je zbroju molarnih provodnosti njegovih kationa i aniona,  $\lambda$ . Primjerice za elektrolit  $K_kA_a$  koji disocira prema izrazu:



molarna provodnost bila bi:

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

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

ANIONI	$\lambda_{\infty}$ [S cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> ]	KATIONI	$\lambda_{\infty}$ [S cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> ]
OH <sup>-</sup>	198	H <sup>+</sup>	350
F <sup>-</sup>	54	Li <sup>+</sup>	39
Cl <sup>-</sup>	76	Na <sup>+</sup>	50
Br <sup>-</sup>	78	K <sup>+</sup>	74
I <sup>-</sup>	77	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	73
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	72	1/2 Mg <sup>2+</sup>	53
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	71	1/2 Ca <sup>2+</sup>	60
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	45	1/2 Sr <sup>2+</sup>	59
1/2CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	72	1/2 Ba <sup>2+</sup>	64
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	57	1/2 Zn <sup>2+</sup>	53
1/3 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	69	1/2 Cu <sup>2+</sup>	55
1/2 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	80	1/2 Pb <sup>2+</sup>	71
SCN <sup>-</sup>	66	1/2 Co <sup>2+</sup>	53
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	41	1/3 Fe <sup>3+</sup>	70
1/2 ftalat	38	N(Et) <sub>4</sub> <sup>+</sup>	33
propionat	36		
benzoat	32		
silikat	30		

Molarne provodnosti aniona i kationa obično su između 35 i 80  $\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . Iznimka su  $\text{H}^+$  i  $\text{OH}^-$  ioni, koji zbog svoje izuzetne pokretljivosti, imaju 350 odnosno 198  $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ . Uz pomoć tabeliranih vrijednosti za molarne provodnosti iona i molarnu provodnost čistog otapala, moguće je s zadovoljavajućom točnošću izračunati molarnu provodnost otopine. Osim ionske vrste i njezine koncentracije, na provodnost jako utječu temperatura i polarnost otapala.

#### 6.5.1.1. Ionska kromatografija bez supresora

U ionskoj kromatografiji bez kemijskog supresora (direktnoj ionskoj kromatografiji), veliki zahtjevi su postavljeni na konduktometrijski detektor, zbog toga što postoji velika pozadinska provodnost, u odnosu na mjereni signal. Kako električna provodnost ovisi o temperaturi, potrebno je osigurati konstantnost temperature u konduktometrijskoj ćeliji (gradijent temperature mora biti manji od 0,01 °C). Osjetljivost konduktometrijskih mjerenja ovisi o razlici u molarnoj provodnosti između analita i eluensa:

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

Kad se nesupresirana ionska kromatografija koristi za određivanja aniona, kao eluensi se najčešće koriste soli ftalne, silicijeve ili benzojeve kiseline zato što one imaju malu provodnost (tablica 2). Dakle, ako se u ćeliji detektora pojavi uzorak veće molarne provodnosti od eluensa, nastaje pozitivan pik. Nasuprot tome, negativan pik nastaje, ako je molarna provodnost uzorka manja od molarne provodnosti iona eluensa. Primjer dobivanja negativnog pika je fosfat koji je u 2 mmol/L ftalne kiseline pri pH=5,0 prisutan u obliku  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Kako je provodnost dihidrogenfosfata ( $\Lambda_{\infty}(\text{H}_2\text{PO}_4^-) = 33$ ), manja od provodnosti ftalata ( $\Lambda_{\infty}(\text{ftalat}) = 38$ ), pri tim uvjetima dobiva se negativan pik. Kada se određivanje provodi pri pH vrijednostima većim od 5,0 dolazi do pojavljivanja pozitivnog pika zbog prisutnosti fosfata u formi hidrogenfosfata ( $\Lambda_{\infty}(\text{HPO}_4^{2-}) = 57$ ).

Kod određivanja alkalijskih i zemno alkalijskih kationa kao eluens se najčešće koristi 2 mmol/L  $\text{HNO}_3$ . Kako proton ima iznimno visoku molarnu provodnost, kao rezultat njegovog specifičnog mehanizma pokretljivosti, provodnost drastično opada čim se vodikov ion zamjeni s ionom uzorka. To dovodi do pojavljivanja negativne kromatografske krivulje [50].

### 6.5.1.2. Ionska kromatografija s kemijskim supresorom

Supresija ionskog kromatografskog signala potrebna je u slučajevima kada je detekcija onemogućena zbog velikih pozadinskih vrijednosti provodnosti [50].

Kemijska supresija se zasniva na uporabi soli slabo disociranih kiselina kao eluensa (primjerice  $\text{NaHCO}_3$ ). Svi supresori imaju isti zadatak, a to je poboljšanje detekcije analita. Potrebno je uočiti razliku između dva učinka supresorskih reakcija:

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

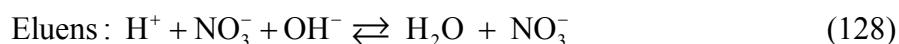
Kod analize aniona kada se kao eluens koristi elektrolit natrijev karbonat/natrijev hidrogenkarbonat u supresoru dolazi do ionske izmjene kationa s vodikovim ionom: U prvom redu izmjenjuje se natrij pri čemu dolazi do stvaranja slabo disocirane karbonatne kiseline (127).



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

Rečeno je da se pri supresiji svi kationi zamjenjuju protonom. Kako proton ima veću molarnu provodnost od ostalih kationa, ta reakcija omogućuje bolju osjetljivost sustava (drugi učinak supresora). Primjerice, molarna provodnost otopine  $\text{NaCl}$  iznosi oko  $126 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (suma molarnih provodnosti  $\lambda_\infty (\text{Na}^+)$  i  $\lambda_\infty (\text{Cl}^-)$ ; tablica 2). Ukoliko se  $\text{Na}^+$  ion zamijeni protonom, u otopini imamo elektrolit  $\text{HCl}$  čija molarna provodnost je znatno veća od ishodišne soli i iznosi oko  $426 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Naravno, ovaj efekt osobito dolazi do izražaja kod jakih kiselina. Za srednje jake kiseline i slabe kiseline, povećanje osjetljivosti znatno je manje.

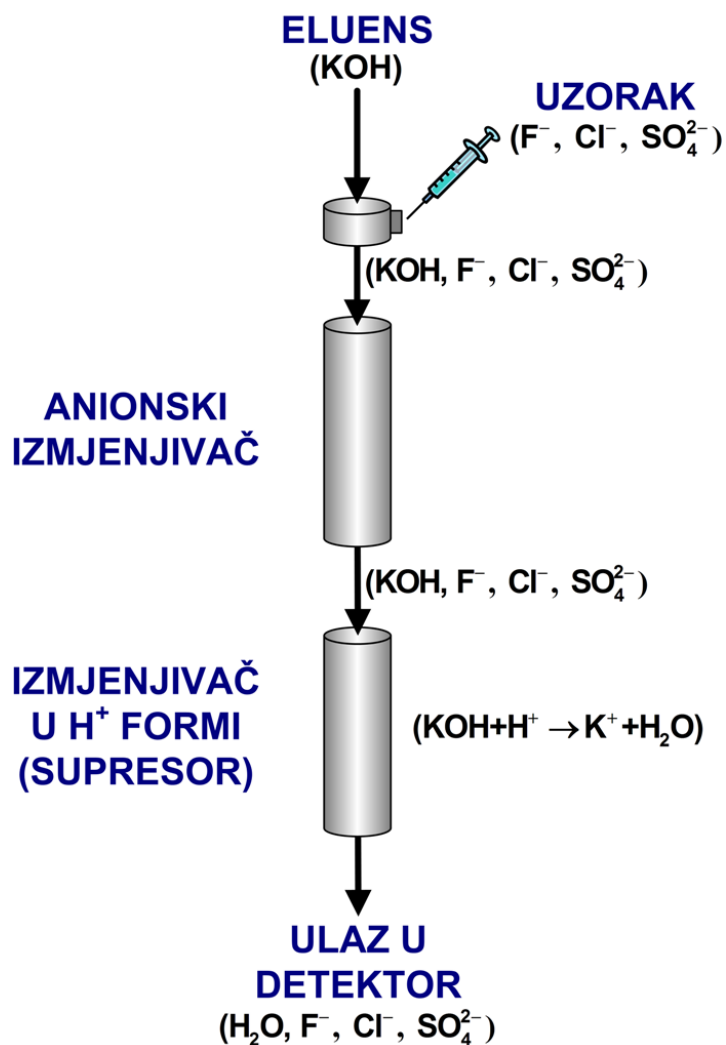
Kod analize kationa, tijekom supresije anioni elektrolita zamjenjuju se hidroksidnim ionima. Promotrimo slučaj kada se kao eluens koristi nitratna kiselina, a kao analit prisutan je natrij klorid. Tada dolazi do sljedećih reakcija:



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

### 6.5.1.3. Supresori

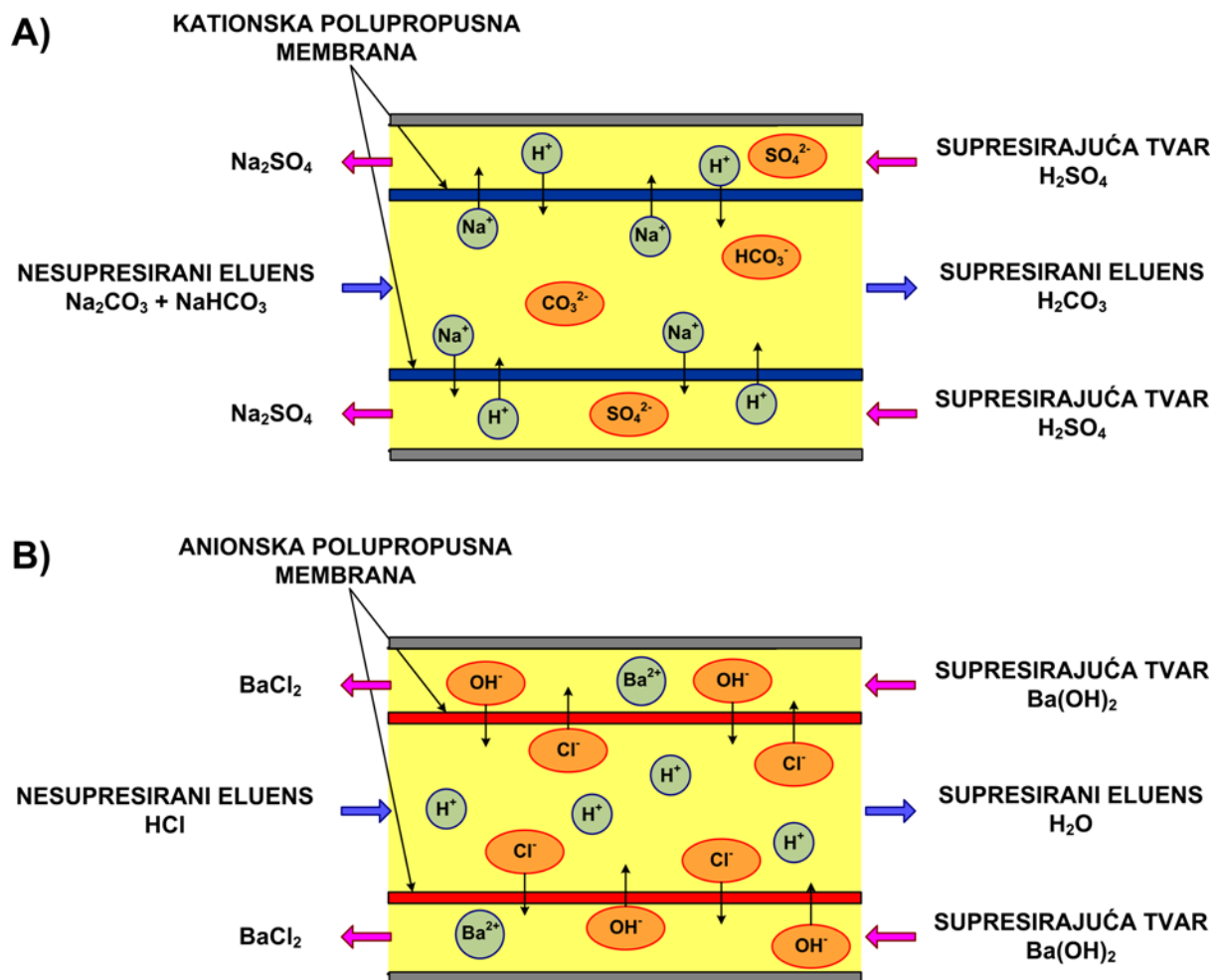
Supresori se mogu podijeliti na diskontinuirano obnovljive supresore i kontinuirano obnovljive supresore. Kao diskontinuirano obnovljivi supresori (slika 38) koriste se ionske izmjenjivačke kolone. Nedostatak ovakvih supresorskih kolona je što se nakon nekoliko sati rada istroše te se moraju obnoviti.



Slika 38. Kolonski diskontinuirano obnovljivi supresor.

Svi kontinuirano obnovljivi supresori (slika 39) sadrže ionsko izmjenjivačka vlakna ili membranu, te rade na protustrujnom principu. Kod vlaknastih supresora, vlakna su uronjena u agens za obnavljanje, npr. razrijeđenu sulfatnu kiselinu. Eluens i analit protječu kroz vlakna, te kroz njih dolazi do ionske izmjene iona eluensa i analita s protonima. Membranski supresor

je konstruiran na principu sendviča. Eluens i analit protječu kroz film između dvije membrane, a otopina za obnavljanje je smještena ispod i iznad tih membrana. Prednost membranskih i vlaknastih supresora je u kontinuiranosti obnavljanja, a mana je osjetljivost na tlak i difuziju iona otopine za obnavljanje u eluens.

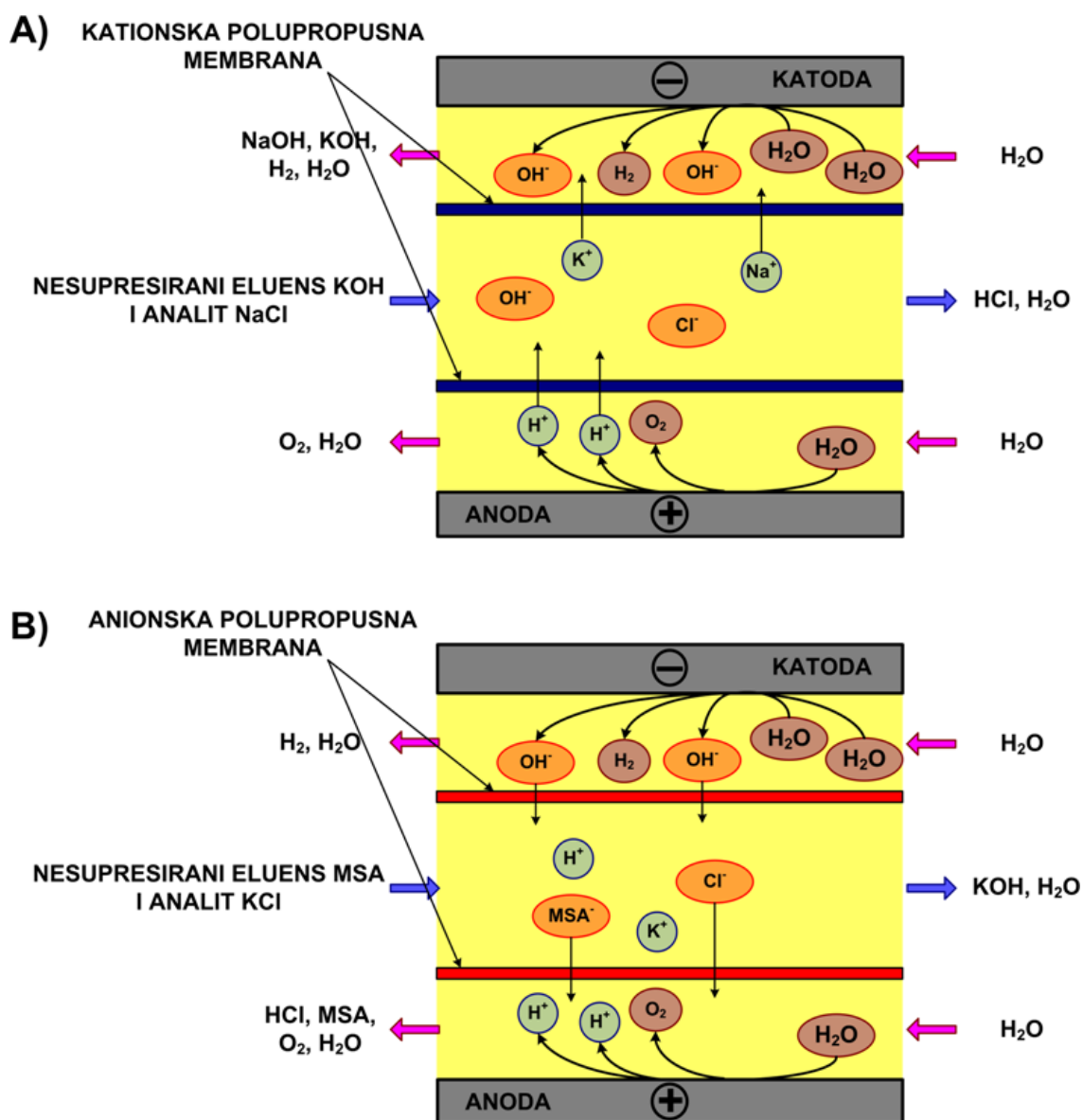


**Slika 39.** Shematski prikaz membranski kontinuirano obnovljivih supresora:

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

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





**Slika 40.** Shematski prikaz elektrolitičkog supresora:

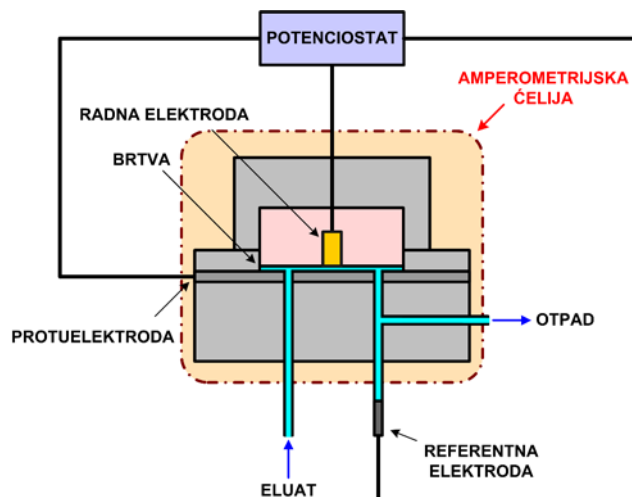
A) pri analizi aniona i B) pri analizi kationa.

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

### 6.5.2. Amperometrijska detekcija

Amperometrijska detekcija se općenito koristi za analize otopina tvari sa  $pK$  vrijednostima iznad 7 koje se zahvaljujući maloj disocijaciji teško ili gotovo nikako ne

detektiraju primjenom supresirane konduktometrije. Konvencionalni amperometrijski detektori koriste troelektrodnu detektorsku ćeliju koja se sastoji od radne elektrode, referentne elektrode i protuelektrode (slika 41).



**Slika 41.** Amperometrijski detektor.

Između referentne i radne elektrode uspostavi se razlika potencijala uslijed čega na površini radne elektrode dolazi do redoks reakcije. Struja elektrona (Faradayeva struja) koja nastaje kao produkt redoks reakcije uravnotežuje se sa strujom koja u suprotnom smjeru teče na protuelektrodi. Jakost struje elektrokemijske reakcije čini signal detektora, a potencijal izmjeren na referentnoj elektrodi služi za korekciju uspostavljene razlike potencijala.

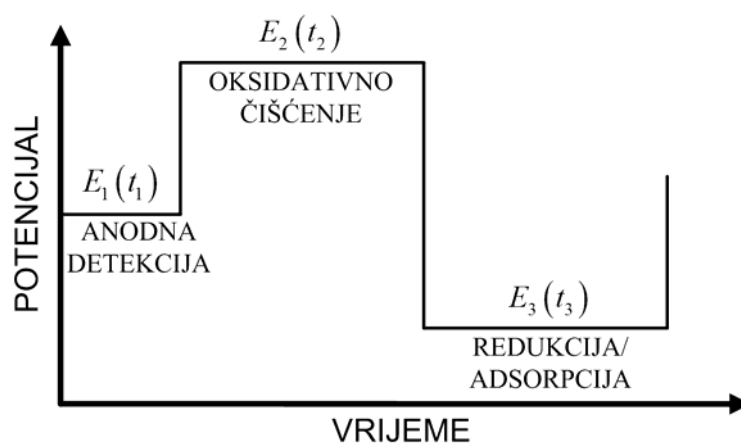
**Tablica 3.** Elektroaktivni spojevi te odgovarajuće radne elektrode i potencijali.

Analit	Radna elektroda	Radni potencijal [V]
$\text{HS}^-$ , $\text{CN}^-$	Ag	0,0
$\text{Br}^-$ , $\text{I}^-$ , $\text{SCN}^-$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	Ag	0,2
$\text{SO}_3^{2-}$	Pt	0,7
$\text{OCl}^-$	Pt	0,2
$\text{AsO}_2^-$	Pt	0,85
$\text{N}_2\text{H}_4$	Pt	0,5

Amperometrijski detektori su zaduženi za analiziranje mnoštva anorganskih i organskih iona u  $\mu\text{g/L}$  rasponima koncentracija. To uključuje sulfide i cijanide, arsen (III), halidne ione, oksihalide, nitrite, tiosulfate, hidrazine i fenole itd. U ovisnosti o kemijskim i elektrokemijskim svojstvima analita primjenjuju se različite radne i protuelektrode, kao i različiti radni potencijali. Pregled nekih elektrokemijski aktivnih tvari te odgovarajućih radnih elektroda i potencijala dan je u tablici 3.

#### 6.5.2.1. Pulsna amperometrijska detekcija

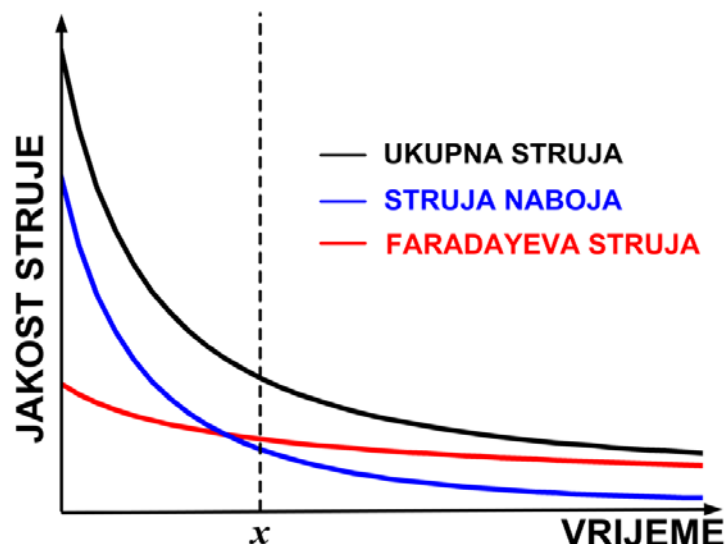
Gubitak aktivnosti elektroda od plemenitog metala, uzrokovan apsorpcijom organskih spojeva, mučio je elektroanalitičare još od početka voltametrije na čvrstim elektrodama [52]. Kao rješenje tog problema dizajniran je pulsni amperometrijski detektor (PAD). Pulsna amperometrijska detekcija za razliku od prethodno opisane detekcije, u principu koristi tri različita radna potencijala,  $E_1$ ,  $E_2$  i  $E_3$ , koji su primijenjeni za vremena  $t_1$ ,  $t_2$  i  $t_3$  na radnoj elektrodi za mjerenje jedne točke na kromatogramu (u jedinici vremena elucije). Rezultirajuća jakost struje mjeri se (integrira) samo u kratkim vremenskim intervalima ukupnog pulsa. Primjenom dodatnih potencijala (više pozitivnih ili više negativnih od integriranih), oksidirane i reducirane adsorbirane tvari mogu biti uklonjene sa elektrodne površine reverznom redoks reakcijom (slika 42).



**Slika 42.** Oblik pulsa potencijala u amperometrijskoj detekciji.

Dvije vrste struje se pojavljuju tijekom oksidacije; struja naboja i Faradayeva struja. Struja naboja rezultat je nabijanja granice faza između elektrode i mase otopine, koja se

ponaša kao kondenzator. Faradayeva struja predstavlja prijenos elektrona u oksidaciji tvari analita. Pad struje naboja slijedi zakon eksponencijalnog vremena kao što je prikazano na slici 43.



Slika 43. Pad jakosti struje unutar primijenjenog pulsa.

Pad Faradayeve struje s vremenom opisan je Cottrellovom jednačbom:

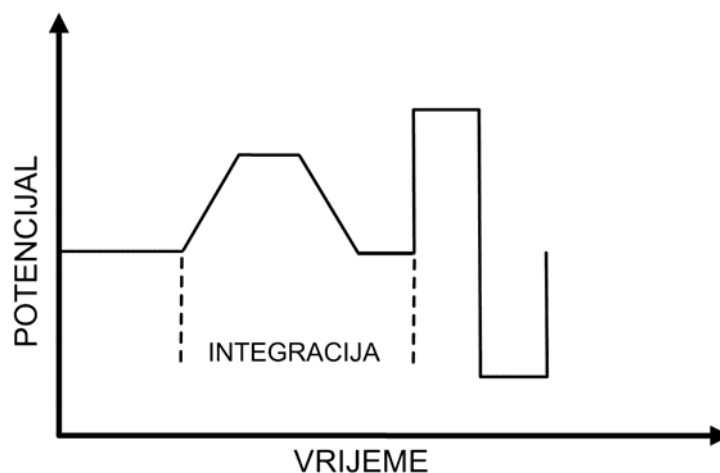
$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot c_0 \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t}} \quad (130)$$

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

#### 6.5.2.2. Integrirana amperometrijska detekcija

Integrirana amperometrija drugi je oblik pulsne amperometrije. Koristi se uglavnom za detekciju aminokiselina, amina i sumpornih organskih komponenti. U pulsnoj amperometriji,

rezultirajuća jakost struje iz oksidacijske reakcije mjereni se pri konstantnom oksidacijskom potencijalu, nakon primjene pulsa i pada struje naboja. U integriranoj amperometriji, potencijal  $E_1$  se ne drži konstantnim, nego je naizmeničan. Prema tome se oksidacija analita i metala radne elektrode odvija istovremeno pri visokom potencijalu. Metalni oksid stvoren pri tom potencijalu odmah se nakon toga ponovno reducira pri nižem potencijalu. Zbog toga što je oksidacija elektrodne površine reverzibilan proces, a oksidacija analita nije, rezultirajući signal uglavnom je karakteriziran strujnim doprinosom od oksidacije analita. Integracijom jakosti struje tijekom ovakvog ciklusa s dobiva se ukupni signal za odgovarajući analit, a metoda je značajno osjetljivija. Pozitivan i negativan potencijal čišćenja radne elektrode dio su pulsnog niza koji slijedi nakon integracijskog koraka. Shematski primjer takvog niza je prikazan na slici 44.



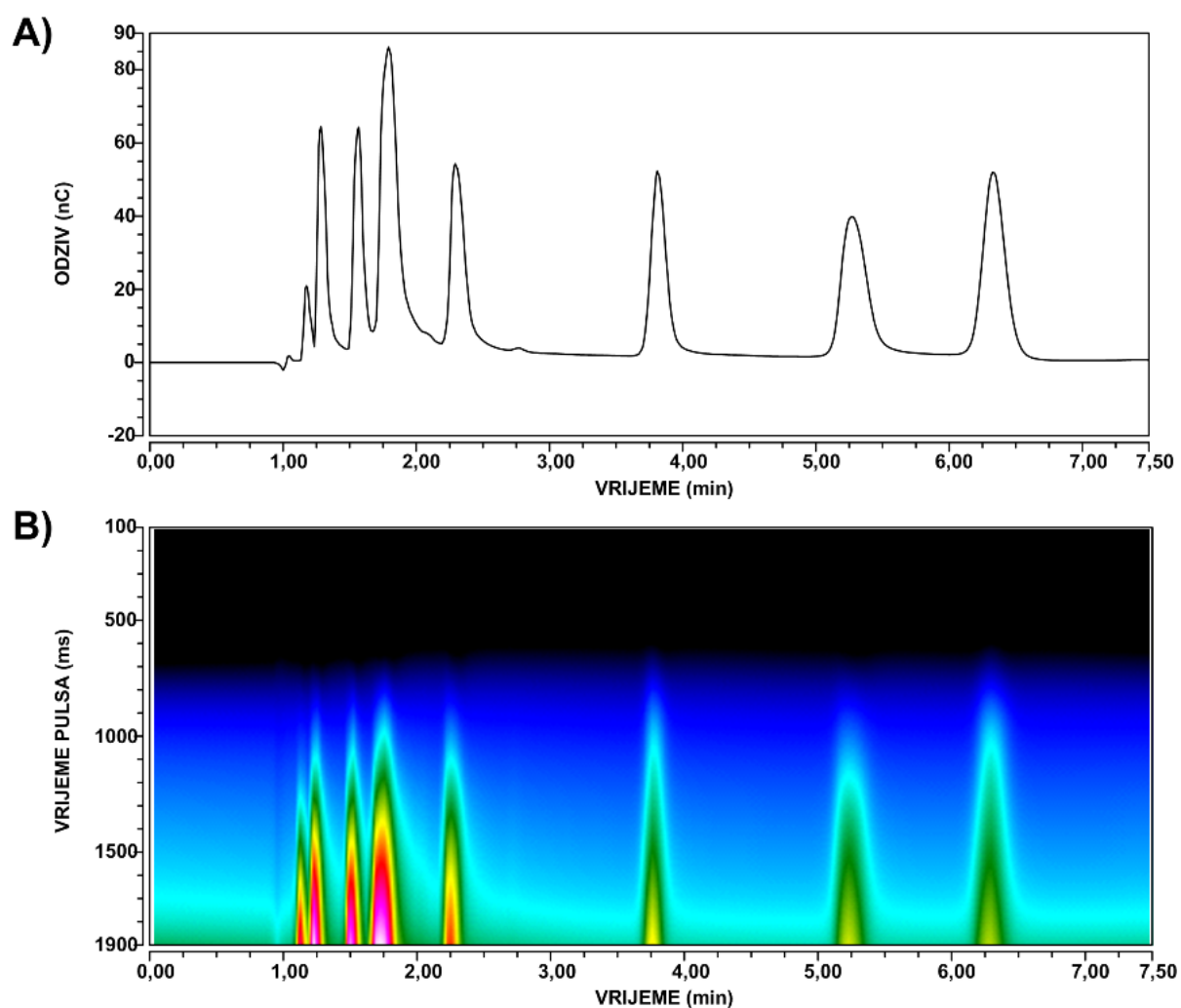
**Slika 44.** Puls u integriranoj amperometriji.

Prednost integrirane amperometrije leži u kulometrijskoj kompenzaciji naboja koji su rezultat stvaranja i naknadne redukcije metalnog oksida. Prema tome, osnovni pomak i osnovni poremećaji, izazvani malim varijacijama sastava pokretne faze, su eliminirani. Cijeli sustav je manje osjetljiv na promjene pH, koji utječe i na njegove potencijale za stvaranje i redukciju metalnog oksida. Potencijal pri kojem je metalna elektrodna površina oksidirana smanjuje se s povećanjem pH.

### 6.5.2.3. 3D amperometrija

Uobičajenom amperometrijom se kroz unaprijed određeni period vremena prikupljaju podaci o jakosti struje nastale kao posljedica uspostavljenog potencijala. 3D amperometrija

proširuje uobičajenu amperometriju na način da omogućuje kontinuirano mjerene jakosti struje u cijelom periodu valnog oblika (jakost struje je integrirana). Kako se različiti kemijski spojevi oksidiraju pri različitim potencijalima, male razlike u iznosu jakosti struje, nastale tijekom pulsnog vala, mogu dati dodatne informacije o identitetu i čistoći tvari koje se analiziraju. Te se razlike mogu mjeriti usporedbom površina pikova dobivenih integracijom struje kroz različite vremenske periode unutar pulsnog vala. Omjer površina pika za različite integracijske periode za dani analit, omogućuje usporedbu nepoznatog i standardnog pika. Nepoznati pik se može identificirati kada je njegov omjer površine pika brojčano isti kao i onaj standarda (uz naravno isto vrijeme zadržavanja). Stupanj odstupanja između tih omjera je mjera čistoće pika. Odnos 3D amperometrije i uobičajene amperometrije na neki način je sličan odnosu koji detekcija s nizom dioda (PDA) ima sa UV/VIS apsorpcijskom detekcijom pri jednoj valnoj duljini.



**Slika 45.** Amperometrijska detekcija: A) uobičajena amperometrija i B) 3D amperometrija (treća dimenzija prikazana je obojenjem).

## 6.6. UV/VIS METODE DETEKCIJE

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

### *Spektroskopija*

Spektroskopija izučava interakcije između tvari i elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje može biti u različitim oblicima: X-zrake, mikrovalovi, UV/VIS zrake, IR zrake, radiovalovi... Rezultat spektroskopske analize je spektar utjecaja intenziteta zračenja na analiziranu tvar u ovisnosti o frekvenciji fotona (valnoj duljini zračenja). Spektroskopija proučava spektre apsorpcije zračenja, emisije zračenja i nasumično nastale spektre.

### *Spektrometrija*

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

### *Spektrofotometrija*

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

#### 6.6.1. Osnove UV/VIS spektrofotometrije

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

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

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

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

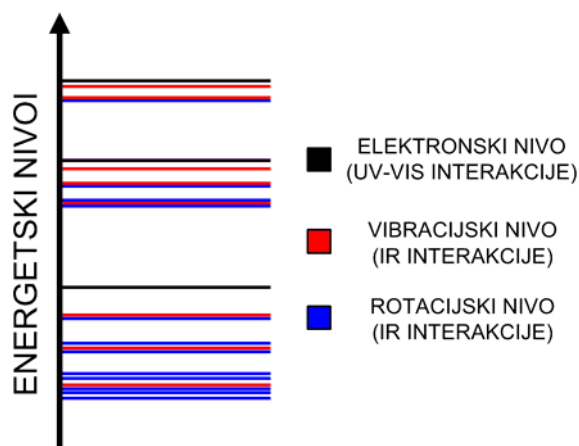
gdje je  $c$  brzina svjetlosti ( $2,998 \cdot 10^8$  m/s). Do apsorpcije fotona dolazi kada je frekvencija svjetlosti  $\nu$ , tj. energija fotona  $E$ , jednaka energiji pobuđivanja atoma; u suprotnom se foton ne apsorbira.

Kada zračenje, koje dolazi iz nekog pogodnog izvora, prolazi kroz uzorak, koji može biti krutina, tekućina ili plin, energija zračenja se prenosi na uzorak uzrokujući elektronske prijelaze na više energetske razine tj. u pobuđeno stanje. Promjena unutarnje energije atoma, iona ili molekule u pobuđenom stanju, sukladno jednadžbi (131), jednaka je  $\Delta E = h \cdot \nu$ . Višak energije se oslobađa emisijom zračenja ako je pobuđeno stanje nestabilno. Dio energije zračenja bit će apsorbiran ako je više energetsko stanje stabilno.

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

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





Slika 46. Energetski prijelazi u molekularnoj spektrofotometriji.

### 6.6.2. Apsorbancija

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

$$\log \frac{I}{I_0} = -a \cdot b \cdot c \quad (133)$$

gdje je  $I$  intenzitet propuštenog zračenja,  $I_0$  intenzitet upadnog zračenja,  $b$  debljina sloja,  $c$  koncentracija molekula koje apsorbiraju i  $a$  apsorpcijski koeficijent koji karakterizira vjerojatnost da čestica apsorbira upadni kvant zračenja. Odnos intenziteta izlaznog i ulaznog zračenja naziva se transmitancija,  $T$ , i izražava se u postocima:

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\% \quad (134)$$

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

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

pa se Lambert-Beerov zakon može pojednostavljeno pisati:

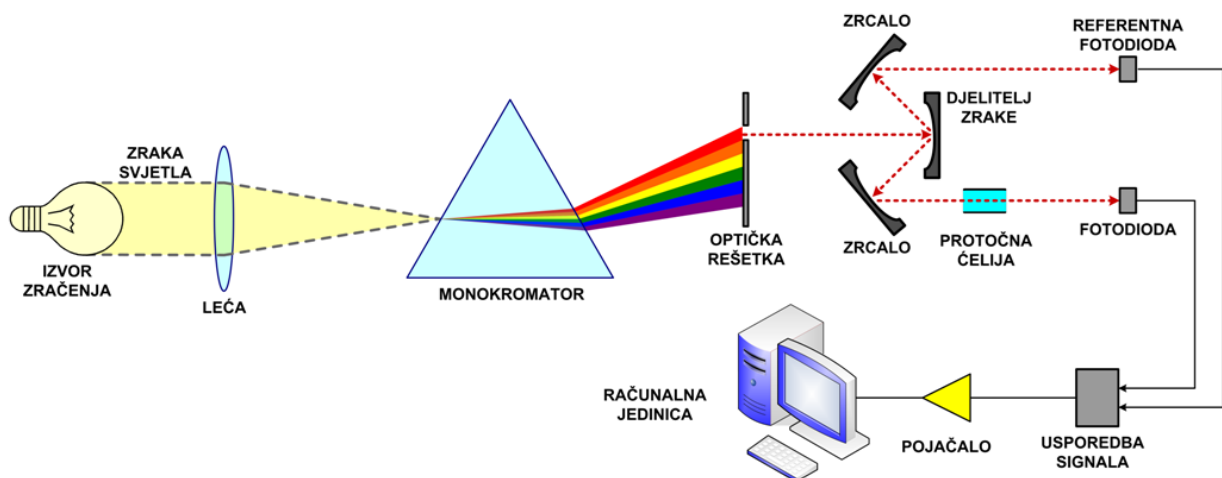
$$A = a \cdot b \cdot c \quad (136)$$

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

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

### 6.6.3. UV/VIS detekcija

UV/VIS detektori koji ne dozvoljavaju promjenu valne duljine iako vrlo ekonomski prihvatljivi, danas zbog svoje zastarjele konstrukcije i niza ograničenja ne nalaze primjenu u ionskoj kromatografiji. Moderni detektori omogućavaju detekciju pri više valnih duljina. Kao sredstvo dobivanja monokromatske svjetlosti različitih valnih duljina koriste monokromator (slika 47). Također, u pravilu, imaju sustav za dijeljenje zrake svjetlosti na mjerenu i referentnu.



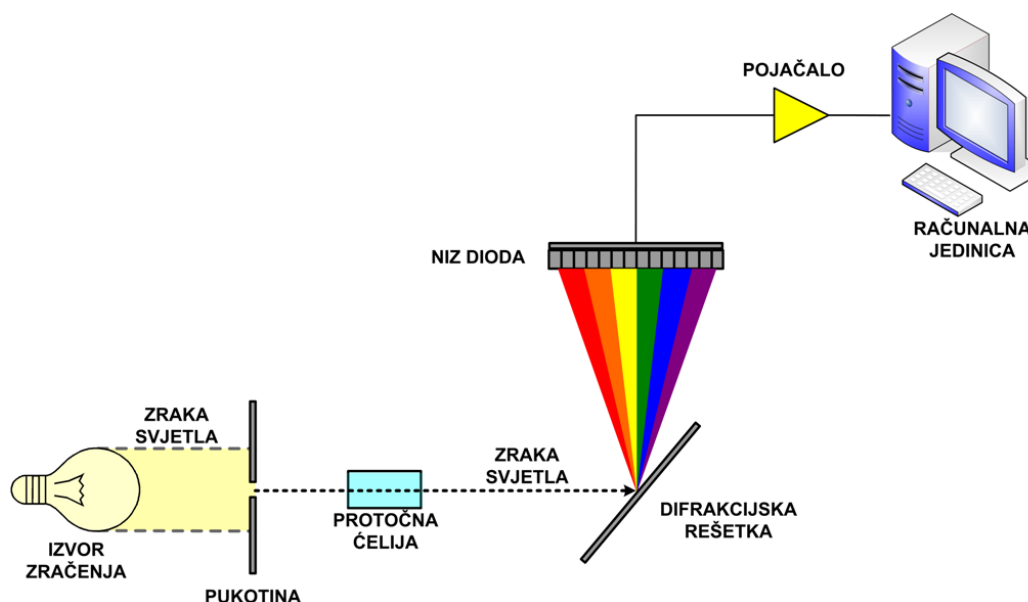
**Slika 47.** UV/VIS detekcija pri različitim valnim duljinama.

Prilagođavanjem valne duljine svakom od sastojaka uzorka, u realnom vremenu njegovog prolaska kroz protočnu ćeliju za detekciju signala, moguće je povećati:

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

#### 6.6.4. Detektor s nizom dioda

Detektor s nizom dioda (engl. *photo diode array detector*, PDA) dodaje novu dimenziju u odzivu ionske kromatografske analize, prevenstveno iz razloga što omogućuje dobivanje i dodatnih kvalitativnih informacija. Drugim riječima, u svakoj snimljenoj toči elucije (za svako vrijeme zadržavanja) dobiva se cjelokupni snimljeni UV/VIS spektar (ne samo apsorbancija za maksimum apsorpcije). U procesu mjerenja, polikromatsko elektromagnetsko zračenje prolazi kro uzorak gdje se odvijaju interakcije pri svim valnim duljinama, a zatim se simultano mjeri apsorbancija pri svim valnim duljinama upotrebom detektora s nizom dioda (slika 48). Svaka od dioda je zadužena za mjerenje apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, a najčešće ih je oko 1000 (za razliku od UV/VIS detektora koji ima jednu mjernu i jednu referentnu diodu).



**Slika 48.** UV/VIS detekcija s nizom dioda.

Postoje dvije glavne prednost upotrebe PDA detektora:

- Moguće je snimiti cjelokupni spektar svakog od prisutnih (i kromatografski razdvojenih) sastojaka uzorka zasebno, te odrediti pripadne maksimume apsorbancije, što pri kvantitativnom određivanju povećava osjetljivost metode.
- Rješava problem čistoće pika. Vrlo često nije moguće iz oblika pika vidjeti da li su sastojci uzorka koeluirali (zajedno eluirali iz kolone). U tom slučaju dovodeći u omjer

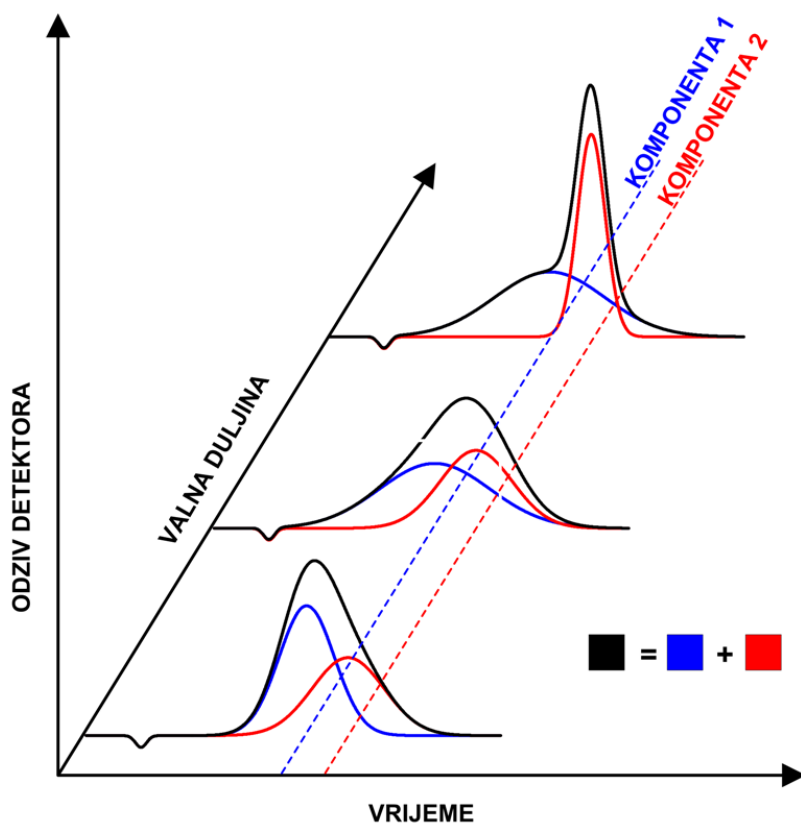
apsorbancije pri različitim valnim duljima moguće je odrediti da li se ionski kromatografski pik sastoji od jedne ili više eluiranih komponenti.

### 6.6.5. Čistoća pika

Čistoća pika izražava se kao postotak podudarnosti signala kromatografskog eluata snimljenih pri nekoj drugoj dimenziji koja nije vrijeme kromatografske analize. Kod 3D amperometrijske detekcije to dodatna dimenzija je napon, a kod spektrofotometrijske valna duljina.

Uzmimo za primjer spektrofotometrijsku detekciju. Da bi se signali komponenti mogli uspoređivati, potrebno ih je normalizirati. Signali se mogu normalizirati s obzirom na maksimalnu površinu kromatografskog pika (usporedba kromatograma) ili s obzirom na maksimalnu apsorbanciju (usporedba spektara). Potencijalna nepodudarnost odziva indikator je koelucije dvaju ili više komponenti (slika 49).

Analogno vrijedi i za analizu čistoće pika u 3D amperometriji.



**Slika 49.** Koncept utvrđivanja čistoće pika u ionskoj kromatografiji sa spektrofotometrijskom detekcijom.

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

## 7. RAZVOJ METODA

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

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

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

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

Razvoj ionske kromatografske metode se generalno sastoji od se sastoji od tri koraka: definiranje kriterija, definiranje domene parametara i logički postupak. Kod definiranja

kriterija potrebno je odabrati onaj kriterij koji najbolje opisuje realne zahtjeve na ionski kromatografski sustav, dok se domena parametara izabire prema postavljenim zahtjevima analitičkog određivanja i ograničenjima ionskog kromatografskog sustava. Logički postupak ili metode o mogu biti različite, a najčešće se koriste računalom potpomognute metode.

## **7.1. STRATEGIJE RAZVOJA IONSKIH KROMATOGRAFSKIH METODA**

Da bi se ostvarili ciljevi razvoja metode potrebno je provesti eksperimente i optimirati ionski kromatografski sustav. Eksperimentalan rad i optimizacija se mogu provesti koristeći metode sekvencijalnog ili simultanog dizajna.

### **7.1.1. Metode sekvencijalnog dizajna**

Metode sekvencijalnog dizajna mogu se podijeliti u metode izviđanja i metode interpretacije.

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

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

### 7.1.2. Metode simultanog dizajna

Kod metoda simultanog dizajna svi eksperimenti se načine prije matematičkog postupka optimiranja. Stoga je vrlo važno da se nekom od tehnika eksperimentalnog dizajna dobro isplanira eksperiment. To uključuje pokrivanje cijele domene parametara eksperimentalnim podacima, te reprezentativno uzorkovanje mjerenih podataka koji se koriste za izradu modela. Za izradu modela najčešće se koriste višestruka linearna regresija, regresija parcijalnih kvadrata, umjetne neuronske mreže dok za pronalaženje optimuma osim analitičkih se koriste metode najstrmijeg spusta, Gauss-Newtonova metoda, Levenberg-Marquardtova metoda i genetički algoritmi.

## 7.2. KRITERIJI USPJEŠNOSTI RAZDVAJANJA I VRIJEMENA ANALIZE

Da bi se procijenilo razdvajanje pikova i vrijeme analize koriste se funkcije kriterija uspješnosti. Koristeći funkcije kriterija uspješnosti, moguće je optimirati ionske kromatografske parametre ionskog kromatografskog sustava, te dobiti optimalni kromatogram. Optimalna ionska kromatografska analiza ima sve sastojke uzorka potpuno razdvojene, te kratko vrijeme analize (kratko vrijeme zadržavanja zadnjeg izlazećeg sastojka analita iz kolone). Da bi se ostvarili navedeni zahtjevi za optimalnu ionsku kromatografsku analizu predložene su različite funkcije kriterija uspješnosti, kako po svojoj matematičkoj formulaciji, tako i po svojoj kromatografskoj interpretaciji, od kojih su najjednostavnije navedene u tekstu dolje.

$$\Delta t_{R\min} = |t_{RFi} - t_{RFj}| \quad (137)$$

Jednadžba (137) prikazuje funkciju kriterija uspješnosti minimalne razlike vremena zadržavanja  $\Delta t_{R\min}$ , gdje su  $t_{RFi}$  i  $t_{RFj}$  funkcije ovisnosti nekih (onih koje je potrebno optimirati) ionskih kromatografskih parametra o vremenu zadržavanja. Vidljivo je da  $\Delta t_{R\min}$  daje odziv za svaki susjedni par eluiranih komponenti zasebno. To je prednost, zbog toga što je moguće pojedinačno vidjeti kako parametri ionskog kromatografskog sustava utječu na razdvajanje svih pojedinih kromatografskih krivulja, ali i mana jer se ne dobiva informacija o cijelom ionskom kromatografskom sustavu u cjelini i globalni optimum. U točki maksimuma funkcije  $\Delta t_{R\min}$  za par kromatografskih krivulja koji je najmanje razdvojen, nalaze se optimalni uvjeti za ionsku kromatografsku određivanje. Njegova glavna mana je nemogućnost kontrole ukupne dužine kromatografske analize, pa se može dogoditi da pri optimalnim



uvjetima kromatografska analiza traje predugo, te da su kromatografske krivulje velikih širina (otežana integracija).

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

Jednadžba (138) prikazuje sumu razlika vremena zadržavanja. Kao što je vidljivo iz jednadžbe, dobiva se jedan odziv za cijeli ionski kromatografski sustav, što je i prednost ovog kriterija, jer sagledava razdvajanje u cjelini, ali i mana jer se ne dobivaju informacije o svakom pojedinom razdvajanju. Na odziv  $\sum \Delta t_R$  najviše utječe par kromatografskih krivulja koje su najviše razdvojene, dok najmanje utječe par kromatografskih krivulja koji je najmanje razdvojen. To rezultira ograničavanjem vremena potrebnog za kromatografsku analizu, međutim može se dogoditi da u točki optimuma svi sastojci uzorka nisu potpuno razdvojeni.

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

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

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

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

Jednadžba (140) prikazuje kriterij granične udaljenosti ( $D$ ), a (141) kriterij kromatografske funkcije odziva. Kod oba kriterija, na vrijednost kriterija jednako utječu razlika između vremena zadržavanja svih međusobno susjednih sastojaka analita. To je prednost zbog toga što se kontrolira razdvajanje između dva najslabije razdvojena sastojka uzorka i što se u isto vrijeme kontrolira ukupno vrijeme trajanja analize. Nedostaci ovih kriterija su što u jednadžbama ne postoje posebni faktori koji kontroliraju razdvajanje dva najslabije razdvojena sastojka i faktori koji kontroliraju ukupno vrijeme trajanja analize. Drugim riječima ovdje se ukupno vrijeme trajanja analize kontrolira preko razdvajanja svih sastojaka, te nije posebno izdvojeno.

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

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

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

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

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

Jednadžba (144) predstavlja kriterij kromatografske eksponencijalne funkcije. Iz jednadžbe je vidljivo da funkcija ima tri konstante koje je potrebno iskustveno odrediti. Konstanta  $\Delta t_{RF \text{ opt}}$  prokazuje željenu razliku vremena zadržavanja, koja vrijedi za razdvajanje između svih sastojaka uzorka. U slučaju da razlika između vremena zadržavanja dvije susjedne kromatografske krivulje bude veća od željene razlike vremena zadržavanja faktor u eksponentu poprima negativnu vrijednost i vrijednost kriterija *CEF* se smanjuje. Konstanta *a*

kazuje koliko će na vrijednost kriterija utjecati razdvajanje između kromatografskih krivulja, za što je odgovoran preostali izraz u eksponentu. Konstanta  $t_{RF}$  prikazuje željeno trajanje kromatografske analize. Povećanjem maksimalnog vremena zadržavanja iznad vrijednosti željenog vremena zadržavanja smanjuje se vrijednost razlomku u drugom faktoru kriterija, što utječe na vrijednost *CEF* funkcije.

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

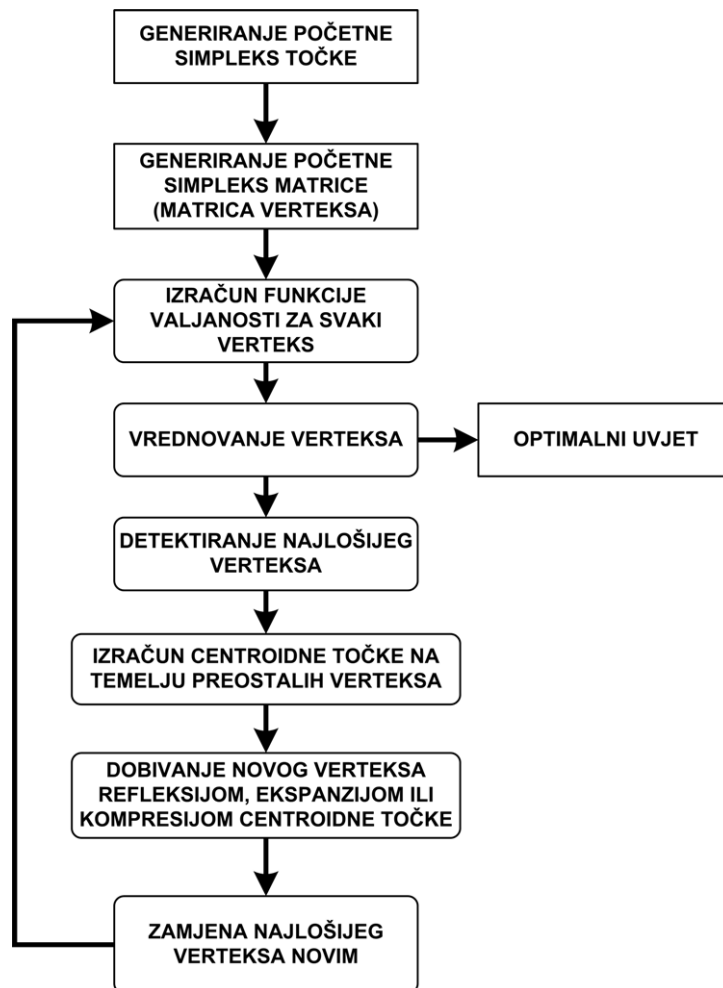
### 7.3. SIMPLEKS

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

Princip optimiranja pomoću simpleks metode možemo objasniti na primjeru traženja gradijentne elucijske metode koja će za neki ionski kromatografski analit producirati optimalnu separaciju komponenti. Najprije se odrede kriteriji na temelju kojih će se vrednovati elucija komponenti (funkcija valjanosti) te vremenski interval unutar kojeg su moguće varijacije u sastavu eluensa (gradijent). Spomenuti interval podijeli se na ograničeni broj vremenskih točaka u kojima je potrebno odrediti optimalnu koncentraciju eluensa. Promjena koncentracije od jedne do druge točke najčešće se uzima linearnom, no to nije isključivo pravilo.

Sukladno shematskom prikazu funkcioniranja simpleks algoritma (slika 50) odabere se proizvoljni početni profil koncentracije eluensa (centralna simpleks točka); najjednostavnije je uzeti izokratni koncentracijski profil. Varirajući koncentracije u definiranim vremenskim točkama, generira se oko centralne simpleks točke matrica različitih gradijentnih profila koje zajedno s centralnom točkom čine objekt u  $N+1$  dimenzijskom prostoru nazvan simpleks. Bitno je istaknuti da je  $N$  broj varijabli, odnosno za konkretni slučaj broj vremenskih točaka u kojima optimiramo koncentraciju eluensa. Svaki od  $N+1$  gradijentnih uvjeta u matrici gradijenata zapravo je jedna od kutnih točaka nastalog simpleksa i naziva se verteks. Odabir

početnih verteksa (početne matrice gradijentnih profila) najčešće se rješava primjenom prikladnog eksperimentalnog dizajna. Kao jednog od najčešće primjenjivanih eksperimentalnih dizajna u simpleks optimiranju ovdje ćemo spomenuti Doehlertov dizajn [66,67] čija karakteristika je generiranje verteksa ravnomjerno raspoređenih oko centralne simpleks točke.



**Slika 50.** Shematski prikaz funkcioniranja simpleks algoritma.

Za svaki od početnih verteksa provede se eksperiment i na temelju funkcije vrijednosti vrednuje eksperimentalno dobivena separacija. Odabere se verteks s najnepogodnijom vrijednosti funkcije (najlošija separacija), a na temelju koordinata preostalih  $N$  točaka odredi se centroid Refleksijom centroida kroz plohu definiranu koordinatama spomenutih  $N$  točaka dobije se novi verteks. Ovisno o potrebama, novi verteks može se dodatno udaljiti od

refleksijske plohe (ekspanzija) ili joj se približiti (kontrakcija). Novi verteks mijenja u matrici gradijenata dotad najnepogodniji verteks te na taj način nastaje novi simpleks.

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

## **7.4. GENETIČKI ALGORITMI**

### **7.4.1. Prirodni evolucijski procesi**

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

Danas se zna da su sva svojstva jedinke zapisana u kromosomima tj. lančastim tvorevinama koje se nalaze u jezgri svake stanice. Skup informacija koje karakteriziraju jedno svojstvo zapisan je u djelu kromosoma nazvanom gen. Kromosomi dolaze uvijek u parovima tako da je jedan kromosom od oca, a drugi od majke. Dakle, za svako svojstvo postoje dva gena ili dvije informacije. U genetskom paru geni mogu biti ravnopravni ili neravnopravni na način da je jedan dominantan, a drugi recesivan. U neravnopravnom paru dominantan gen određuje konačno svojstvo dok se uz ravnopravni par gena dobiva svojstvo koje je negdje između svojstava oca i majke.

Kemijsku strukturu koja je prisutna u kromosomima otkrili su Watson i Crick 1953. godine [68]. Molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNA) nalazi se u obliku dvije spirale građene od fosforne kiseline i šećera, a mostovi između spiralnih niti građeni su od dušičnih baza i to: adenina (A), gvanina (G), timina (T) i citozina (C). Dušične baze su međusobno povezane vodikovim vezama na taj način da se povezuje adenin s timinom i gvanin s citozinom. Jedan kromosom sastoji se od dvije komplementarne niti DNA, a takva struktura dviju spiralnih niti DNA omogućava prenošenje informacije dijeljenjem kromosoma pri diobi stanice. Naime, kada se stanica treba podijeliti, kromosomske niti se razmotaju. Budući da u jezgri stanice ima mnoštvo

slobodnih baza, te baze se vežu na svoje parove na nitima DNA. Proces izmjene pojedinih segmenata kromosomskih niti između unutrašnjih niti (rjeđe i vanjskih) naziva se križanje.

#### 7.4.2. Genetički algoritmi

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

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

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

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

Rješenje određenog problema uz uporabu genetičkog algoritama započinje izborom načina prikaza rješenja. Budući da su genetički algoritmi nastali na prirodnim principima i način prikazivanja također je kopiran iz prirode. Svi podaci koji obilježavaju jednu jedinku zapisani su u jednom kromosomu, a za genetski algoritam je značajno da kromosom predstavlja moguće rješenje zadanog problema. Neki od mogućih načina prikazivanja su

- binarni
- permutacijski
- prikaz nizom znakova.

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

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

Izmjena gena koja nastaje pri reprodukciji u genetskim algoritmima naziva se, kao i u prirodnom procesu, križanje. Dobra valjanost roditelja povezana je s dijelovima njihovog genetičkog materijala, a križanje tog materijala dat će veću funkciju valjanosti. Osim križanja, uočava se još jedna pojava, ali u znatno manjem opsegu. Riječ je o slučajnom mijenjanju genetskog materijala koje nastaje pod djelovanjem vanjskih uzroka, a naziva se mutacija. I dok se križanjem izmjenjuje genetički materijal između dvaju kromosoma u cilju stvaranja potomaka koji su kombinacija svojih roditelja, mutiranjem se mijenja samo mali dio kromosoma. Iako se mutiranjem osigurava ponovno uvođenje genetičke raznolikosti, preveliko mutiranje pretvara genetički algoritam u slučajno pretraživanje. Kako bi se spriječilo da sva rješenja u populaciji ostanu u lokalnom optimumu, mutiranje uvijek slijedi nakon križanja. Križanje i mutacija se kod genetskih algoritama nazivaju genetskim operatorima, a proces izdvajanja najsposobnijih jedinki unutar svake generacije odabirom (selekcijom). Selekcijom se određuju kromosomi na kojima će se primijeniti genetički operatori križanja i mutiranja pri čemu nastaju njihovi potomci. Svrha selekcije je čuvanje i prenošenje dobrih svojstava na sljedeću generaciju jedinki. Stvoreni potomci se zatim natječu sa starim kromosomima na temelju svojih valjanosti i stvaraju novu generaciju. Taj proces se ponavlja dok se ne dostigne kriterij zaustavljanja. Najčešće korišteni kriteriji zaustavljanja su vrijeme ili maksimalan broj generacija. Ipak, u praksi se pokazalo da je nešto bolji kriterij stagnacija funkcije valjanosti najboljeg kromosoma u populaciji kroz određeni broj ciklusa parenja. U samom postupku selekcije niti jedan kromosom nema jamstvo da će biti izabran. Međutim, na temelju funkcije valjanosti postoji veća ili manja vjerojatnost njegovog izbora. Roditeljski kromosomi mogu se odabrati na mnogo načina, ali osnovni princip je da se izabiru bolji kromosomi koji bi mogli dati bolje potomke. Da bi se izbjegao gubitak najboljih kromosoma iz populacije stvaranjem nove, koristi se elitizam. Elitizam je naziv za metodu koja prvo kopira najbolji kromosom (ili nekoliko njih) u novu populaciju. Na taj način se može jako poboljšati izvođenje genetičkih algoritama jer se sprječava gubitak najboljih rješenja [73].

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

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

Primjena genetičkih algoritama za rješavanje različitih problema zahtjeva:

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

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

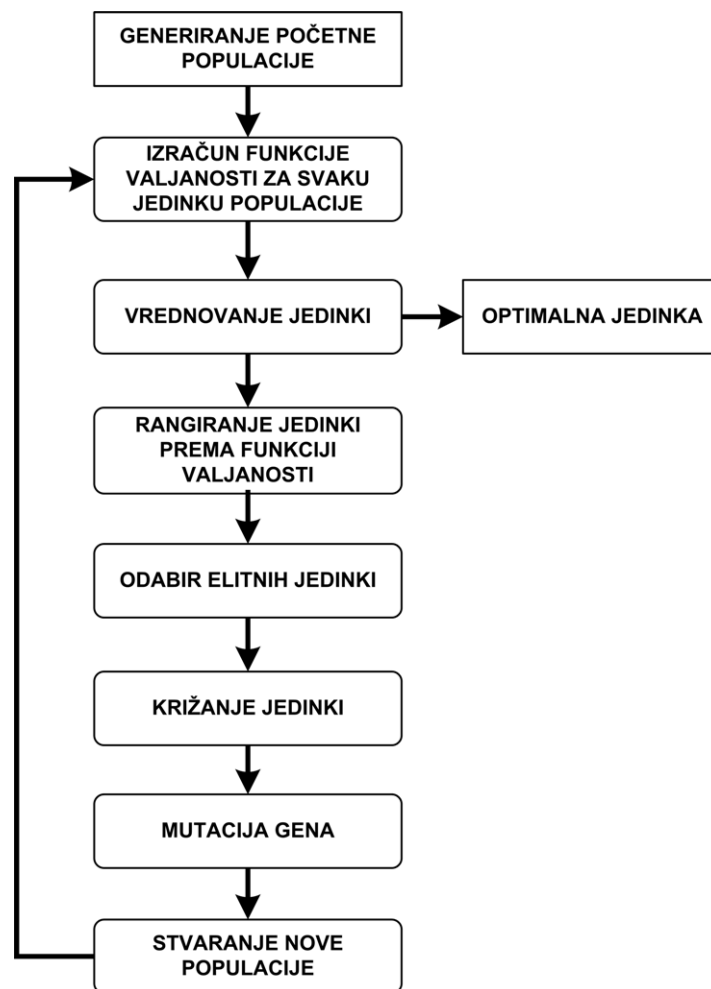
- vjerojatnost križanja bi u većini slučajeva trebala biti visoka, od 80-90 %, iako se pokazalo da je za neke probleme najbolja vjerojatnost križanja od 60 %
- vjerojatnost mutiranja trebala bi biti mala, od 0,5-5 %
- u slučaju malih populacija, genetički algoritam ima samo nekoliko mogućnosti za izvođenje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



- u selekciji se može koristiti princip "kola sreće", u kojem se kromosomi izabiru slučajno, ali ponekad je izbor prema redoslijedu bolji.

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

Shematski prikaz genetičkog algoritma dan je na slici 51.

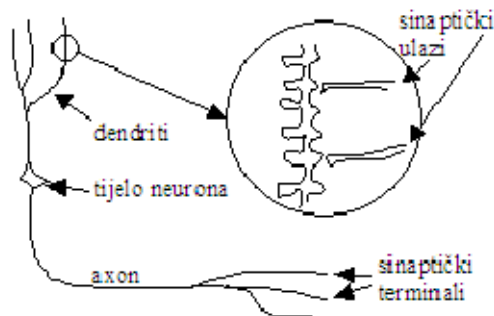


**Slika 51.** Shematski prikaz funkcioniranja genetičkog algoritma.

## 7.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

### 7.5.1. Biološki neuron

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



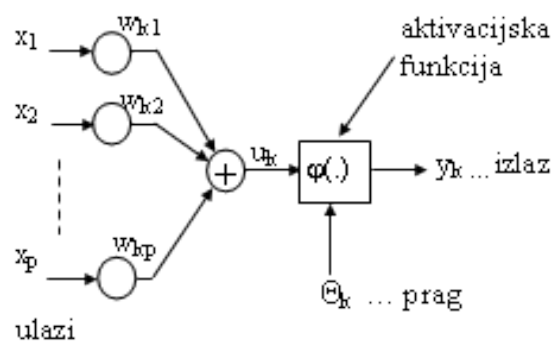
Slika 52. Grafički prikaz biološkog neurona.

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

Neki neuron poslat će impuls ako je doveden u stanje dovoljne uzbuđene, realizirano njegovim trenutačnim (početnim) stanjem, te utjecajem signala od ostalih neurona preko njegovih dendrita ili njegovog tijela u kratkom vremenskom intervalu. Signali koje prenose dendriti mogu biti ili smirujući ili pobuđujući. Matematički gledano suprotnog su predznaka. Neuron šalje impuls kroz svoj akson ako je njegova pobuda veća od smirujućeg utjecaja za kritični iznos, koji predstavlja prag osjetljivosti neurona.

### 7.5.2. Umjetni neuron

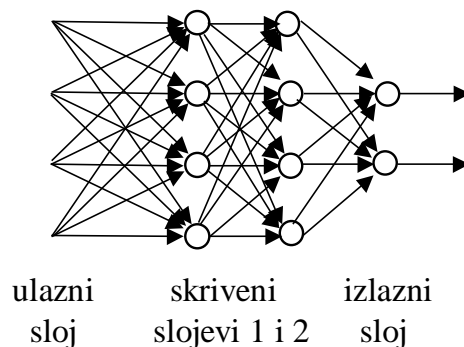
Za umjetni neuron (slika 53) se može reći da se dizajnira s idejom da oponaša osnovne funkcije biološkog neurona. Tijelo biološkog neurona zamjenjuje se sumatorom, ulogu dendrita preuzimaju ulazi u sumator, izlaz sumatora je akson umjetnog neurona, a ulogu praga osjetljivosti bioloških neurona preslikava se na tzv. aktivacijske funkcije. Funkcijske sinaptičke veze biološkog neurona s njegovom okolinom preslikavaju se na težine, preko kojih se i ostvaruje veza umjetnog neurona s njegovom okolinom.



Slika 53. Grafički prikaz umjetnog neurona.

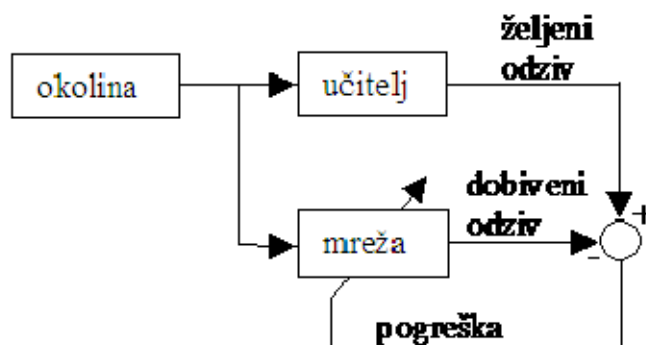
### 7.5.3. Umjetne neuronske mreže

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



Slika 54. Shematski prikaz unaprijedne višeslojne umjetne neuronske mreže.

Postoje dva različita principa na kojima se temelji podučavanje (treniranje) neuronskih mreža i to nadgledano podučavanje (uz nadzor) i nenadgledano podučavanje (bez nadzora). Nadgledano podučavanje (slika 55) zahtijeva vanjskog “učitelja” neuronske mreže koji promatra ponašanje mreže korigirajući je dok se ne dobije željeno ponašanje mreže. Kod ovog načina podučavanja najprije se usvoji određena struktura (topologija) neuronske mreže (broj ulaza, broj izlaza, broj neurona u skrivenom sloju). Početne težine mreže najčešće se usvoje pomoću generatora slučajnih brojeva. Zatim se na ulaz mreže dovodi skup ulaznih varijabli (rezultata eksperimentalnog mjerenja), a mreža producira odgovarajući skup izlaznih varijabli. Skup dobivenih (stvarnih) izlaznih varijabli uspoređuje se sa skupom željenih izlaznih varijabli (rezultati eksperimentalnog mjerenja). Razlika željenih i stvarnih izlaza neuronske mreže čini pogrešku neuronske mreže, koja se koristi za računanje novih težina preko određenog usvojenog algoritma. Cijeli postupak se ponavlja iteracijski dok pogreška mreže ne bude manja od unaprijed zadanog iznosa. Pritom se po potrebi mijenja struktura mreže (broj neurona, broj slojeva). Nakon procesa podučavanja (treninga) slijedi proces validiranja neuronske mreže. To se radi s novim skupom ulaza neuronske mreže (eksperimentalnih rezultata mjerenja) koji nije bio sadržan u ulaznom skupu za vrijeme treniranja neuronske mreže. Stvarni izlazi neuronske mreže se tada uspoređuju sa željenim izlazima (rezultatima eksperimentalnog mjerenja). Pritom se ne mijenjaju parametri mreže (struktura i težine). Iznos pogreške mreže u procesu testiranja služi za ocjenu generalizacijskih svojstava mreže, odnosno za ocjenu sposobnosti mreže da daje zadovoljavajuće izlaze i za skup ulaza kojima nije bila trenirana.



**Slika 55.** Shematski prikaz nadgledanog podučavanja umjetne neuronske mreže.

Da bi se izradio model neuronskih mreža koji može dobro predviđati, potrebno je pronaći optimalan broj neurona u skrivenom sloju i optimalan broj iteracijskih koraka. Kada model neuronskih mreža sadrži premali broj neurona u skrivenom sloju i/ili je neuronska mreža trenirana s premalo iteracija, doći će do nemogućnosti predviđanja nelinearne ovisnosti, koja se očituje kao odstupanje predviđene funkcije od eksperimentalnih podataka korištenih za trening skup. Kada model neuronskih mreža sadrži preveliki broj neurona u skrivenom sloju i/ili je neuronska mreža trenirana s previše iteracija, doći će do nemogućnosti generalizacije (mogućnost predviđanja stvarnih događaja opada), a odstupanje predviđene funkcije od eksperimentalnih podataka korištenih za skup za trening će se smanjiti i biti će zadovoljavajuće. Posljednja navedena pojava naziva se pretreniranje mreže. Cilj postavljanja svakog modela je dobra generalizacija stvarnih pojava koje se modeliraju. Iz tog razloga mogućnost generalizacije modela određuje broj neurona u skrivenom sloju i broj iteracija korištenih za treniranje mreže. U praksi optimizacija modela neuronskih mreža se provodi koristeći testiranje neuronske mreže s vanjskim skupom eksperimentalnih podataka (podaci koji nisu korišteni za trening). Na taj se način direktno ispituje mogućnost generalizacije testiranog modela.

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

## 8. LITERATURA

1. L.S. Ettre: *Pure & Appl. Chem.* **65** (1993) 819-872
2. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina: Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
3. H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman: *Anal. Chem.* **47** (1975) 1801-1809.
4. D.T. Gjerde, J.S. Fritz, G. Schmuckler: *J. Chromatogr.* **186** (1979) 509-519.
5. R.M. Wheaton, W.C. Baumann: *Ind. Eng. Chem.* **45** (1953) 228-233.
6. R.D. Rocklin, E.L. Johnson: *Anal. Chem.* **55** (1983) 4-7.
7. R.S. Alm, R.J.P. Williams, A. Tiselius: *Acta Chem. Scand.* **6** (1952) 826-836.
8. J.S. Fritz, D.T. Gjerde: *Ion Chromatography*, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
9. J. Weiss: *Handbook of Ion Chromatography*, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
10. H. Small: *Ion Chromatography*, Plenum Press, New York, 1989.
11. M. Ogrizek–Gyiketta: Ionski izmjenjivači u analitičkoj kemiji, u I. Filipović, P. Sabioncello (Ed.): *Laboratorijski priručnik: I. dio – knjiga druga*, 2. izd., Tehnička knjiga, Zagreb, 1978.
12. P.R. Haddad, P.E. Jackson, *Ion Chromatography Principles and Applications*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1990.
13. A. Braithwaite, F.J. Smith: *Chromatographic Methods*, 5. izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
14. Š. Cerjan-Stefanović: *Kem. Ind.* **41** (1992) 227-231.
15. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch: *Practical HPLC Method Development*, 2. izd., Wiley, New York, 1997.
16. C.F. Poole, S.K. Poole: *Chromatography today*, Elsevier, Amsterdam, 1991.
17. C.F. Poole: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
18. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler: *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
19. I.N. Bronshtein, K.A. Semendyayev, G. Musiol, H. Muehlig: *Handbook of Mathematics*, 5. izd., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2007.
20. D. Blanco Gomis, N. Sánchez Núñez, E. Andrés García, P. Arias Abrodo, M. Bayod Jasanda, M.D. Gutiérrez Álvarez: *Anal. Chim. Acta* **531** (2005) 105-110.

21. H. Schmidt-Traub: *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Farmaceutical Agents*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
22. R. Tijssen: *The Mechanisms and Importance of Zone-Spreading*, u E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (Ed.): *Handbook of HPLC*, Vol. 78, Marcel Dekker, New York-Basel, 1998.
23. A.J.P. Martin, R.L.M. Synge: *Biochem. J.* **35** (1941) 1358-1368.
24. L. Lapidus, N.R. Amundson: *J. Phys. Chem.* **56** (1952) 984-988.
25. J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg: *Chem. Eng. Sci.* **5** (1956) 271-289.
26. A. Klinkenberg: *Ind. Eng. Chem.* **46** (1954) 2285-2289.
27. B.H. Ketelle, G.E. Boyd: *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2800-2812.
28. G.E. Boyd, A.W. Adamson, L.S. Myers (Jr.): *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2849-2859.
29. N.N. Tunitskii: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **99** (1954) 577-579.
30. J.C. Giddings, H. Eyring: *J. Phys. Chem.* **59** (1955) 416-421.
31. J.C. Giddings: *J. Chem. Phys.* **26** (1957) 169-173.
32. J. Cazes, R.P.W. Scott: *Chromatography Theory*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
33. K. Grob (Jr.), K. Grob: *J. Chromatogr.* **207** (1981) 291-297.
34. P. Kulišić: *Mehanika i toplina*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
35. M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina: *Plošna kromatografija*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006.
36. J.E. Madden, P.R. Haddad, *J. Chrom. A* **829** (1998) 65-80.
37. L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant: *J. Chrom. A* **165** (1979) 3-30.
38. L.R. Snyder: *Gradient Elution*, u Cs. Horváth (Ed.): *High-performance Liquid Chromatography*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1980.
39. T.B. Hoover: *Sep. Sci. Technol.* **17** (1982) 295-305.
40. S.W. Mayer, E.R. Tompkins: *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2866-2874.
41. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf: *Anal. Chem.* **56** (1984) 85-88.
42. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf: *Anal. Chem.* **56** (1984) 88-91.
43. D.R. Jenke: *Anal. Chem.* **56** (1984) 2674-2681.
44. P. Hajós, O. Horváth, V. Denke: *Anal. Chem.* **67** (1995) 434-441.
45. H. Schmidt-Traub: *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Farmaceutical Agents*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
46. J.M. Miller: *Chromatography, Concepts and Contrasts*, II izd., Wiley, New Jersey, 2005.
47. Zs. Pápai, T.L. Pap: *J. Chrom. A* **953** (2002) 31-38.

48. W.J. Lough, I.W. Wainer: High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice, Chapman & Hall, London, 1995.
49. D.Y. Choi, K.H. Row: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9** (2004) 495-499.
50. H. Schäfer, M. Läubli, R. Dörig: Ion Chromatography, Metrohm, Herisau, 1998.
51. P.W. Atkins: The Elements of Physical Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 2001.
52. S. Hughes, P.L. Meschi, D.C. Johnson: *Anal. Chim. Acta* **132** (1981) 1-10.
53. G. Schwedt: The Essential Guide to Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1997.
54. H.H. Willard, L.L. Merritt, F.A. Settle: Instrumental Methods of Analysis, 7. izd., Wadsworth, Belmont, 1988.
55. A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu: *J. Chrom. A* **892** (2000) 75-106.
56. E.J. Klein, S.L. Rivera: *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (2000) 2097-2121.
57. S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasio, M.C. Garcia-Alvarez-Coque: *Anal. Chim. Acta* **396** (1999) 61-74.
58. Š. Cerjan-Stefanović, T. Bolanča, L. Čurković: *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (2000) 2169-2179.
59. Š. Cerjan-Stefanović, T. Bolanča, L. Čurković: *J. Chrom. A* **918** (2001) 325-334.
60. G. Vivo-Truyols, J.R. Torres-Lapasio, M.C. Garcia-Alvarez-Coque: *J. Chrom. A* **876** (2000) 17-35.
61. W. Spendley, G.R. Hext, F.R. Himsforth: *Technometrics* **4** (1962) 441-461.
62. J. Živko-Babić, J. Pandurić, V. Alan, T. Ivaniš, D. Ivanković: *Acta Stomatol. Croat.* **34** (2000) 41-45.
63. J. Živko-Babić, M. Medić-Šarić, A. Mornar, M. Jakovac, I. Jaspica, S. Turina: *J. Planar Chromatogr.* **18** (2003) 63-65.
64. A.M.J. Horvat, D. Ivanković, S. Babić, J. Živko-Babić, M. Kaštelan-Macan: Anodic Sampling and TLC Detection of Dental Alloys, u N. Šegudović (Ed.): 6<sup>th</sup> International Symposium New Achievements in Chromatography: Book of Abstracts, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb, 2000.
65. S. Turina: *Anal. Chem.* **48** (1976) 2038-2039.
66. R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B. de Barros Neto: Statistical Design – Chemometrics, Elsevier, Amsterdam, 2006.
67. D.H. Doehlert: *Appl. Stat.* **19** (1970) 231-239.
68. J.D. Watson, F.H.C. Crick: *Nature* **171** (1953) 737-738.



69. J.R. Koza: Genetic Programming: A Paradigm For Genetically Breeding Populations of Computer Programs to Solve Problems, Tech. Rep. STAN-CS-90-1314, Stanford University, Stanford 1990.
70. P. Cong, T.Li: *Anal. Chim. Acta* **293** (1994) 191-203.
71. W. Banzhaf, P. Nordin, R.E. Keller, F.D. Francone: Genetic Programming: An Introduction, Morgan Kaufmann Publishers, San Francisco, 1998.
72. P.K. Menon, V.H.L. Cheng, T. Lam, L.S. Crawford, G.D. Sweriduk, L.D. Dewell: Genetic Search Toolbox, Optimal Synthesis Inc., Los Altos, 1998.
73. D. Whitley: *Inform. Software Tech.* **43** (2001) 817-831.
74. H. Youssef, S.M. Sait, H. Adiche: *Eng. Appl. Artif. Intell.* **14** (2001) 167-181.