

IÓNOVO-VYLUČOVACIA CHROMATOGRAFIA

**IVETA BOHÁČOVÁ, ANDREA NAGYOVÁ
a RADOSLAV HALKO**

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
halko@fns.uniba.sk*

Došlo 17.8.15, prepracované 2.2.16, prijaté 23.2.16.

Kľúčové slová: separácia, kvapalinová chromatografia, iónovo vylučovacia chromatografia, organické kyseliny

Obsah

1. Úvod
2. Iónovo-vylučovacia chromatografia
 - 2.1. Separčný mechanizmus
 - 2.2. Stacionárna a mobilná fáza
3. Aplikácie iónovo-vylučovacej chromatografie
 - 3.1. Organické kyseliny
 - 3.2. Ďalšie látky
4. Záver

1. Úvod

Iónovo-vylučovacia chromatografia (ICE, z angl. ion-exclusion chromatography), niekedy nazývaná aj „iónovo-vylučovacia rozdeľovacia chromatografia, Donannova vylučovacia chromatografia resp. iónovo-riadená rozdeľovacia chromatografia“, je špeciálnym typom ionexovej chromatografie^{1,2}. Napriek skutočnosti, že v originálnych vedeckých prácach venovaných štúdiu iónovo-vylučovacej chromatografie autori v prevažnej väčšine používajú skratku IEC, v našej práci sme sa rozhodli používať skratku ICE podľa literatúry³ z dôvodu, že oficiálna skratka IEC podľa IUPAC nomenklatúry pre chromatografiu⁴ je pre iónovo-výmennú chromatografiu.

Spôsob separácie látok na ionexoch v ICE je založený na princípe Donnanovej rovnováhy, t.j. odpudzovaní medzi rovnako nabitými iónmi látky a iónmi funkčných skupín stacionárnej (nepohyblivej) fázy. Prvé teoretické základy ICE metódy položili už v roku 1953 Wheaton a Bauman, ktorí vo svojej práci popísali separáciu iónových látok od neiónových látok na ionexe Dowex 50-XS¹. V súčasnosti sa ICE metóda využíva predovšetkým na separáciu tých látok, ktoré je problematické separovať

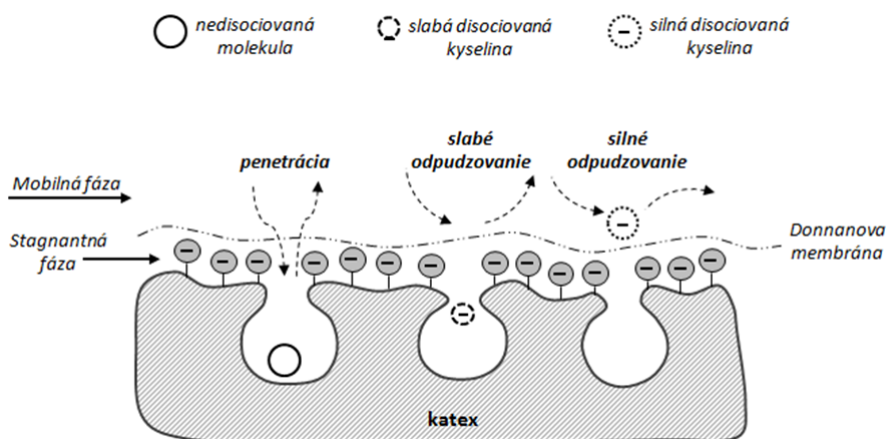
v reverzno-fázovom móde, t.j. slabých anorganických a organických kyselín^{5,6}. Zároveň ICE je možné využiť aj na separáciu alkoholov, aldehydov, aminokyselín ako aj cukrov^{7–9}. Z pohľadu separačného mechanizmu v ICE, okrem popísaného základného separačného mechanizmu látok v ICE na silnom katexe^{1,10}, viacerí autori prezentujú aj alternatívne separačné mechanizmy¹¹. K nejednoznačnosti vysvetlenia separačného mechanizmu v ICE prispieva aj adsorpcia látok na povrch nosiča ionexu a možné sterické efekty. Tento prehľadový článok stručne popisuje všeobecný princíp separácie látok v ICE metóde, výhody a nevýhody použitia rôznych typov stacionárnych a mobilných fáz ako aj možnosti využitia ICE pri separácii organických kyselín ako aj ďalších látok.

2. Iónovo-vylučovacia chromatografia

2.1. Separčný mechanizmus

Základný separačný mechanizmus látok v ICE na silnom ionexe sa uskutočňuje na princípe Donnanovej rovnováhy, t.j. existencie Donnanovho membránového potenciálu na rozhraní ionex-mobilná (pohyblivá) fáza. V ICE disociované látky so súhlasným nábojom, ako má náboj funkčnej skupiny naviazanej na nosiči ionexu, sú odpudzované v dôsledku prítomnosti Donnanovho membránového potenciálu a tak nie sú zadržované ionexom. Nedisociované látky, resp. látky s odlišným nábojom, môžu preniknúť difúziou k ionexu, pretože ich neovplyvňuje Donnanov membránový potenciál a na základe napr. rozličného stupňa disociácie sa môžu separovať na chromatografickej kolóne^{1,2,12}. Na obr. 1 je znázornený ICE separačný mechanizmus silnej a slabšej kyseliny na silnom katexe. V tomto prípade je mobilnou fázou deionizovaná voda, ktorej molekuly pri prechode chromatografickou kolónou vytvárajú nad povrchom katexu hydratačnú vrstvu, tzv. stagnantnú fázu¹². Molekuly vody v stagnantnej fáze môžu byť viazané k funkčným skupinám ionexu prostredníctvom vodíkových väzieb, koordinačnými väzbami a Van der Waalsovskými interakciami typu ión-dipól^{2,12}. V takomto separačnom systéme je zadržanie slabých organických kyselín závislé nie len od ich pKa hodnôt, ale aj od hodnoty pH mobilnej fázy. Výberom vhodného tlmivého roztoku alebo zmenou koncentrácie roztoku silnej kyseliny, ako zložky mobilnej fázy, môžeme ovplyvniť stupeň disociácie slabých kyselín a tým aj ich hodnoty retenčných faktorov¹³.

Sekundárnou interakciou, ktorá sa môže vyskytovať v ICE, je adsorpcia a následná desorpcia hydrofóbnej časti molekuly separovanej látky na povrchu hydrofóbnej časti nosiča katexu, na ktorej nie sú naviazané funkčné skupiny.



Obr. 1. Predpokladaný separačný mechanizmus silnej a slabej kyseliny v ICE

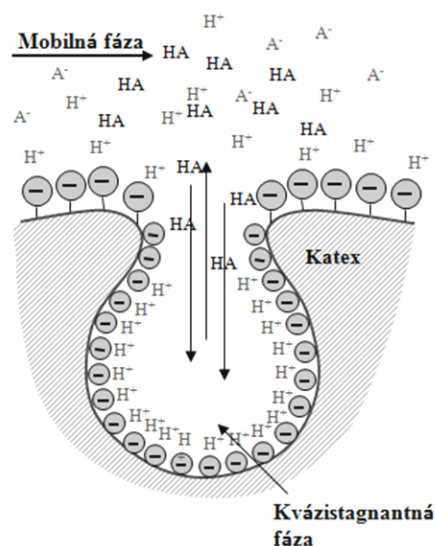
Z tohto dôvodu molekuly s väčším hydrofóbnym povrchom, ako sú aromatické karboxylové kyseliny, vykazujú vyššie hodnoty retenčných faktorov ako alifatické karboxylové kyseliny^{2,3}. Vplyv týchto sorpčných procesov bol pozorovaný aj v prípade alifatických karboxylových kyselín, resp. vyšších alifatických amínov (napr. butylamín a pentylamín), ktorých hodnoty retenčných faktorov sa zvyšovali so vzrastajúcou dĺžkou alkylovej skupiny^{3,14}. Negatívny efekt sorpcie hydrofóbných látok na povrch nosiča je možné eliminovať pridaním vhodného modifikátora (napr. organického rozpúšťadla, iónovopárovacieho činidla resp. vyššieho alkoholu alebo cukru) do mobilnej fázy^{14–16}.

Výraznú úlohu v ICE zohráva tiež sterickej faktor, t.j. molekuly látok s viacerými funkčnými skupinami sú v stagnatnej fáze zadržované kratšie¹⁷. Napríklad šťavelan (soľ dikarboxylovej kyseliny) je zadržovaný v kolóne kratšie ako octan (soľ monokarboxylovej kyseliny) pri mobilnej fáze obsahujúcej $7,5 \text{ mmol l}^{-1}$ kyseliny sírovej^{12,17}. Rovnako izokarboxylové kyseliny, za rovnakých separačných podmienok, majú nižšie hodnoty retenčných faktorov ako ich prislúchajúce lineárne karboxylové kyseliny. Môže to byť vysvetlené tým, že veľkosť pórov živice ako nosiča ionexu je určená jej stupňom zosieťovania¹⁸.

Na základe uvedených skutočností, parametre ktoré ovplyvňujú separáciu látok v ICE môžeme zhrnúť v nasledujúcich bodoch¹¹:

- veľkosť, štruktúra a stupeň disociácie molekúl separovanej látky,
- zloženie a koncentrácia jednotlivých zložiek mobilnej fázy,
- iónová sila a hodnota pH mobilnej fázy,
- prítomnosť modifikátora v mobilnej fáze,
- typ nosiča ionexu a jeho hydrofóbnosť,
- typ funkčných skupín naviazaných na nosiči ionexu,
- stupeň zosieťovania polyméru v stacionárnej fáze,
- iónovo-výmenná kapacita ionexu.

Napriek uvedeným skutočnostiam samotný mechanizmus separácie látok v ICE stále nie je úplne vysvetlený a okrem už uvedeného separačného mechanizmu existuje v ICE aj jeho alternatívna verzia. Podľa Haddada a Noviča¹¹ je v separačnom systéme ICE prítomná aj ďalšia fáza, tzv. kvázistagnantná fáza (angl. occlude liquid), ktorú predstavujú molekuly vody zachytené v póroch katexu. Na rozdiel od predchádzajúceho tvrdenia, v tomto prípade si môžeme Donnanov membránový potenciál predstaviť ako tenký film na celom povrchu katexu vrátane vnútra jeho pórov. Na obr. 2 sa nachádza priblíženie jedného póru katexu, na ktorého povrchu sa vytvorí difúzna vrstva oxóniových iónov pochádzajúcich z vodnej časti mobilnej fázy. Vzhľadom na mikroporéznu štruktúru kate-

Obr. 2. Schematické znázornenie alternatívneho separačného mechanizmu ICE (upravené podľa Noviča a Haddada¹⁰)

xu bude v strede póru pôsobiť elektrostatický potenciál so záporným nábojom, výrazne nižším ako potenciál vytvorený na povrchu katexu. Potom zhluk analytov (angl. analyt cloud) majúci súhlasný náboj ako funkčné skupiny katexu sa môže pohybovať medzi kvázistagnantnou a mobilnou fázou. Z obr. 2 vyplýva, že retenčný mechanizmus môže byť rozdelený do dvoch súčasne sa vyskytujúcich procesov: 1. difúzia zhluku analytov do oblastí s nižším potenciálom a 2. elektrostatické odpudzovanie nabitého zhluku analytov z póru do mobilnej fázy. Intenzita difúzie zhluku analytov je riadená koncentračným gradientom analytu, zatiaľ čo stupeň elektrostatického odpudzovania je závislý od priemernej nábojovej hustoty zhluku analytov (určeného stupňom disociácie analytov) a priemerným elektrostatickým potenciálom naprieč pórom. Ak je mobilnou fázou deionizovaná voda, analyt sa nachádza v disociovanej forme a tak je odpudzovaný od pórov katexu a je viac unášaný mobilnou fázou. Na chromatografickom zázname sa to prejaví frontovaním elučných vln separovaných látok. V prípade, že je mobilnou fázou zriedená silná kyselina, disociácia analytu je potlačená, elektrostatický potenciál povrchu póru je nižší a analyt môže preniknúť hlbšie do póru katexu¹¹.

2.2. Stacionárna a mobilná fáza

Dôležitým krokom pred samotnou ICE separáciou je správny výber stacionárnej fázy, t.j. nosiča ionexu a funkčnej skupiny ionexu resp. mobilnej fázy.

V súčasnosti výber stacionárnej fázy v ICE je relatívne limitovaný, vzhľadom na používané dva základné typy nosičov ionexu, a to: 1. polymérne živice a 2. silikagél, na ktorých môžu byť naviazané rôzne funkčné skupiny ako napr. sulfopropylóva, sulfónová alebo karboxymetylová. Voľbu vhodného nosiča si volíme od typu látok, ktoré chceme separovať. Zo štúdie Ohta a spol.¹⁹ vyplýva, že na

separáciu aromatických karboxylových kyselín sú vhodné katexy na báze silikagélu a pre alifatické karboxylové kyseliny sú to katexy na báze polymetakrylátu. V tab. I sú uvedené vybrané chromatografické kolóny a ich stručne charakteristiky používané v ICE.

Najpoužívanejšou stacionárnou fázou v ICE je plne sulfónovaný polystyrén-divinylbenzénový katex (PS-DVB) vo svojej protónovanej forme. V tomto type katexu stupeň zosieťovania polyméru zohráva dôležitú úlohu v retenčnom správaní sa látok. Harlow a Morman¹⁸ pozorovali retenčné správanie organických a anorganických kyselín, pričom zistili, že reťazce s vyšším stupňom zosieťovania (12 %), sú vhodné pre separáciu slabodisociovaných organických kyselín. Na druhej strane silno disociované kyseliny sa separujú lepšie na katexe s nižším stupňom zosieťovania (2 %). V dnešnej dobe sa používa najčastejšie nosič katexu so stupňom zosieťovania okolo 8 %.

PS-DVB kolóny sa najčastejšie využívajú na separáciu aniónov silných kyselín, anorganických kyselín a na separáciu nižších alifatických kyselín. Ich nevýhodou je nízka tolerancia na prídavok organického modifikátora do mobilnej fázy, ktorého nadbytok môže spôsobiť ich zmršťovanie^{13,20}.

Tento problém môže byť eliminovaný použitím nosiča ionexu na báze silikagélu, ktorý pri pH hodnote väčšej ako 2 má vlastnosť slabokyslého katexu. Silikagél oproti polymérnym živiciam je odolnejší voči prídavkom organického modifikátora do mobilnej fázy^{13,20}. Na druhej strane silikagél je citlivejší na zmenu pH (cit.³). Vzhľadom k tomu, že ide o katex so značne hydrofilným charakterom, je výhodne použiť ho na separáciu hydrofóbných karboxylových kyselín. Na trhu sú dostupné tzv. modifikované a nemoifikované silikagély. Modifikácia silikagélu je prevažne realizovaná naviazaním vhodných funkčných skupín ako napr. sulfopropylóva skupina¹⁹, alebo ide o úpravu povrchu nosiča hliníkom a zirkónom, čím sa

Tabuľka I

Najčastejšie používané kolóny v ICE

Názov kolóny	Matrica	Veľkosť častíc [μm]	Veľkosť pórov [nm]	Funkčná skupina	Protión	Iónová kapacita
TSKgel Oapak-A	hydrofilný polymér	5	–	–	H^+	$>1,5 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel SCX	PS-DVB	5	6	sulfónová	H^+ a Na^+	$>1,5 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel CM-5PW	polymetakrylát	10 a 13	100	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Na^+	$>0,1 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel SP-5PW	polymetakrylát	10,13, 20	100	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	Na^+	$>0,1 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel SAX	PS-DVB	5	6	trimetylamin	Cl^-	$>1,0 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel SP-2SW	silikagél	5	12,5	sulfopropyl	Na^+	$>0,3 \text{ eq l}^{-1}$
TSKgel CM-2SW	silikagél	5	12,5	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Na^+	$>0,3 \text{ eq l}^{-1}$
Aminex HPX-87H	PS-DVB	9	–	sulfónová	H^+	–
Dionex IonPac ICE-AS1	PS-DVB	7,5	mikropóry	sulfónová	–	$>2,0 \text{ eq l}^{-1}$
Dionex IonPac AS11	PS-DVB	13	<1	amónna (kvartérna)	–	$>1,0 \text{ eq l}^{-1}$

zabezpečí vyššia stabilita silikagélu aj pri nižších hodnotách pH (cit.^{21,22}).

Výber mobilnej fázy v ICE je ovplyvnený viacerými parametrami, akými sú jej polarita a hodnota pH, rozpustnosť analytov, kompatibilita s detekčným systémom. Medzi najčastejšie používané mobilné fázy v ICE patria silné minerálne a organické kyseliny (kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a alifatické sulfónové kyseliny). V niektorých prípadoch je možné použiť aj hydrofilnejšie organické rozpúšťadla, akými sú cukry a vyššie alkoholy^{10,14}.

Ako prvou mobilnou fázou v ICE bola využitá deionizovaná voda. Pri jej použití však dochádzalo predovšetkým pri separácii karboxylových kyselín k tvorbe rozmytých, frontujúcich a nedostatočne rozlíšených elučných pík analytov^{20,22}. Je to spôsobené tým, že v separačnom systéme sa nachádzajú kyseliny ako v nedisociovannej, tak aj disociovannej forme a negatívne nabité časti disociovaných foriem kyselín sú elektrostaticky odpudzované od súhlasne nabitých funkčných skupín ionexu. V súčasnosti sa v ICE používa čistá deionizovaná voda predovšetkým na separáciu uhličitanov³.

Turkelson a Richard dokázali, že použitím zriedených roztokov silných kyselín namiesto deionizovanej vody je možná efektívna kontrola stupňa disociácie slabých elektrolytov, čím dochádza k zlepšeniu tvarov elučných pík analytov a ich lepšiemu vzájomnému rozlíšeniu²³. Toto zlepšenie môžeme pozorovať najmä v prípade separácie hydrofilných karboxylových kyselín na PS-DVB kolónach, kde klesá elektrostatická repulzia, a následne sú kyseliny separované podľa ich hydrofóbnej interakcie so skeletom katexu. Zo štúdie Chena a Adamsa²⁴ vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou kyseliny sírovej v mobilnej fáze narastajú retenčné faktory alifatických kyselín (kyselina etándiová, citrónová, pyrohroznová, jantárová, fumárová, galová) v dôsledku znižovania ich stupňa disociácie. Retenčné faktory aromatických kyselín sa menia len minimálne so zvyšujúcou sa koncentráciou kyseliny sírovej. Okrem uvedených silných kyselín boli uskutočnené ICE separácie, kde sa ako elučné činidlo využívali iné organické kyseliny ako napr. kyselina benzoová²⁶ a kyselina izohexánová²².

Ako bolo už uvedené, silné hydrofóbne interakcie analytov s povrchom katexu môžu byť čiastočne oslabené prídavkom organických modifikátorov do mobilnej fázy^{24,26}. Nevýhodou tohto riešenia je, že samotný modifikátor môže reagovať so stacionárnou fázou, čím dochádza k tvorbe nežiaduceho systémového elučného píku rozpúšťadla na chromatografickom zázname¹⁹.

Najčastejšie používanými organickými modifikátormi sú metanol a acetonitril. Veľmi dobre sa uplatňujú pri separácii organických kyselín v ICE aj vyššie alkoholy ako etanol, propanol, butanol až heptanol^{20–22}. Alkoholy s vyšším počtom uhlíkov ako sedem nie je možné použiť, vzhľadom k ich obmedzenej miešateľnosti s mobilnou fázou.

Tanaka a spol. použili ako modifikátor vyššie alkoholy a cukry s 1–8 OH skupinami (metanol, etylén glykol, glycerol, erytritol, xylitol, fruktóza, sorbitol a sacharóza)

pri separácii alifatických karboxylových kyselín na kolóne s PS-DVB živicom¹⁴. Vo svojej práci zistili, že so stúpajúcim počtom OH skupín v cukroch výrazne klesá frontovanie elučných pík analytov. Je to spôsobené zvýšením hydrofilnosti povrchu PS-DVB živice kvôli OH skupinám. Spolu s tým klesá prítlačivosť lipofilných častí molekuly analytu. Rovnaký postup bol aplikovaný aj pri separácii etanolaminov pomocou ICE (PS-DVB živica v OH-forme). Najvhodnejšími alternatívami sa javili alkoholy a cukry s 3–8 alkoholovými skupinami²⁷.

3. Aplikácie iónovo vylučovacej chromatografie

3.1. Organické kyseliny

V súčasnosti sa ICE najčastejšie používa na separáciu slabých organických kyselín (alifatických a aromatických karboxylových kyselín). Najpoužívanejšou stacionárnou fázou je silne protonizovaná PS-DVB živica s vysokou iónovo-výmennou kapacitou ($1,5 \text{ eq l}^{-1}$)^{14,15}, ale ICE separácia hydrofilných ako aj hydrofóbnych organických kyselín môže byť uskutočnená aj na slabom katexe s nižšou iónovo-výmennou kapacitou ($0,1 \text{ eq l}^{-1}$)²⁸. V prípade ICE separácie jednoduchých alifatických kyselín ako napr. mravčia, octová, propiónová a butyrová na PS-DVB živici sa ako mobilná fáza najčastejšie používa kyselina sírová^{19,20}. Publikované boli aj práce s použitím iných minerálnych kyselín ako napr. kyseliny fosforečnej, kyseliny dusičnej a kyseliny perchlórovej^{29,30} alebo organickej kyseliny benzoovej^{31,32}.

Pri separácii aromatických kyselín ICE na PS-DVB živici sa vyskytujú problémy s ich vysokou retenciou na chromatografickej kolóne, ktorú spôsobujú π - π interakcie medzi benzénovým jadrom separovanej kyseliny a hydrofóbnym povrchom PS-DVB živice. Separáciu aromatických kyselín sa vo svojej práci zaoberali Lehotay a Traiter³³. Na separáciu monokarboxylových kyselín (kyseliny benzoovej, *p*-hydroxybenzoovej a salicylovej), dikarboxylových kyselín (kyseliny ftalovej, izoftalovej a tereftalovej) a trikarboxylových kyselín (kyseliny 1,2,4-trihydroxybenzoovej a 1,3,5-trihydroxybenzoovej) použili separačný systém zložený z PS-DVB živice ako stacionárnej fázy a deionizovanej vody ako mobilnej fázy. V tomto separačnom systéme bol pozorovaný nesymetrický tvar elučných pík analytov s výrazne frontujúcim charakterom, čo bolo spôsobené tým, že sa aromatické kyseliny vyskytovali v disociovannej forme. Navrhnutú metódu autori následne aplikovali na stanovenie kyseliny benzoovej v horčici, ktorú odseparovali od ostatných zložiek v priebehu 65 min. Lepšie výsledky na stanovenie kyseliny benzoovej v horčici dosiahli vo svojej práci Glod a Kemula⁶, ktorí použili hydrofilnejší nosič na báze silikagélu namiesto hydrofóbnej PS-DVB živice. Separáciu kyseliny benzoovej od ostatných zložiek matrice tak dosiahli za menej ako 5 min.

Vzhľadom k tomu, že silanolové skupiny sa na povrchu silikagélu správajú pri hodnote pKa približne 7 ako

slabá kyselina, je možné použiť na separáciu karboxylových kyselín aj nemodifikovaný silikagél³⁴. Je všeobecne známe, že komerčne dostupné silikagély obsahujú rôzne stopové množstvá kovových nečistôt, ktoré môžu zvyšovať kyslosť jeho povrchu³⁵. Preto vznikol predpoklad, že tieto „nečisté“ silikagély sa správajú vo veľmi kyslom prostredí ako slabý katex. V nasledujúcich dvoch štúdiách^{20,36} sa ukázalo, že takýmto typom silikagélu je Develosil 30-5, ktorý bol úspešne aplikovaný na separáciu vyšších alifatických a aromatických kyselín. V uvedených prácach autori zistili, že za schopnosť kationovej výmeny Develosilu 30-5 môžu stopové množstvá hliníka prítomné v silikagélu. Nakoľko bol Develosil 30-5 pôvodne vyvinutý ako stacionárna fáza pre normálno-fázovú kvapalinovú chromatografiu (NP-LC), je reprodukovateľnosť kationovej výmeny v jeho prípade nízka. Z nadväznosti na predchádzajúce práce, Ohta a Tanaka²¹ uskutočnili jednoduchú modifikáciu silikagélu hliníkom. Takto laboratórne pripravený silikagél bol následne použitý na separáciu alifatických aj aromatických kyselín. Pri použití 0,5 mmol l⁻¹ kyseliny sírovej obsahujúcej 0,15 % (v/v) heptanolu, dosiahli dobrú separáciu C1–C8 alifatických kyselín (kyselina mravčia, octová, propiónová, butánová, pentánová, hexánová, heptánová a oktánová) za 25 min pri rýchlosti prietoku mobilnej fázy 0,35 ml min⁻¹. Zvýšením koncentrácie kyseliny sírovej na 2,5 mmol l⁻¹ sa im podarilo odseparovať zmes aromatických kyselín (1,2,4,5-benzén-tetrakarboxylová, 1,2,4-benzén-trikarboxylová, *o*-ftalová, *m*-ftalová, *p*-ftalová, salicylová a benzoová kyselina) za 25 min pri prietoku mobilnej fázy 0,35 ml min⁻¹. V ďalšej štúdií²² autori modifikovali silikagél zirkónom (Zr-silica), využitím reakcie silanolových skupín s tetrabutoxidom zirkoničitým v prostredí roztoku etanolu. Takto pripravená Zr-silica sa správala v kyslom prostredí ako katex a bola aplikovaná na separáciu karboxylových kyselín. Najlepšiu separáciu aromatických kyselín získali pri použití Zr-silica (20 mg zirkónu na 1 g silikagélu) a 10 mmol l⁻¹ kyseliny vínnej (pH 2,5) ako mobilnej fázy. Alifatické kyseliny separovali pomocou Zr-silica (10 mg zirkónu na 1 g silikagélu) a 0,2 mmol l⁻¹ vodného roztoku kyseliny 1,2,4,5-benzén-tetrakarboxylovej obsahujúcej 0,15 % (v/v) heptanolu.

Stanovenie organických kyselín pomocou ICE sa využíva predovšetkým na analýzu potravinových vzoriek (víno a ovocné džúsy)^{31,37,38}, vzoriek životného prostredia (odpadové, termálne a minerálne vody a pôdne extrakty) a biologických vzoriek (rastlinné pletivá)^{24,39,40}. Chen a spol.²⁴ použili na stanovenie alifatických a aromatických kyselín v rastlinných extraktoch PS-DVB stacionárnu fázu (Aminex HPX-87H). Ako mobilnú fázu použili 5 mmol l⁻¹ kyselinu sírovú a acetonitril. Osem alifatických (kyselina šťaveľová, citrónová, vínna, jablčná, jantárová, fumarová, mravčia a octová) a deväť aromatických kyselín (kyselina galová, ftalová, 3,4-dihydroxybenzoová, 2,5-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilová, benzoová, kumarová a ferulová) odseparovali pri prietoku mobilnej fázy 0,6 ml min⁻¹ do 100 min. Medze detekcie (LOD) pre alifatické kyseliny boli v rozmedzí od 5,0 do 50,0 μmol l⁻¹

okrem kyseliny fumarovej, ktorej LOD bola 0,05 μmol l⁻¹. Pre aromatické kyseliny boli LOD nižšie, a to v rozmedzí od 0,05 do 0,5 μmol l⁻¹. Na zníženie LOD pre alifatické kyseliny z predchádzajúcej práce použili Chen a spol.⁴⁰ vo svojej štúdií kyselinu 2,6-pyridindikarboxylovú (PDCA) ako mobilnú fázu a na detekciu stanovovaných kyselín použili konduktometrickú a nepriamu spektrofotometrickú detekciu v UV oblasti. Pre konduktometrickú detekciu boli hodnoty LOD v rozmedzí od 1,0 do 7,0 μmol l⁻¹ a pre UV detekciu od 8–30 μmol l⁻¹. V porovnaní s mobilnou fázou obsahujúcou kyselinu sírovú, poskytuje táto metóda vyššie rozlíšenie a vyššiu citlivosť v prípade obidvoch detekcií, vďaka vysokej mólovej absorptivite a nízkej požadovanej vodivosti PDCA. V obidvoch predchádzajúcich prácach bol však problém so stanovením kyseliny šťaveľovej v reálnych vzorkách, nakoľko táto kyselina eluovala spolu s anorganickými aniónmi, ako sú Cl⁻ a NO₃⁻.

Simultánnu separáciu trinástich alifatických a devätnástich aromatických kyselín v jednom behu uskutočnili vo svojej práci Halko a Hukelová⁴¹. Ako stacionárnu fázu použili silikagél so špeciálne modifikovanými reverznými fázami. Mobilná fáza pozostávala z fosforečnanového tlmivého roztoku a metanolu. Alifatické a aromatické kyseliny odseparovali pri prietoku mobilnej fázy 1 ml min⁻¹ do 47 min. LOD sa pre testované kyseliny pohybovali v rozmedzí od 0,002 do 2,224 mg l⁻¹. Navrhnutú metódu následne aplikovali na stanovenie organických kyselín vo víne a v ľudskom moči.

3.2. Ďalšie aplikácie

Cukry a ich deriváty

ICE našla svoje využitie aj v separácii cukrov a ich derivátov. Fisher a spol.⁴² študovali vplyv teploty termostatovania kolóny (katex Polyspher OA-HY, 300 × 6,5 mm) a zmeny koncentrácie kyseliny sírovej ako mobilnej fázy na elúciu ôsmich karboxylových derivátov cukrov (kyselina D-galaktárová, D-glukónová, L-treónová, D-glukárová, D-galakturónová, D-glukurónová, 2-keto-glukónová a 5-keto-glukónová). So stúpajúcou teplotou sa hodnoty retenčných faktorov všetkých derivátov cukrov zvyšovali, čo sa pripisuje čiastočnej tvorbe laktónov⁴³. Naopak zmena koncentrácie kyseliny sírovej nijako výrazne neovplyvňovala retenčné faktory derivátov cukrov. Spolu so spomínanými derivátmi cukrov sa autori snažili odseparovať aj monokarboxylové a dikarboxylové kyseliny a laktóny. Avšak za použitia rovnakých chromatografických podmienok neboli schopní odseparovať jednotlivé analyty s dostatočným rozlíšením na kvantitatívnu analýzu.

Stanovením nielen alifatických kyselín, ale aj sacharózy, glukózy a fruktózy v ovocných džúsoch sa zaoberali vo svojej práci Chinnici a spol.³⁸. Ako mobilnú fázu si zvolili 15 mmol l⁻¹ kyselinu fosforečnú, ktorá oproti kyseline sírovej poskytovala stabilnejšiu základnú líniu a nižší šum pozadia pri UV detekcii. Problém interferencie fruktózy v UV oblasti, ktorá eluovala v rovnakom elučnom čase ako kyselina chinová, autori vyriešili vhodnou úpravou vzorky. Použitím silného aneksu oddelili alifatické

Tabuľka II
Výbrané aplikácie iónovo-vylučovacej chromatografie

Analyty	Vzorka	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Typ detekcie ^a	Medza detekcie	Lit.
Perfluorosulfónové kyseliny	modelová vzorka štandardov	TSKgel Oapak-A (300 × 7,8 mm I.D.) 5 µm	kyselina benzoová, <i>o</i> -ftalová	kondukt.	neuvedené	55
Alifatické kyseliny	červené a biele víno, jablčný mušt a ryžové víno	TSKgel Oapak-A (300 × 7,8 mm I.D.) 5 µm	kyselina benzoová : metanol	UV, kondukt. MS	0,08–2,30 µmol l ⁻¹ kondukt. 0,66 – 3,0 µmol l ⁻¹ MS	31
Alifatické kyseliny	odpadové vody, pôdne extrakty, rastlinné pletivá	Aminex HPX-87H organic acid (300 × 7,8 mm I.D.)	kyselina 2,6-pyridindikarboxylová	nepriama UV a kondukt.	1,0 – 7,0 µmol l ⁻¹ kondukt. 8–30 µmol l ⁻¹ UV	40
Anióny a kationy	termálne vody	TSKgel SuperIC-A/C (150 × 6,0 mm I.D.) 3 µm	kyselina jantárová : 18-crown-6 éter	kondukt.	0,10–0,51 µmol l ⁻¹	53
Aromatické kyseliny a fenol	modelová vzorka štandardov	Zirconium-modified silica gel (250 × 4,6 mm I.D.)	kyselina vínna	UV	0,03–1,1 µmol l ⁻¹	56
Alifatické kyseliny	modelová vzorka štandardov	Silikagél Develosil 30-5 (300 × 7,8 mm I.D.)	kyselina sírová : heptanol	UV	3–10 µmol l ⁻¹	15
Alifatické a aromatické kyseliny	modelová vzorka štandardov	SMBSG B-5 6,1 µM Al-silica 5,3 µm	kyselina sírová : metanol/ etanol/pentanol/heptanol	UV	neuvedené	21
Alifatické kyseliny	vláknina	Metrosep 6.1005.210 organic acid (100 × 7,8 mm I.D.) 10 µm	kyselina sírová	kondukt.	1,0–7,5 µmol l ⁻¹	57
Alifatické aminy	voda	TSKgel DEAE-5PW (150 × 7,5 mm I.D.) 10 µm	analyty	kondukt.	1,0 µmol l ⁻¹	58
Anorganické kyseliny	voda	TSKgel SuperIC-A/C (30 × 6,0 mm I.D.) 3 µm	analyty	kondukt.	< 1,0 µmol l ⁻¹	59
Monoméne cukry, karboxylové kyseliny	modelová vzorka štandardov	Polyspher OA-HY (300 × 6,5 mm I.D.) 8 µm	kyselina sírová	UV	1–10 µmol l ⁻¹	42
Karbohydráty a amino cukry	prírodné vody	Supelcogel C-610H (300 × 7,8 mm I.D.) 9 µm	kyselina mravčia : voda	MS	0,5–2,0 nmol l ⁻¹	44
Alifatické kyseliny	rastlinné oleje a tuky	Rezex ROA Organic Acid H ⁺ (300 × 7,8 mm I.D.)	kyselina chlórvoďíková : acetonitril	MS	0,006–6,80 mg kg ⁻¹	60
Kyselina askorbová a močová	plazma	HEMA-BIO 1000 SB (250 × 4,6 mm I.D.) 10 µm	fosforečnan draselný	UV	0,306 a 0,426 nmol ml ⁻¹	61

^a Kondukt. – konduktometrická detekcia, ^b UV – spektrofotometrická detekcia v ultrafialovej oblasti, ^c MS – hmotnostná spektrometrická detekcia

kyseliny od cukrov a následne tieto dve frakcie nadávkovali do chromatografického systému. Alifatické kyseliny boli stanovené UV detektorom a cukry refraktometrickým detektorom. Dosiahnuté LOD pre fruktózu a glukózu boli 70 mg l^{-1} a 80 mg l^{-1} pre sacharózu.

Stanovením koncentrácie rozpustených voľných sacharidov a aminocukrov v prírodných vodách (horských jazerách) pomocou ICE sa zaoberali Horňák a Perntaler⁴⁴. Trinásť sacharidov a päť aminocukrov separovali na sulfonovanom PS-DVB katexe použitím gradientovej elúcie. Mobilná fáza sa skladala z 0,1 % (v/v) kyseliny mravčej (roztok A) a deionizovanej vody (roztok B). Na dosiahnutie nízkych LOD (nmol l^{-1}) využili MS detekciu v MRM móde (angl. multiple reaction monitoring), kde boli sledované relevantné prechody (prekurzor \rightarrow produktový ión). LOD analytov sa pohybovali v rozmedzí od 0,5 do $2,0 \text{ nmol l}^{-1}$ pre sacharidy a od 0,2 do 1 nmol l^{-1} pre aminokyseliny.

Alkoholy a aldehydy

Plne sulfonované katexy v ICE sú vhodné aj na separáciu krátkych jednosytných a viacsytných alkoholov a aldehydov. Jupille a spol.⁴⁵ využili na separáciu jednosytných alkoholov chromatografický separačný systém zložený z katexu Aminex HPX-85H ako stacionárnej fázy a zriedenej kyseliny sírovej ako mobilnej fázy. Sledované alkoholy eluovali v poradí s narastajúcim hydrofóbnym charakterom, čo poukazuje na podobnosti separačného mechanizmu ICE s reverzno-fázovou HPLC. V tomto prípade bolo stanovenie analytov uskutočnené refraktometrickým detektorom resp. pulznou voltampérometriou (PV), ktorá vykazovala vyššiu citlivosť a selektivitu detekcie⁸. V prípade použitia PV detekcie, bola na separáciu jednosytných a dvojsytných alkoholov použitá elektrochemicky inertná kyselina chloristá ako mobilná fáza⁸.

Na separáciu krátkych alkoholov a aldehydov (napríklad mono-, di- a trietylén glykolu) je v ICE výhodnejšie použiť kolónu s hydrofóbnejšou stacionárnou fázou (IonPac ICE-AS6), ktorá je v porovnaní s hydrofilnejšou stacionárnou fázou (ICE-AS1) selektívnejšia. Na druhej strane pre alkoholy s dlhším reťazcom ako napr. *n*-butanol je výhodnejšie použiť hydrofilnejšiu IonPac ICE-AS1 kolónu, pretože na IonPac ICE-AS6 *n*-butanol vykazuje vyššie hodnoty retenčných faktorov⁴⁶.

Anióny a katióny

Podľa už popísaného základného separačného mechanizmu v ICE (cit.^{1,9}) separácia aniónov silných kyselín na silnom katexe je málo pravdepodobná vzhľadom k tomu, že všetky anióny by mali eluovať v mŕtvom objeme kolóny. Tanaka a spol.⁴⁷, ale dokázali, že niektoré anióny silných kyselín (Cl^- , NO_3^- a SO_4^{2-}) možno navzájom odseparovať na slabo protonizovanom katexe s karboxylovými funkčnými skupinami, použitím slabých kyselín (kyselina vínna) ako mobilnej fázy. V ďalších svojich prácach Tanaka a spol.^{47,48} použili iónovo-vylučovaciu/ionexovú chromatografiu na katexe (angl. ion exclusion/cation-exchange chromatography) na simultánnu separáciu anorganických

aniónov (Cl^- , NO_3^- a SO_4^{2-}) a katiónov (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} a Ca^{2+}). V tomto prípade na slabo protonizovanom katexe s naviazanými karboxylovými funkčnými skupinami boli anióny separované iónovo-vylučovacím mechanizmom, zatiaľ čo katióny boli separované mechanizmom výmeny katiónu. Výhodou využitia takejto stacionárnej fázy je ľahká kontrola disociácie karboxylových skupín na povrchu živice, čím je možné ovplyvniť retenčné správanie iónov analytov^{47,49,50}. Ako mobilné fázy sa prednostne používali kyselina vínna a sulfosalicylová. Nevýhodou týchto mobilných fáz je ich vodivosť a tým vysoké pozadie pri použití konduktometrickej detekcie. Preto nebolo možné stanoviť anióny s nižšou vodivostnou odozvou ako napr. F^- alebo HCOO^- (cit.^{51,52}). Štúdiom výberu vhodnej mobilnej fázy na separáciu aniónov a katiónov pomocou iónovo-vylučovacej/ionexovej chromatografie na katexe sa zaoberali Mori a spol.⁵³.

Problémom pri separácii katiónov v ICE býva nedostatočné rozlíšenie medzi jednotlivými monovalentnými katiónmi. Na zlepšenie rozlíšenia týchto katiónov sa do mobilnej fázy pridáva 18-crown-6 éter, ktorý vytvára stabilné komplexy s monovalentnými katiónmi^{50,53,54}. Ďalšie vybrané aplikácie ICE sú uvedené v tab. II.

4. Záver

Vzhľadom na už publikované práce ICE metóda predstavuje vhodný nástroj hlavne na separáciu látok (napr. alifatických organických kyselín), ktoré v najpoužívanejšom kvapalinovo chromatografickom reverzno-fázovom móde vykazujú veľmi nízke hodnoty retenčných faktorov. Výsledky tiež poukazujú na to, že ICE je vhodnou metódou aj na separáciu ďalších látok ako napr. aniónov, katiónov, alkoholov, aldehydov, aminokyselín ako aj cukrov. Napriek uvedeným skutočnostiam ICE metóda má aj niekoľko nedostatkov resp. niekoľko potenciálnych problémov. Jeden z hlavných nedostatkov je úzky výber stacionárnych fáz, konkrétne nosičov ionexu. V prípade použitia PS-DVB nosiča ionexu je obmedzenie v používaní vyšších koncentrácií organických rozpúšťadiel, kedy môže dochádzať ku degradácii nosiča. V prípade ICE metódy si tiež musíme uvedomiť jej nízku opakovateľnosť, vzhľadom na to, že už pri malej zmene hodnoty pH elučného prostredia môže dochádzať k zmene poradia (selektivity) separovaných látok, hlavne slabých karboxylových kyselín.

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantov VEGA 1/0897/15 a APVV-0583-11.

LITERATÚRA

1. Wheaton R. M., Bauman W. C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 57, 159 (1953).
2. Haddad P. R., Jackson P. E.: *Ion Chromatography: Principles and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1990.

3. Weiss J.: *Handbook of Ion Chromatography*. Wiley-VCH, Weinheim 2004.
4. Ettre L. S.: Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations). *Pure Appl. Chem.* 65, 819 (1993).
5. Lough W. J., Wainer I. W.: *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. Black Academic and Professional, Glasgow 1996.
6. Pryde A., Gilbert M. T.: *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall, Londýn 1979.
7. Glod B. K., Kemula W.: *J. Chromatogr. A* 366, 39 (1986).
8. Cheng Ch., Tsai H. R., Chang K. Ch.: *J. Chromatogr. A* 1119, 188 (2006).
9. LaCourse W. R., Johnosn D. C., Rey M. A., Slingsby R. W.: *Anal. Chem.* 63, 134 (1991).
10. Wilson I. D., Adlard E. R. Cooke, M., Poole C. F. (ed.): *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press, San Diego 2000.
11. Novič M., Haddad P. R.: *J. Chromatogr. A* 1118, 19 (2006).
12. Bhattacharyya L., v knihe: *Applications of Ion Chromatography in the Analysis of Pharmaceutical and Biological Products* (Bhattacharyya L., Rohrer J. S., ed.), kap. 1. Wiley, New York 2012.
13. Ng K. L., Paull B., Haddad P. R., Tanaka K.: *J. Chromatogr. A* 850, 17 (1999)
14. Tanaka K., Ohta K., Fritz J. S., Lee Y., Shim S.: *J. Chromatogr. A* 706, 385 (1995).
15. Tanaka K., Ohta K., Fritz J. S.: *J. Chromatogr. A* 770, 211 (1997).
16. Morris J., Fritz J. S.: *Anal. Chem.* 66, 2390 (1994).
17. Medved A. L., Ivanov A. A., Shpigun O. A.: *Anal. Chem.* 51, 964 (1996).
18. Harlow G. A., Morman D. H.: *Anal. Chem.* 36, 2438 (1964).
19. Ohta K., Ohashi M., Jin J., Takeuchi T., Fujimoto Ch., Choi S., Ryoo J., Lee K.: *J. Chromatogr. A* 997, 117 (2003).
20. Ohta K., Tanaka K., Haddad P. R.: *J. Chromatogr. A* 739, 359 (1996).
21. Ohta K., Tanaka K.: *J. Chromatogr. A* 850, 177 (1999).
22. Ohta K.: *J. Chromatogr. A* 920, 181 (2001).
23. Turkelson V. T., Richard M.: *Anal. Chem.* 50, 1420 (1978).
24. Chen Z., Adams M. A.: *Anal. Chim. Acta* 386, 249 (1999).
25. Tanaka K., Fritz J. S.: *J. Chromatogr.* 361, 151 (1986).
26. Glod B. K., Alexander P. W., Haddad P. R., Chen Z. L.: *J. Chromatogr. A* 699, 31 (1995).
27. Tanaka K., Ohta K., Fritz J. S.: *J. Chromatogr. A* 739, 317 (1996).
28. Fritz J. S.: *J. Chromatogr.* 546, 111 (1991).
29. Chen P., Nie L. H., Yao S. Z.: *J. Chromatogr. B* 673, 153 (1995).
30. Iwata T., Mori M., Itabashi H., Tanaka K.: *Talanta* 79, 1026 (2009).
31. Helaleh M. I. H., Tanaka K., Taoda H., Hu W., Hasebe K., Haddad P. R.: *J. Chromatogr. A* 956, 201 (2002).
32. Ito K., Takayama Y., Ikedo M.: *J. Chromatogr. A* 1039, 141 (2004).
33. Lehotay J., Traiter M.: *J. Chromatogr. A* 91, 261 (1974).
34. Unger K. K.: *Porous Silica*. Elsevier, Amsterdam 1979.
35. Nawrocki J.: *J. Chromatogr.* 407, 171 (1987).
36. Ohta K., Tanaka K., Haddad P. R.: *J. Chromatogr. A* 782, 33 (1997).
37. Dias J. C., Suzuki E., de Albuquerque C. L.: *J. Pharmaceut. Biomed.* 49, 1128 (2009).
38. Chinnici F., Spinabelli U., Riponi C.: *J. Food Compos. Anal.* 18, 121 (2005).
39. Chen Z. L., Glod B.K., Adams M. A.: *J. Chromatogr. A* 818, 61 (1998).
40. Chen Z., Tang C., Xu J.: *J. Chromatogr. A* 859, 173 (1999).
41. Halko R., Hukelová I.: *Chromatographia* 77, 1037 (2014).
42. Fischer K., Bipp H. P., Bieniek D., Kettrup A.: *J. Chromatogr. A* 706, 361 (1995).
43. Hicks K. B., Lim P. C., Haas M. J.: *J. Chromatogr. A* 319, 159 (1985).
44. Horňák K., Pernthaler J.: *J. Chromatogr. A* 1365, 115 (2014).
45. Jupille T., Gray m., Black B., Gould M.: *Am. Lab.* 13, 80 (1980).
46. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.: *Anal. Chem.* 59, 1190 (1958).
47. Tanaka K., Ohta K., Fritz J. S., Matsushita S., Miyayama A.: *J. Chromatogr. A* 671, 239 (1994).
48. Tanaka K., Haddad P. R.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 15, 266 (1996).
49. Xu Q., Xu Ch., Wang Y., Zhang W., Jin L., Tanaka K.: *Analyst* 125, 1453 (2000).
50. Mori M., Tanaka K., Helaleh M. I. H.: *J. Chromatogr. A* 997, 219 (2003).
51. Fischer K.: *Anal. Chim. Acta* 465, 157 (2002).
52. Fan H., Ding M., Tanaka K., Hu W.: *Anal. Sci.* 21, 121 (2004).
53. Mori M., Tanaka K., Satori T., Ikedo M., Hu W.: *J. Chromatogr. A* 1118, 51 (2006).
54. Kwon S. M., Lee K., Tanaka K., Ohta K.: *J. Chromatogr. A* 850, 79 (1999).
55. Abe T., Baba H., Itoh E., Tanaka K.: *J. Chromatogr. A* 920, 173 (2001).
56. Ohta K.: *J. Chromatogr. A* 920, 69 (2001).
57. Dias J. C., Suzuki E., de Albuquerque C. L., Ferreira L., Brito A. R. M. S., Kubota L. T.: *J. Pharmaceut. Biomed.* 49, 1128 (2009).
58. Mori M., Helaleh M. I. H., Xu Q., Hu W.: *J. Chromatogr. A* 1039, 129 (2004).
59. Mori M., Hideyuki I., Helaleh M. I. H., Kaczmariski

- K.: *J. Chromatogr. A* 1118, 41 (2006).
60. Viidanoja J.: *J. Chromatogr. A* 1383, 96 (2015).
61. Ferin R., Pavao M. L., Baptista J.: *Clin. Biochem.* 46, 665 (2013).

I. Boháčová, A. Nagyová, and R. Halko
(*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Bratislava*):
Ion-exclusion Chromatography

In this review, recent developments and applications of the ion-exclusion chromatography are presented. This method, developed by Wheaton and Bauman, has been used mainly for separation of aliphatic and aromatic organic acids, inorganic acids, alcohols, aldehydes, amino acids or sugars. Basic and alternative separation mechanisms of ion-exclusion chromatography method are described. Different types of stationary and mobile phases and their advantages or drawbacks are also discussed. At the end, applications of ion-exclusion chromatography for separation and determination of various analytes in different types of samples are presented.