

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

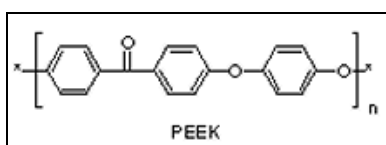
Ο όρος “ιοντική χρωματογραφία” εισήχθη στη διεθνή βιβλιογραφία το 1975 από τον H. Small, με σκοπό την περιγραφή μίας τεχνικής υγρής χρωματογραφίας διαχωρισμού ανόργανων ιόντων, όπου η στατική φάση της στήλης διαχωρισμού ήταν ιονανταλλακτική ρητίνη, το υγρό έκλουσης υδατικό διάλυμα ηλεκτρολυτών και ο ανιχνευτής αγωγιμομετρικός. Σε σειρά με τη στήλη διαχωρισμού ήταν απαραίτητη η τοποθέτηση μίας δεύτερης στήλης ιονανταλλακτικής ρητίνης, με δραστικές ομάδες αντίθετου φορτίου από τη στήλη διαχωρισμού, ώστε να επιτευχθεί εξουδετέρωση της κινητής φάσης, μείωση της αγωγιμότητας υποβάθρου και επομένως αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο.¹ Τα αμέσως επόμενα χρόνια, υπήρξε σημαντική ανάπτυξη στην τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας, τόσο από την πλευρά των αναλυτικών εφαρμογών όσο και από την πλευρά της τεχνολογίας, με αποτέλεσμα να καταστούν εφικτοί προσδιορισμοί, τόσο οργανικών όσο και ανόργανων, κατιόντων και ανιόντων, ακόμη και πολύ ασθενώς ιονιζόμενων σωματιδίων, σε ένα πλήθος φυσικών και βιομηχανικών δειγμάτων. Η τεχνική της χημικής καταστολής (δέσμευση των ιόντων της κινητής φάσης) δεν είναι πλέον μονόδρομος για την ιοντική χρωματογραφία, ενώ τα υγρά έκλουσης δεν είναι αναγκαστικά υδατικά διαλύματα. Παράλληλα, εκτός από τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή, έχει γίνει εφικτό να ενσωματωθούν στην ιοντική χρωματογραφία όλα τα συστήματα ανίχνευσης που είχαν αναπτυχθεί για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, καθώς και οι αντλίες υψηλής απόδοσης που αρχικά ήταν μη συμβατές εξαιτίας των διαβρώσεων που προκαλούσαν τα εκλουστικά υγρά της ιοντικής χρωματογραφίας. Επίσης, ο μηχανισμός διαχωρισμού ιόντων δεν περιορίζεται πλέον στον κλασικό ιονανταλλακτικό μηχανισμό, αλλά μπορούν να επιτευχθούν διαχωρισμοί με βάση μηχανισμό αποκλεισμού κατά μέγεθος (ion exclusion chromatography), με μηχανισμό ιοντικών αλληλεπιδράσεων (ion interaction chromatography) ή με συνδυασμό μηχανισμών για ταυτόχρονο προσδιορισμό ανιόντων και κατιόντων (πολυδιάστατη ιοντική χρωματογραφία). Πολύ σημαντική είναι επίσης η εισαγωγή στην ιοντική χρωματογραφία της τεχνολογίας των στηλών υψηλής απόδοσης, που βασίζονται σε πληρωτικά υλικά μικρής χωρητικότητας και μικρού μεγέθους σωματιδίων.

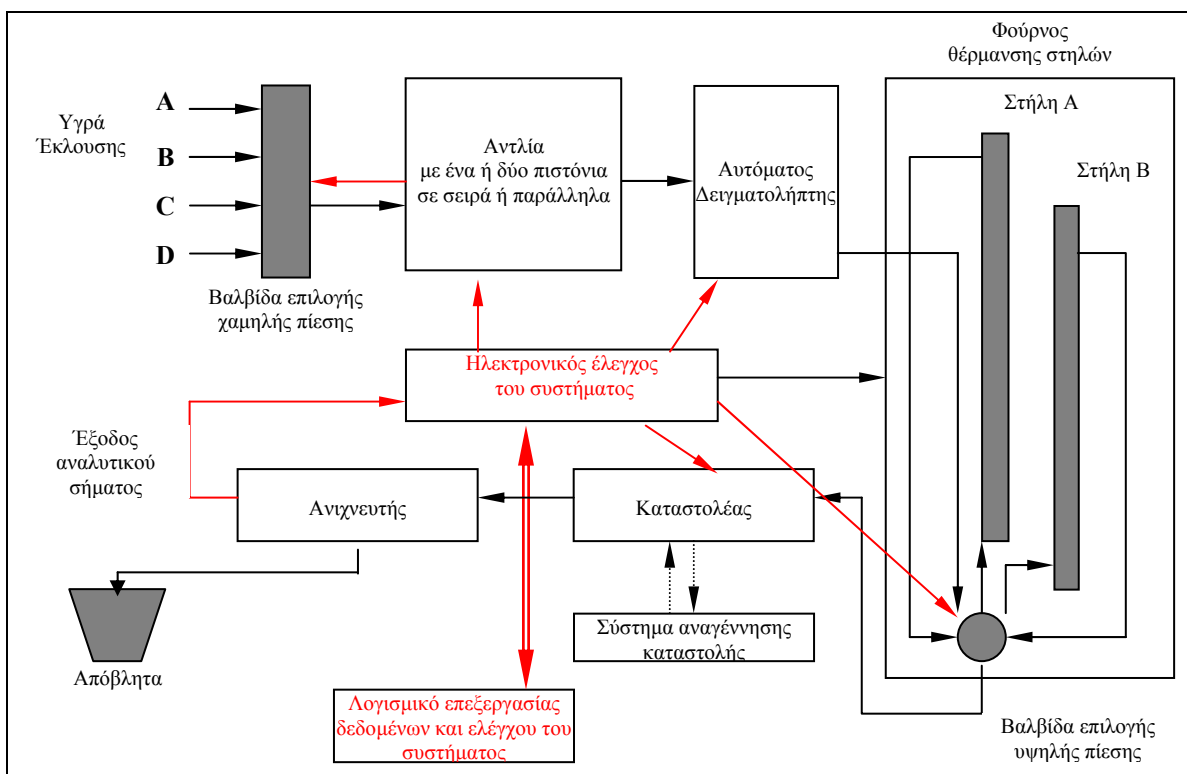
Επομένως, είναι εμφανές ότι ο όρος ιοντική χρωματογραφία, έπειτα από 25 και πλέον χρόνια ανάπτυξης, έχει διευρυνθεί, με αποτέλεσμα να συμπεριλαμβάνει κάθε τεχνική χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που αφορά το διαχωρισμό και προσδιορισμό ιοντικών ενώσεων.

Ένα τυπικό σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας (Σχήμα 1.1) αποτελείται από επτά κυρίως τμήματα:

- 1) Τα δοχεία παροχής κινητής φάσης, η σύσταση της οποίας μπορεί να είναι σταθερή (ισοκρατική έκλυση) ή μεταβαλλόμενη (βαθμιδωτή έκλυση) κατά τη διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού (υποκεφάλαιο 1.7).
- 2) Την αντλία, η οποία καθορίζει τη ροή της κινητής φάσης με την παλινδρομική κίνηση ενός ή δύο πιστονίων, τα οποία τοποθετούνται σε σειρά ή παράλληλα.
- 3) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο αποτελείται από βρόχο καθορισμένου όγκου και μπορεί να συνοδεύεται από σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας.
- 4) Την αναλυτική στήλη, η οποία είναι υπεύθυνη για το χρωματογραφικό διαχωρισμό και συνήθως έχει ως υλικό στήριξης συμπολυμερές στυρενίου / διβινυλοβενζολίου με κάποιο ποσοστό σταυροδεσμών ή πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), όπου στην περίπτωση του ιονανταλλακτικού μηχανισμού το υλικό στήριξης έχει τροποποιηθεί χημικώς με την προσθήκη δραστικών ιονανταλλακτικών ομάδων (υποκεφάλαιο 1.4).
- 5) Το σύστημα καταστολής, το οποίο μειώνει με χημικό, ηλεκτροχημικό ή ηλεκτρονικό τρόπο την αγωγιμότητα υποβάθρου και επομένως τοποθετείται, χωρίς να είναι πάντα απαραίτητο, μόνο στην περίπτωση που ο ανιχνευτής είναι αγωγιμομετρικός (υποκεφάλαιο 1.5).
- 6) Τον ανιχνευτή (υποκεφάλαιο 1.6).
- 7) Το σύστημα ελέγχου, το λογισμικό επεξεργασίας και τη μονάδα αποθήκευσης των δεδομένων.

Με εξαίρεση το θάλαμο της αντλίας, το υλικό κατασκευής των τμημάτων της ιοντικής χρωματογραφίας είναι το οργανικό πολυμερές PEEK (PolyEtherEtherKetone), το οποίο είναι ανθεκτικό σε όλη την περιοχή του pH.





Σχήμα 1.1: Διάγραμμα ροής κινητής φάσης (—→), υγρού καταστολής (.....→), και ηλεκτρονικού σήματος (—→), ιοντικού χρωματογράφου με δύο στήλες και σύστημα χημικής καταστολής.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ανακάλυψη και η εξέλιξη της ιοντικής χρωματογραφίας είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης δύο διαφορετικών τομέων: α) των ιονανταλλακτικών ρητινών και β) της χρωματογραφίας. Η πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία όπου συνδυάζεται η τεχνική της χρωματογραφίας με ιονανταλλακτικό μηχανισμό διαχωρισμού έγινε το 1937 από τους T. Taylor και H. Urey, οι οποίοι χρησιμοποίησαν ζεόλιθους ως πληρωτικό υλικό, με σκοπό τον εμπλουτισμό δειγμάτων σε επιλεγμένα ισότοπα στοιχείων.²

Η ανακάλυψη της χρωματογραφίας αποδίδεται στο Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett, ο οποίος το 1906 δημοσίευσε το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών, με κινητή φάση πετρελαϊκό αιθέρα και πολική στερεή φάση, εντός κατακόρυφης υάλινης στήλης, ορίζοντας παράλληλα τη χρωματογραφία ως εξής: “η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος, στην οποία τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται σε μία στήλη προσρόφησης, που είναι μέρος ενός συστήματος ροής”.³ Τα επόμενα 25 χρόνια δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με τη χρωματογραφία, μέχρι που οι R. Kuhn, A. Winterstein και E. Lederer το 1931 χρησιμοποίησαν οξειδία του πυριτίου, του αργιλίου και του μαγνησίου ως προσροφητικά υλικά για το διαχωρισμό καροτενίων.⁴

Το 1941 οι A. Martin και R. Synge στην προσπάθειά τους να διαχωρίσουν αμινοξέα, εισάγουν την ιδέα της υγρής-υγρής χρωματογραφίας, δηλαδή υγρή κινητή φάση σε συνδυασμό με υγρή στατική φάση επί στερεού υποστρώματος, η οποία βασίζεται στο μηχανισμό της κατανομής και παράλληλα εισάγουν την έννοια των θεωρητικών πλακών.⁵ Η θεωρία των θεωρητικών πλακών οδηγεί το Van Deemter το 1956 στην περιγραφή των θερμοδυναμικών και κινητικών διαδικασιών κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού και στην εξαγωγή εξισώσεων που σχετίζουν την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών.⁶ Το 1952 οι A. Martin και R. Synge τιμούνται με το βραβείο Nobel, την ίδια χρονιά που οι A. Martin και A. James δημοσιεύουν την πρώτη εργασία στην οποία χρησιμοποιείται ως κινητή φάση αέριο και επομένως επινοούν την τεχνική της αερίου χρωματογραφίας.⁷ Πέντε χρόνια αργότερα το 1957, ο M. Golay, υπό την εταιρεία Perkin-Elmer Corp., έπειτα από μελέτες καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι διαχωρισμοί της αερίου χρωματογραφίας βελτιώνονται σημαντικά με τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους (90 έως 180 m) και μικρής εσωτερικής διαμέτρου (0,25 mm) και έτσι εισάγονται στο εμπόριο οι τριχοειδείς στήλες αερίου χρωματογραφίας.⁸ Το 1959 οι P. Flodin και J. Porath εισάγουν την τεχνική της χρωματογραφίας αποκλεισμού κατά μέγεθος, χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης στηλών διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες.⁹

Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, άρχισε μία προσπάθεια βελτίωσης των διαχωρισμών της υγρής χρωματογραφίας, η οποία στην εξέλιξή της οδήγησε στη διαμόρφωση της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπως είναι γνωστή σήμερα. Ο J. Giddings, πρώτος μεταξύ άλλων, αναγνώρισε την ανάγκη κατασκευής πληρωτικών υλικών μικρών σωματιδίων, τα οποία να είναι ανθεκτικά στη χημική διάβρωση και στις υψηλές πιέσεις.¹⁰ Η σημαντικότερη εξέλιξη προς αυτήν την κατεύθυνση έγινε από τον J. Kirkland, ο οποίος το 1969 δημοσίευσε την κατασκευή πληρωτικού υλικού από σφαιρίδια μεμβράνης, τα οποία αποτελούνται από στερεό πυρήνα μεγέθους 30-40 μm επικαλυμμένο με υγρή στιβάδα πάχους 2 μm (pellicular particles) και το 1973 την κατασκευή πληρωτικού υλικού από πορώδη σωματίδια οξειδίου του πυριτίου, διαμέτρου 10 μm , χημικώς τροποποιημένα με αντιδράσεις σιλανισμού.^{11, 12} Από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα υπήρξε μία συνεχής βελτίωση των συστημάτων υγρής χρωματογραφίας, κυρίως σε τρεις τομείς: α) οι στήλες έγιναν περισσότερο ανθεκτικές στη χημική διάβρωση και στις υψηλές πιέσεις και απέκτησαν μικρότερες διαστάσεις και μικρότερο μέγεθος σωματιδίων, β) οι αντλίες απέκτησαν καλύτερη ακρίβεια στη ροή της κινητής φάσης και γ) οι ανιχνευτές απέκτησαν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. Αποτέλεσμα των παραπάνω εξελίξεων είναι η βελτίωση των διαχωρισμών (οξύτερες κορυφές, αύξηση θεωρητικών πλακών κ.τ.λ.), με συνέπεια η υγρή χρωματογραφία να αποκαλείται πλέον χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Η ιστορία των συνθετικών ιονανταλλακτικών ρητινών ξεκινά το 1935, όταν οι B. Adams και E. L. Holmes παρασκεύασαν την πρώτη συνθετική ιονανταλλακτική ρητίνη, η οποία ήταν ένα συμπολυμερές φαινολών, φαινυλοδιαμινών και φορμαλδεΐδης και η οποία εμφάνιζε σημαντικά μεγαλύτερη χημική σταθερότητα έναντι των φυσικών ιονανταλλακτικών υλικών, όπως είναι οι

ζεόλιθοι.¹³ Το επόμενο σημαντικό βήμα έγινε το 1944, όταν ο D' Alelio κατοχύρωσε πατέντα που αφορούσε τον τρόπο χημικής τροποποίησης ρητινών πολυστυρενίου για την εισαγωγή δραστικών ιονανταλλακτικών θεικικών ομάδων.¹⁴ Το 1947, οι S. Mayer και E. Tompkins δημοσιεύουν στο *J. Am. Chem. Soc.* τη φυσικοχημική θεμελίωση του μηχανισμού της ιονανταλλαγής, ως διαδικασία διαχωρισμού ιόντων εντός χρωματογραφικής στήλης.¹⁵ Ένα χρόνο αργότερα, οι S. Moore και S. Stein δημοσιεύουν το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με μηχανισμό ιονανταλλαγής και φωτομετρική ανίχνευση, με βάση το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης των αμινοξέων, μετά τη στήλη, με νινυδρίνη.¹⁶ Για την εργασία αυτή τιμήθηκαν το 1972 με το βραβείο Nobel.

Στο τέλος του 1971, η Dow Chemical Company ξεκινά έρευνα σχετικά με: α) την κατασκευή αγωγιμομετρικού ανιχνευτή, ως γενικού ανιχνευτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό ανόργανων ιόντων σε συστήματα χρωματογραφίας, β) την ανάπτυξη ρητινών για την από-μάκρυνση των ιόντων των εκλουστικών υγρών, χωρίς την απομάκρυνση των προς προσδιορισμό ιόντων ή την αρνητική επίδραση στο χρωματογραφικό διαχωρισμό και γ) την κατασκευή πληρωμένων στηλών χρωματογραφίας με πληρωτικό υλικό ιονανταλλακτικές ρητίνες. Η έρευνα κατέληξε στη δημοσίευση το 1975 από τους H. Small, T.S. Stevens και W. C. Bauman του πρώτου ποσοτικού προσδιορισμού ιόντων με την τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας¹ και στην εμπορική διάθεση το ίδιο έτος του πρώτου ιοντικού χρωματογράφου (Model 10 IC) από την εταιρεία Dionex Corporation. Το 1979 οι D. T. Gjerde, J. S. Fritz και G. Schmuckler χρησιμοποιώντας στήλες μικρής χωρητικότητας, δημοσιεύουν τον πρώτο προσδιορισμό ιόντων με αγωγιμομετρική ανίχνευση χωρίς την καταστολή της αγωγιμότητας υποβάθρου, εισάγοντας την τεχνική της μη καταστέλλομενης ιοντικής χρωματογραφίας¹⁷ (nonsuppressed ion chromatography), η οποία έγινε αρχικώς εμπορικά διαθέσιμη από την εταιρεία Wescan Company και στη συνέχεια από τις Shimadzu, Waters, Metrohm κ.α. Το 1984, για πρώτη φορά μέθοδος προσδιορισμού βασισμένη στην τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας γίνεται επισήμως αποδεκτή (ASTM προσδιορισμός ανιόντων στο νερό).¹⁸ Το 1982 εισάγεται ο καταστολέας κοίλης ινώδους μεμβράνης¹⁹ και το 1985 ο καταστολέας μικρομεμβράνης, ο οποίος, εξαιτίας του μικρότερου πάχους της μεμβράνης (<0,075 mm), είχε αυξημένη ικανότητα καταστολής, επιτρέποντας τη χρήση βαθμιδωτής έκλουσης, πυκνότερων διαλυμάτων έκλουσης και στηλών μεγαλύτερης χωρητικότητας.²⁰ Σημαντική ώθηση στις δυνατότητες της ιοντικής χρωματογραφίας έδωσε ο συνδυασμός για πρώτη φορά από τον R. Williams το 1983 της ιοντικής χρωματογραφίας με φωτομετρικό ανιχνευτή, αποδεικνύοντας παράλληλα ότι ο προσδιορισμός νιτρικών, βρωμιούχων και νιτρωδών ιόντων είναι πιο ευαίσθητος με φωτομετρικό ανιχνευτή στο υπεριώδες σε σχέση με τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή.²¹ Ένα χρόνο πριν, οι H. Small και T. Miller εισήγαγαν την έννοια της έμμεσης φωτομετρικής ανίχνευσης, δηλαδή τη χρησιμοποίηση εκλουστικών ιόντων που απορροφούν στο υπεριώδες για την έκλουση ιόντων που δεν απορροφούν στο υπεριώδες, με αποτέλεσμα τη λήψη χρωματογραφήματος με αρνητικές κορυφές.²² Το 1986, χρησιμοποιείται για

πρώτη φορά ο παλμικός αμπερομετρικός ανιχνευτής σε εφαρμογή ιοντικής χρωματογραφίας.²³ Το 1990 η εταιρεία Dionex Cor. παρουσιάζει την πρώτη στήλη ιονανταλλακτικής ρητίνης πλήρως συμβατή με οργανικούς διαλύτες, ανοίγοντας το δρόμο για προσδιορισμούς οργανικών οξέων και αμινών.²⁴ Την ίδια χρονιά αναφέρεται η πρώτη εφαρμογή ιοντικής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών.²⁵ Το 1992 εισάγεται ο καταστολέας με ηλεκτρολυτική παραγωγή του υγρού καταστολής, καταργώντας την ανάγκη για συνεχή εξωτερική παροχή του.²⁶

Η ιοντική χρωματογραφία παραμένει μέχρι σήμερα μία εξελισσόμενη τεχνική, με συνεχείς βελτιώσεις σε τομείς όπως η αύξηση της ανιχνευσιμότητας και της αξιοπιστίας των προσδιορισμών, η μείωση του κόστους και των απαιτούμενων προκατεργασιών και η μείωση του ολικού χρόνου ανάλυσης.

1.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1.3.1 Χρωματογραφικός Διαχωρισμός^{27, 28}

Η χρωματογραφία είναι μία τεχνική συνεχούς διαφασικής κατανομής κατ' αντιρροή, βασίζεται δηλαδή στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων, όπου η μία φάση διατηρείται ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση ή εκλουστικό διάλυμα). Η σχετική κίνηση της μίας φάσης ως προς την άλλη έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή μεταβολή των στιγμιαίων συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων στιγμιαίων χημικών ισορροπιών των προς διαχωρισμό ουσιών στις δύο φάσεις και επομένως τη μετατόπιση των κατανομών συγκέντρωσης προς την κατεύθυνση κίνησης της κινητής φάσης, με διαφορετική όμως ταχύτητα για κάθε προς διαχωρισμό ουσία, εξαρτώμενη από θερμοδυναμικούς και κινητικούς παράγοντες.

Η αποκατάσταση χημικής ισορροπίας μίας ουσίας εντός δύο φάσεων αντιπροσωπεύει την ισότητα των χημικών δυναμικών της ουσίας στη στατική (μ_s) και την κινητή φάση (μ_m) και επομένως ισχύει:

$$\mu_s^0 + RT \ln a_s = \mu_m^0 + RT \ln a_m \quad (1.1)$$

όπου μ_s^0 , μ_m^0 είναι τα χημικά δυναμικά της ουσίας σε άπειρη αραιώση στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα και a_s, a_m η ενεργότητα της ουσίας στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα.

Από τη σχέση 1.1 προκύπτει:

$$a_s/a_m = e^{\text{const}} = K_D^0 \quad (1.2)$$

δηλαδή ο λόγος της ενεργότητας μίας ουσίας στη στατική φάση (a_s) προς την ενεργότητα της ουσίας στην κινητή φάση (a_m), μετά την αποκατάσταση της χημικής ισορροπίας, είναι σταθερός

για καθορισμένη θερμοκρασία και ονομάζεται θερμοδυναμικός συντελεστής (σταθερά) κατανομής (K_D).

Αν αντί για ενεργότητες χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις, τότε προκύπτει ο συντελεστής κατανομής K_D , η τιμή του οποίου εξαρτάται από τους συντελεστές ενεργότητας γ_s , γ_m της στατικής και κινητής φάσης αντίστοιχα:

$$K_D = C_s/C_m = (\gamma_s/\gamma_m) \cdot K_D^0 \quad (1.3)$$

όπου C_s και C_m είναι οι συγκεντρώσεις της ουσίας στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα.

Ας υποθεθεί, ότι ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε ένα πεπερασμένο αριθμό (r) διακριτών θέσεων κατανομής και έχουν λάβει χώρα (n) κατανομές, όπου το κλάσμα της ουσίας στην κινητή φάση (p) μίας θέσης κατανομής μεταφέρεται κατά την επόμενη κατανομή στη διπλανή θέση κατανομής κατά τη φορά κίνησης της κινητής φάσης. Αποδεικνύεται ότι για μεγάλο αριθμό κατανομών (n), το κλάσμα της ποσότητας της ουσίας στις διάφορες θέσεις κατανομής ($x(n,r)$), ακολουθεί κανονική ή κατά Gauss κατανομή:

$$x(n,r) = [(K_D+1)/Sqr(2\pi n K_D)] \cdot Exp[-(r_{max}-r)^2 \cdot (K_D+1)^2 / 2n K_D] \quad (1.4)$$

όπου το r_{max} παριστά τη θέση της χρωματογραφικής στήλης με τη μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας (μέγιστο του κώδωνα Gauss). Η τυπική απόκλιση της κατανομής αντιστοιχεί στο εύρος της καμπύλης στο 60,7 % του ύψους και ισούται με:

$$\sigma = [Sqr(n K_D)] / (K_D+1) \quad (1.5)$$

Αποδεικνύεται ότι:

$$r_{max} = nr \quad (1.6)$$

Το κλάσμα της ουσίας (p) στην κινητή φάση, για κάθε θέση κατανομής, δίνεται από τον τύπο:

$$p = C_m v_m / (C_m v_m + C_s v_s) = v_m / (v_m + K_D v_s) \quad (1.7)$$

όπου v_s και v_m είναι ο όγκος της κάθε θέσης κατανομής της στατικής και κινητής φάσης αντίστοιχα.

Οι ολικοί όγκοι της στατικής (V_s) και κινητής φάσης (V_m) εντός της στήλης δίνονται από τους τύπους:

$$V_s = r v_s \quad (1.8\alpha)$$

$$V_m = r v_m \quad (1.8\beta)$$

Ο όγκος (V_R) της κινητής φάσης που έχει καταναλωθεί κατά τη διάρκεια των (n) κατανομών είναι:

$$V_R = n v_m \quad (1.9)$$

Συνδυάζοντας τις σχέσεις 1.6, 1.7, 1.8α, 1.8β, και 1.9 προκύπτει:

$$V_R = V_m + K_D V_s \quad (1.10)$$

Η σχέση 1.10 αποτελεί τη βάση των χρωματογραφικών διαχωρισμών, καθότι αποδεικνύει ότι αν μία ουσία εισαχθεί σε μία χρωματογραφική στήλη, τότε ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση της ουσίας εξαρτάται από το συντελεστή κατανομής K_D . Επομένως, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός δύο ουσιών εξαρτάται από τη διαφορά των συντελεστών κατανομής K_D των δύο ουσιών. Ο όγκος V_R ονομάζεται όγκος έκλυσης ή ανάσχεσης ή συγκράτησης (elution ή retention volume) και ο όγκος V_m νεκρός όγκος της στήλης (void volume). Για την ύπαρξη μεγαλύτερης ακρίβειας στις μετρήσεις χρησιμοποιείται η έννοια του σχετικού (relative) ή ανηγμένου (adjusted) όγκου ανάσχεσης (V_R'), που δίνεται από τον τύπο:

$$V_R' = V_R - V_m \quad (1.11)$$

Με διαίρεση του νεκρού όγκου, του όγκου έκλυσης και του σχετικού όγκου έκλυσης με την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης λαμβάνεται ο νεκρός χρόνος, ο χρόνος έκλυσης και ο σχετικός χρόνος έκλυσης αντίστοιχα.

1.3.2 Χρωματογραφικός Διαχωρισμός με Μηχανισμό Ιονανταλλαγής^{27, 29}

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με το μηχανισμό της ιονανταλλαγής στηρίζεται, όπως όλοι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί, στο μερισμό μίας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων και στη στιγμιαία αποκατάσταση χημικής ισορροπίας. Οι φάσεις που συμμετέχουν στον παραπάνω διαχωρισμό είναι: α) ένα διάλυμα ιόντων, με διαλύτη συνήθως νερό, υπό ροή (κινητή φάση ή εκλουστικό υγρό) και β) ένα στερεό πολυμερές, με σχεδόν μηδενική διαλυτότητα στο διαλύτη της κινητής φάσης, που φέρει ιονισμένες δραστικές ομάδες (functional groups) χημικώς προσδεμένες στο πολυμερές υπόστρωμα (ιονανταλλάκτης). Η ηλεκτρική ουδετερότητα του ιονανταλλάκτη επιτυγχάνεται με την ύπαρξη ίσου και αντίθετου φορτίου προς τις δραστικές ομάδες αντισταθμιστικών ιόντων (counter ions), τα οποία συγκρατούνται στη ρητίνη εξαιτίας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις δραστικές ομάδες.

Δέσμευση εκλουόμενων ιόντων (S^y) που βρίσκονται στην κινητή φάση από τις δραστικές ομάδες (R) του ιονανταλλάκτη, έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση από τον ιονανταλλάκτη αντισταθμιστικών ιόντων (E^x) ίσου φορτίου προς την κινητή φάση. Η ισορροπία που αποκαθίσταται είναι η εξής:



Η σταθερά χημικής ισορροπίας, η οποία ονομάζεται και σταθερά εκλεκτικότητας (K_E^S), είναι ίση με:

$$K_E^S = ([S^y]_R)^x ([E^x]_S)^y / ([S^y]_S)^x ([E^x]_R)^y \quad (1.13)$$

όπου $[S^y]_R$ και $[S^y]_S$ είναι οι συγκεντρώσεις του εκλούμενου ιόντος στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα και $[E^x]_R$ και $[E^x]_S$ οι συγκεντρώσεις του αντισταθμιστικού ιόντος στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα.

Επειδή η ρητίνη καταλαμβάνεται σχεδόν εξολοκλήρου από αντισταθμιστικά ιόντα E^x , μπορεί να θεωρηθεί ότι η συγκέντρωσή τους στη στατική φάση $[E^x]_R$ είναι ίση με τη χωρητικότητα της ρητίνης C_R :

$$C_R = [E^x]_R \quad (1.14)$$

Επίσης, ο συντελεστής κατανομής του ιόντος S ορίζεται ως:

$$K_D = [S^y]_R / [S^y]_S \quad (1.15)$$

Από τις σχέσεις 1.13, 1.14 και 1.15 προκύπτει ότι:

$$\log K_D = -(y/x) \log [E^x]_S + \log K_E^S C_R^{y/x} \quad (1.16)$$

Ο όρος $(\log K_E^S C_R^{y/x})$ είναι σταθερός για δύο συγκεκριμένα ιόντα (E^x) και (S^y), για συγκεκριμένη ρητίνη και υπό σταθερή θερμοκρασία. Η παραπάνω σχέση δε λαμβάνει υπόψη πιθανές παράπλευρες χημικές ισορροπίες στις οποίες μπορεί να συμμετέχουν τα ανταγωνιστικά ιόντα, όπως είναι η πρωτονίωση ανιόντων ασθενών οξέων ή η υδροξυλίωση κατιόντων ασθενών βάσεων. Ανεξαρτήτως της μη γενικής εφαρμογής της, η παραπάνω σχέση αποτελεί θεμελιώδη σχέση για το χρωματογραφικό διαχωρισμό με μηχανισμό ιονανταλλαγής, διότι από αυτήν απορρέουν δύο αρχές γενικής εφαρμογής:

α) Αύξηση του φορτίου ενός ιόντος (αύξηση του y) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του συντελεστή κατανομής του ιόντος. Επομένως, η μεταβολή του pH για εκλουστικά ιόντα που υφίστανται πρωτονίωση, αναμένεται να έχει επίδραση στην εκλουστική τους ικανότητα. Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται γιατί τα ανθρακικά ιόντα (CO_3^{2-}) έχουν μεγαλύτερη εκλουστική ικανότητα από τα όξινα ανθρακικά (HCO_3^-) και αντίστοιχα τα όξινα φωσφορικά (HPO_4^{2-}) από τα δισόξινα φωσφορικά ($H_2PO_4^-$). Παράλληλα, έτσι εξηγείται η γενική παρατήρηση ότι οι αλκαλικές γαίες εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους ανάσχεσης από τα αλκάλια.

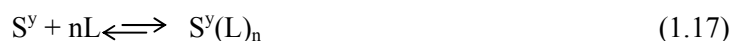
β) Αύξηση της συγκέντρωσης του αντισταθμιστικού ιόντος (E^x) στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συντελεστή κατανομής του εκλούμενου ιόντος και επομένως οδηγεί σε μείωση του χρόνου ανάσχεσης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι για τη σωστή ρύθμιση του pH σε διαχωρισμούς ιόντων, όπου τα ιόντα συμμετέχουν σε παράλληλη ισορροπία πρωτονίωσης, όπως είναι ο διαχωρισμός αμινοξέων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι το pH της ιονανταλλακτικής ρητίνης εξαρτάται

από τη χωρητικότητα της ρητίνης και είναι εν γένει διαφορετικό από το pH της κινητής φάσης. Για παράδειγμα, σε μία ρητίνη με χωρητικότητα 3 meq/ml αν το pH της κινητής φάσης είναι pH = 4, δηλαδή $[H^+] = 1 \times 10^{-4} M$ και η συνολική συγκέντρωση των λοιπών ιόντων είναι εκατό φορές μεγαλύτερη, δηλαδή $1 \times 10^{-2} M$, τότε, με την υπόθεση ότι οι διαφορές στους συντελεστές εκλεκτικότητας είναι αμελητέες, η συγκέντρωση των H^+ στη ρητίνη θα είναι περίπου $3 \times 10^{-2} M$, ενώ των λοιπών ιόντων εκατό φορές μεγαλύτερη, δηλαδή 3 M. Επομένως, το pH στη ρητίνη είναι περίπου 2, σχεδόν δύο μονάδες μικρότερο απ' ό,τι είναι στην κινητή φάση.

Σημαντικές είναι οι περιπτώσεις των διαχωρισμών στην ιοντική χρωματογραφία, στις οποίες χρησιμοποιείται κάποιο συμπλεκτικό αντιδραστήριο (όπως F^- , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , CN^- , SCN^- , πολυαμίνες, EDTA, NTA κ.α.) με σκοπό, είτε το διαχωρισμό των κεντρικών μετάλλων είτε το διαχωρισμό των υποκαταστατών.

Αν υποθεθεί ότι στην κινητή φάση προστίθεται το συμπλεκτικό αντιδραστήριο (L), το οποίο συμπλέκει το ιόν S^y τότε, παράλληλα με την ισοροπία 1.12, αποκαθίσταται η ισοροπία:



Με βάση την υπόθεση ότι το συμπλεκτικό αντιδραστήριο είναι σε περίσσεια και η ολική σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου K_f δεν έχει μικρή τιμή, δηλαδή τα ενδιάμεσα σύμπλοκα έχουν αμελητέα συγκέντρωση, η σχέση 1.16 γίνεται:

$$\log K_D = -(y/x) \log [E^x]_s - \log (1 + K_f [L]_s^n) + \log K_E^S C_R^{y/x} \quad (1.18)$$

Από τη σχέση 1.18 προκύπτει ένας αριθμός συμπερασμάτων:

α) Η αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλεκτικού αντιδραστηρίου [L] έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συντελεστή κατανομής του ιόντος S^y , όπως άλλωστε αναμένεται με βάση την αρχή Le Chatelier. Αν όμως ο μηχανισμός της ιονανταλλαγής βασίζεται στην αντικατάσταση του αντισταθμιστικού ιόντος E^x από το σύμπλοκο $S^y(L)_n$ και όχι από το ιόν S^y , τότε το ρυθμιστικό ρόλο έχει ο συντελεστής K_D του συμπλόκου, ο οποίος αυξάνει με αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλεκτικού αντιδραστηρίου [L].

β) Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου K_f , τόσο μεγαλύτερη είναι η μείωση του συντελεστή κατανομής K_D του ιόντος S^y . Αντίθετα, αν ο μηχανισμός της ιονανταλλαγής βασίζεται στο σύμπλοκο $S^y(L)_n$, τότε θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο συντελεστής K_D του συμπλόκου, ο οποίος αυξάνει με αύξηση της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου K_f .

γ) Για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση συμπλεκτικού αντιδραστηρίου, οι διαφορές μεταξύ των συντελεστών κατανομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων διαφόρων ιόντων οφείλονται κυρίως στις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των σταθερών σχηματισμού των συμπλόκων. Αν οι διαφορές μεταξύ των σταθερών σχηματισμού των συμπλόκων είναι μεγαλύτερες από τις διαφορές των συντελεστών κατανομής των ιόντων απουσία συμπλεκτικού αντιδραστηρίου, τότε ο

χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι καλύτερα να βασίζεται στα σύμπλοκα των ιόντων, δηλαδή να γίνεται με προσθήκη κατάλληλου συμπλεκτικού αντιδραστηρίου στο εκλουστικό υγρό.

Η εκλεκτικότητα των ιονανταλλακτικών ρητινών για τα αλκάλια ακολουθεί τη σειρά $Li^+ < Na^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+$ και για τα αλογόνα τη σειρά $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. Ο κανόνας, ο οποίος ισχύει και για τις αλκαλικές γαίες καθώς και για τα οξυγονούχα ιόντα, είναι ότι ο συντελεστής εκλεκτικότητας μειώνεται όσο αυξάνει η σφαίρα ενυδάτωσης των ιόντων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η σύνδεση ενός ιόντος με τη ρητίνη σημαίνει αφενός μεν εισαγωγή τάσεων στο ελαστικό δίκτυο της ρητίνης, αφετέρου δε αποδιάταξη της σφαίρας ενυδάτωσης του ιόντος. Ωστόσο, σε αρκετές κατηγορίες ρητινών παρατηρείται παραβίαση αυτού του κανόνα, ιδιαίτερα σε ρητίνες με υψηλό ποσοστό σταυροδεσμών και μικρού όγκου δραστικές ομάδες. Για την ερμηνεία του φαινομένου αυτού ο D. Reichenberg³⁰ ανέπτυξε μία εξίσωση υπολογισμού της μεταβολής της ελεύθερας ενέργειας του συστήματος $\Delta G_{M/N}$ κατά την απομάκρυνση από τη ρητίνη ενός ιόντος N και την αντικατάστασή του από ένα ιόν M, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα ιόντα και τη δραστική ομάδα όσο και την ελεύθερη ενέργεια αποδιάταξης της στιβάδας ενυδάτωσης:

$$\Delta G_{M/N} = [e^2/(r_A+r_N) - e^2/(r_A+r_M)] - (\Delta G_N - \Delta G_M) \quad (1.19)$$

όπου r_A είναι η ακτίνα της δραστικής ομάδας, r_N , r_M οι ιοντικές ακτίνες των ιόντων N και M αντίστοιχα και ΔG_M , ΔG_N η μεταβολή της ελεύθερας ενέργειας κατά την πρόσληψη του ιόντος M και την αποχώρηση του ιόντος N αντίστοιχα.

Όταν η δραστική ομάδα έχει μεγάλη ακτίνα r_A , τότε ο όρος που εκφράζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν έχει σημαντική επίδραση, και η τιμή του $\Delta G_{M/N}$ εξαρτάται από τις ελεύθερες ενέργειες ΔG_N και ΔG_M . Αν το ιόν N έχει μεγαλύτερη στιβάδα ενυδάτωσης σε σχέση με το ιόν M, τότε $\Delta G_N > \Delta G_M$ και επομένως η $\Delta G_{M/N}$ έχει αρνητική τιμή, άρα ευνοείται η αντικατάσταση του ιόντος N από το ιόν M.

Αντίθετα, αν η δραστική ομάδα έχει μικρή ακτίνα r_A , τότε ο όρος που εκφράζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις έχει την πρωτεύουσα επίδραση και ευνοείται η συγκράτηση του ιόντος με τη μικρότερη ιοντική ακτίνα, δηλαδή του ιόντος με τη μεγαλύτερη στιβάδα ενυδάτωσης και επομένως παρατηρείται αντιστροφή της κανονικής σειράς εκλεκτικότητας.

1.3.6 Διαχωρισμός Ιόντων με Μη Ιονανταλλακτικό Μηχανισμό

1.3.6.1 Χρωματογραφία ιοντικών αλληλεπιδράσεων

Στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται ένα πλήθος διαφορετικών όρων γι' αυτό το είδος μηχανισμού, όπως: χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (ion pair chromatography), χρωματογραφία ιοντικών αλληλεπιδράσεων (ion interaction chromatography), χρωματογραφία δυναμικής ιονανταλλαγής (dynamic ion exchange chromatography) και ιοντική χρωματογραφία κινητής φάσης (mobile-phase ion chromatography). Παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι στήλες υψηλής απόδοσης της HPLC, κυρίως οι στήλες αντιστρόφου φάσεως C₁₈ και C₈. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μακροπορώδη συμπολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου.³⁵ Η κινητή φάση περιέχει έναν ιοντικό τροποποιητή ή ψευδοϊονανταλλάκτη (pseudoexchanger), ο οποίος δρα ως μία κινούμενη θέση ιονανταλλαγής και παράλληλα έχει την ικανότητα να προσροφάται στη στατική φάση της στήλης μόνος του ή ως ζεύγος με κάποιο από τα προς διαχωρισμό ιόντα. Για διαχωρισμούς κατιόντων το οκτανοσουλφονικό οξύ είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος ιοντικός τροποποιητής και για τους διαχωρισμούς ανιόντων το τετραβουτυλαμμώνιο. Για την ερμηνεία του μηχανισμού έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα, μία απλούστευση των οποίων είναι ότι η κατακράτηση ενός ιόντος εξαρτάται αφενός μεν από την προσρόφιση του ζεύγους ιόντων στη στατική φάση, αφετέρου δε από μηχανισμό ιονανταλλαγής στον οποίο η δραστική ομάδα είναι ο ιοντικός τροποποιητής προσροφημένος στη στατική φάση.³⁶ Η χρωματογραφία ιοντικών αλληλεπιδράσεων στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζει καλύτερους διαχωρισμούς σε σχέση με τον κλασικό ιονανταλλακτικό μηχανισμό, τόσο επειδή χρησιμοποιεί στήλες υψηλής απόδοσης όσο και επειδή είναι εφικτή η ρύθμιση της χωρητικότητας των θέσεων ιονανταλλαγής και της ισχύος των υφιστάμενων αλληλεπιδράσεων με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης.³⁷

1.3.6.2 Χρωματογραφία αποκλεισμού ιόντων

Στη χρωματογραφία αποκλεισμού ιόντων, λαμβάνει χώρα διαχωρισμός ιόντων ασθενών οξέων ή βάσεων σε χρωματογραφική στήλη, η στατική φάση της οποίας έχει δραστικές ομάδες του ίδιου φορτίου με το φορτίο των ιόντων που διαχωρίζονται. Σε αυτήν την περίπτωση τα ιόντα δεν μπορούν να κατακρατηθούν από τη στατική φάση εξαιτίας του δυναμικού Donnan, ωστόσο το κλάσμα των αδιάστατων μορίων μπορεί να προσροφηθεί στη στατική φάση και να λάβει χώρα διαχωρισμός με βάση την προσρόφιση. Επομένως, η ανάσχεση ενός ιόντος ασθενούς οξέος ή ασθενούς βάσης εξαρτάται από δύο κυρίως παράγοντες: α) από το κλάσμα των αδιάστατων μορίων, δηλαδή από τη σταθερά διάστασης του οξέος ή της βάσης και β) από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αδιάστατων μορίων και της στατικής φάσης.^{38, 39}

1.4 ΣΤΗΛΕΣ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

1.4.1 Εισαγωγή

Οι ρητίνες ιονανταλλαγής είναι εν γένει το υλικό επιλογής για την πλήρωση στηλών ιοντικής χρωματογραφίας. Μια ιονανταλλακτική ρητίνη αποτελείται από τρία κυρίως τμήματα: α) ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα, β) δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες (functional groups) και γ) αντισταθμιστικά ιόντα αντιθέτου φορτίου προς τις ιονανταλλακτικές ομάδες (counter ions), έτσι ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Οι ρητίνες ιονανταλλαγής πρέπει επίσης να διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά ποιότητας προκειμένου να είναι κατάλληλες ως υλικό πλήρωσης στηλών ιοντικής χρωματογραφίας: α) ταχύτητα ανταλλαγής των ιόντων όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, β) χημική σταθερότητα σε ευρεία περιοχή pH, γ) καλή μηχανική αντοχή και αντίσταση σε μεγάλες μεταβολές της οσμωτικής πίεσης και δ) αντίσταση στην αποσύνθεση κατά την πλήρωση και τη ροή της κινητής φάσης.⁴⁰

Μια ποικιλία υλικών έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα ιονανταλλακτικών ρητινών. Το υλικό που κυριαρχεί πλέον στις σύγχρονες στήλες ιοντικής χρωματογραφίας είναι τα οργανικά συμπολυμερή του στυρενίου, ενώ χρησιμοποιείται και η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου. Η χημική σταθερότητα είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα των οργανικών πολυμερών σε σχέση με την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, που παρουσιάζει ευαισθησία σε αλκαλικό περιβάλλον.

1.4.2 Οργανικά Πολυμερή ως Υποστρώματα Στατικών Φάσεων Στηλών Ιοντικής Χρωματογραφίας

Υπάρχουν δύο ειδών πολυμερή τα οποία χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στατικών φάσεων στηλών ιοντικής χρωματογραφίας: α) τα πολυμερή τύπου πηκτής ή μικροπορώδη και β) τα μακροπορώδη πολυμερή. Η διαφορά στη δομή μεταξύ των δύο υλικών έχει σημαντική επίδραση στην ταχύτητα ιονανταλλαγής.⁴¹

Τα πολυμερή τύπου πηκτής σχηματίζονται με το συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου παρουσία καταλύτη βενζυλοϋπεροξειδίου. Η παρουσία του διβινυλοβενζολίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σταυροδεσμών, ο αριθμός των οποίων ελέγχεται με το ποσοστό της συγκέντρωσης του διβινυλοβενζολίου στο αρχικό μίγμα των μονομερών. Το ποσοστό του διβινυλοβενζολίου είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τις ιδιότητες της στήλης αφού καθορίζει, αφενός μεν το ποσοστό διόγκωσης της ρητίνης εντός διαλύτη, αφετέρου δε τη διαπερατότητα της ρητίνης από τα ιόντα. Υψηλό ποσοστό σταυροδεσμών συνεπάγεται μικρή διόγκωση της ρητίνης εντός διαλύτη και διαπερατότητα μόνο από μικρού όγκου ιόντα. Το ποσοστό διβινυλοβενζολίου πρέπει συνεπώς να καθορίζεται με ακρίβεια και μπορεί να κυμαίνεται

από 4 έως 12 %. Μικρότερο ποσοστό από 4 % οδηγεί σε ασταθείς ρητίνες κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ μεγαλύτερο ποσοστό από 12 % δημιουργεί φαινόμενα αποκλεισμού ιόντων. Μεγαλύτερο ποσοστό διβινυλοβενζολίου (μέχρι 60 %) εφαρμόζεται σε σωματίδια που αποτελούνται από συμπαγείς πυρήνες με πολύ υψηλό βαθμό διακλάδωσης, στα οποία η δραστική περιοχή ιονανταλλαγής περιορίζεται σε μία λεπτή στιβάδα στην επιφάνεια των σωματιδίων, η οποία όμως, σε αντίθεση με τον πυρήνα, έχει πολύ μικρό ποσοστό σταυροδεσμών. Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται υμενώδη σωματίδια (pellicular particles).

Τα μακροπορώδη πολυμερή σχηματίζονται επίσης με το συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, έχει προστεθεί στο αρχικό μίγμα των μονομερών ένας διαλύτης μη αναμίξιμος με το νερό, αναμίξιμος με τα μονομερή, αλλά φτωχός διαλύτης για το τελικό πολυμερές. Ο διαλύτης κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού δημιουργεί σταγονίδια εντός του σχηματιζόμενου πολυμερούς με αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων μεγάλου μεγέθους στο τελικό πολυμερές. Τα πολυμερή αυτού του τύπου έχουν μεγάλο ποσοστό διβινυλοβενζολίου με αποτέλεσμα η ρητίνη να είναι αρκετά άκαμπτη. Οι μακροπορώδεις ρητίνες χρησιμοποιούνται για κατασκευή στηλών μεγάλης χωρητικότητας ή για ιοντική χρωματογραφία ζεύγους ιόντων.⁴²

1.4.3 Κατιοανταλλακτικές Ρητίνες

Ο πλέον κοινός τρόπος παρασκευής ιονανταλλακτικής ρητίνης είναι η εισαγωγή των δραστικών ομάδων με χημική τροποποίηση του πολυμερούς υποστρώματος. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται μονομερή τα οποία φέρουν εξαρχής τις δραστικές ομάδες, χωρίς όμως αυτός ο τρόπος να χρησιμοποιείται ευρέως στις στήλες ιοντικής χρωματογραφίας. Στις κατιοανταλλακτικές ρητίνες η συνήθως χρησιμοποιούμενη δραστική ομάδα είναι η σουλφονική ομάδα $-SO_3^-$, η οποία εισάγεται εκ των υστέρων στο πολυμερές υπόστρωμα με αντίδραση αρωματικής υποκατάστασης, που εμφανίζει μεγάλη απόδοση και λαμβάνει χώρα σχεδόν σε όλους τους αρωματικούς δακτυλίους. Ωστόσο, ο αριθμός των σουλφονικών ομάδων που θα εισαχθούν πρέπει να είναι ελεγχόμενος, διότι καθορίζει τη χωρητικότητα της ρητίνης. Οι υψηλής χωρητικότητας ρητίνες (περίπου 5 meq $-SO_3^-$ / g ξηρής ρητίνης), ήταν αρχικά οι μόνες χρησιμοποιούμενες, διότι ήταν οι μόνες συμβατές με τους καταστολείς στήλης, ενώ μετά την εισαγωγή των καταστολέων μεμβράνης περιορίστηκαν στην ανάλυση δειγμάτων υψηλής συγκέντρωσης. Έχουν δύο σημαντικά μειονεκτήματα: α) έχουν υψηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και β) για να υπάρχει ικανοποιητική διάχυση των ιόντων στη ρητίνη πρέπει να κατασκευάζονται με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων με αποτέλεσμα να έχουν μικρότερη αντοχή στις υψηλές πιέσεις.

Οι χαμηλής χωρητικότητας ρητίνες βρίσκουν μεγαλύτερη εφαρμογή για αναλυτικούς σκοπούς διότι δεν εμφανίζουν τα προαναφερόμενα μειονεκτήματα. Η πλέον χρήσιμη περιοχή

χωρητικότητα είναι από 0,01 έως 0,05 meq $-\text{SO}_3^-$ / g ξηρής ρητίνης.⁴³ Αυτή η περιοχή χωρητικότητας αντιστοιχεί σε ρητίνες μεμβράνης, στις οποίες η σούλφωση έχει περιοριστεί αυστηρά σε μία λεπτή στιβάδα στην επιφάνεια των σωματιδίων πλήρωσης, ενώ το εσωτερικό των σωματιδίων δε συμμετέχει στο μηχανισμό της ιονανταλλαγής και επομένως στο διαχωρισμό.⁴⁴

Εκτός από τη χρήση της σουλφονικής ομάδας, σημαντική εφαρμογή έχει και η χρήση της καρβοξυλικής ομάδας ($-\text{COO}^-$). Η διαφορά σε σχέση με τη σουλφονική ομάδα είναι ότι επειδή τα καρβοξυλικά οξέα είναι ασθενή οξέα, ο βαθμός διάστασης των καρβοξυλικών ομάδων εξαρτάται από το pH, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ρύθμιση της χωρητικότητας της ρητίνης με ρύθμιση του pH της κινητής φάσης. Παράλληλα, ο μεγαλύτερος συντελεστής εκλεκτικότητας της ρητίνης προς το κατιόν του υδρογόνου καθιστά ευκολότερη την έκλυση ισχυρά συγκρατούμενων κατιόντων, όπως είναι τα πολυσθενή κατιόντα.

1.4.4 Ανιοανταλλακτικές Ρητίνες

Η συνήθως χρησιμοποιούμενη ομάδα των ανιοανταλλακτικών ρητινών είναι το τεταρτοταγές αμμώνιο $-\text{N}(\text{R})_3^+$, το οποίο εισάγεται στο υπόστρωμα πολυμερούς σε δύο στάδια: α) γίνεται χλωρομεθυλίωση, δηλαδή εισαγωγή της ομάδας ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) στον αρωματικό δακτύλιο και β) εισαγωγή τριτοταγούς αμίνης $\text{N}(\text{R})_3$ με αντίδραση υποκατάστασης του χλωρίου. Στις ανιοανταλλακτικές ρητίνες, οι στήλες χαμηλής χωρητικότητας πλεονεκτούν έναντι των στηλών υψηλής χωρητικότητας για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν στις κατιοανταλλακτικές στήλες.⁴⁵ Παράλληλα, ως ασθενώς βασική ανιοανταλλακτική ομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τριτοταγής, η δευτεροταγής ή η πρωτοταγής αμινομάδα. Οι δυνατότητες που παρουσιάζονται είναι αντίστοιχες με τις δυνατότητες που αναφέρθηκαν στις κατιοανταλλακτικές ρητίνες με καρβοξυλική ομάδα.⁴⁶ Η σημαντική διαφορά σε σχέση με τις κατιοανταλλακτικές στήλες είναι ότι δεν υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της χωρητικότητας της ρητίνης με έλεγχο της απόδοσης των αντιδράσεων τροποποίησης του υποστρώματος. Για την παρασκευή ρητινών χαμηλής χωρητικότητας ακολουθείται η τεχνική της επιφανειακής συσσωμάτωσης (surface agglomeration), η οποία γίνεται ως εξής: α) παρασκευάζεται μία χαμηλής χωρητικότητας κατιοανταλλακτική ρητίνη, β) παρασκευάζεται κολλοειδές αιώρημα ανιοανταλλακτικής ρητίνης και γ) εξαιτίας ηλεκτροστατικών δυνάμεων αποτίθενται τα κολλοειδή ανιοανταλλακτικά σωματίδια στην κατιοανταλλακτική ρητίνη.⁴⁷

Τα πλεονεκτήματα των ρητινών συσσωμάτωσης είναι ότι: α) μπορεί να γίνει εύκολα έλεγχος της χωρητικότητας της ρητίνης με επιλογή του μεγέθους των σωματιδίων του υποστρώματος και του κολλοειδούς αιωρήματος, β) γίνεται ευκολότερα έλεγχος του ποσοστού σταυροδεσμών των κολλοειδών σωματιδίων σε σχέση με τα σωματίδια μεμβράνης, γ) είναι εύκολη η

παραγωγή στηλών με επαναλήψιμα χαρακτηριστικά και δ) ο αριθμός των δραστικών ομάδων και ο βαθμός επιδιαιτύωσης είναι ομοιόμορφος σε όλη την επιφάνεια των σωματιδίων.⁴⁸

1.4.5 Άλλα Είδη Ιονανταλλακτικών στηλών

Εκτός από το υπόστρωμα συμπολυμερούς στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, για την κατάσχευή στηλών ιοντικής χρωματογραφίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα πηκτής διοξειδίου του πυριτίου. Δραστικές κατιοανταλλακτικές ή ανιοανταλλακτικές ομάδες μπορούν να προσδεθούν με τις ομάδες υδροξειδίου του πυριτίου μέσω ολιγομερών που δρουν ως γέφυρες.⁴⁹ Το πλεονέκτημα αυτών των στηλών είναι ότι μπορούν να αντέξουν σε υψηλότερες πιέσεις και παράλληλα έχουν μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών, διότι παρουσιάζουν μικρότερη αντίσταση μεταφοράς μάζας (εδάφιο 1.3.4.2). Σημαντικό μειονέκτημα αυτών των στηλών είναι η χημική αστάθεια σε αλκαλικό περιβάλλον και η περιορισμένη δυνατότητα κατασκευής στηλών με σημαντικές διαφοροποιήσεις στη χωρητικότητα και την εκλεκτικότητα. Για το λόγο αυτό οι εφαρμογές τους περιορίζονται στους προσδιορισμούς μικρών οργανικών και ανόργανων ιόντων.⁵⁰

Με περιορισμένη αλλά αυξανόμενη χρήση είναι οι στήλες που βασίζονται σε υπόστρωμα ακρυλικού. Οι στήλες αυτές είναι χημικώς περισσότερο σταθερές από τις στήλες πηκτής διοξειδίου του πυριτίου, αλλά λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις ρητίνες πολυστυρενίου. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των στηλών είναι ότι το σχήμα της κορυφής και ο χρόνος έκλουσης επηρεάζονται λιγότερο από τις ποσότητες των ιόντων, είναι δηλαδή περισσότερο ανεκτικές στο φαινόμενο της υπερφόρτωσης.

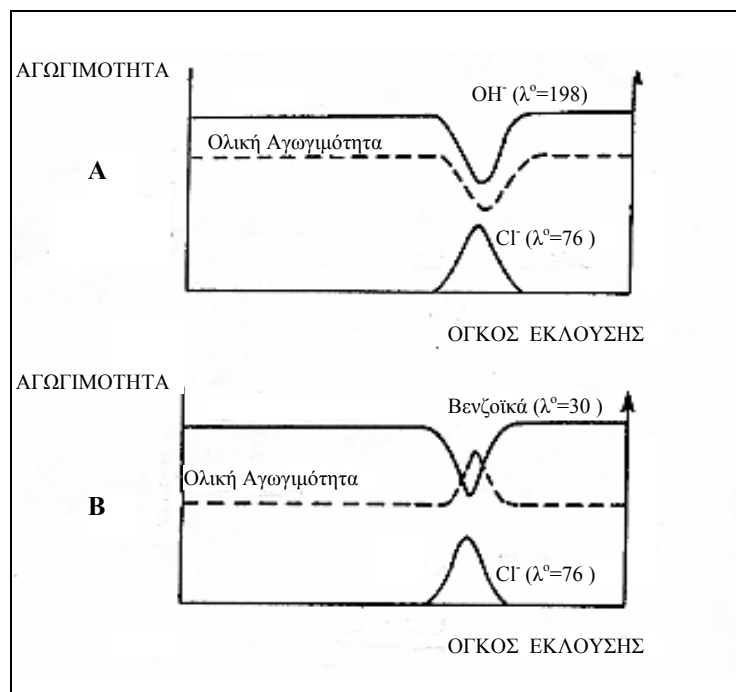
Ειδική κατηγορία στηλών ιοντικής χρωματογραφίας είναι οι στήλες που φέρουν συμπλεκτικά αντιδραστήρια ως δραστικές ομάδες.⁵¹ Έχουν περιορισμένη εφαρμογή κυρίως για δύο λόγους: α) παρουσιάζουν διαφορετικό κινητικό μηχανισμό, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της διεύρυνσης των κορυφών (υποκεφ. 1.3.3) και β) ο διαχωρισμός είναι σημαντικά καλύτερος, όταν το συμπλεκτικό αντιδραστήριο προστεθεί στην κινητή φάση (μηχανισμός ζεύγους ιόντων) σε σχέση με τη χημική πρόσδεση στη στατική φάση. Μια εφαρμογή αυτών των στηλών είναι η συγκράτηση ιόντων του υποστρώματος σε δείγματα με υψηλή συγκέντρωση υποβάθρου.

1.5 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΥΠΟΒΑΘΡΟΥ

1.5.1 Καταστελλόμενη και Μη Καταστελλόμενη Ιοντική Χρωματογραφία

Η τεχνική της καταστολής του σήματος υποβάθρου αναφέρεται στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται αγωγιμομετρικός ανιχνευτής, δηλαδή στην πλειοψηφία των εφαρμογών ιοντικής

χρωματογραφίας, και έχει ως σκοπό την αύξηση του λόγου S/N (σήμα / θόρυβος). Η ανάγκη για εφαρμογή κάποιας τεχνικής καταστολής με σκοπό την αύξηση του λόγου S/N εικονίζεται στο σχήμα 1.5.



Σχήμα 1.5: Μεταβολή της ολικής αγωγιμότητας στην έξοδο της στήλης κατά την έκλουση ιόντων χλωρίου με εκλουστικά ιόντα: α) OH^- και β) Βενζοϊκά.

Ας υποθεθεί ότι εισάγεται σε μία ανιοανταλλακτική στήλη διάλυμα NaCl σε συγκέντρωση 1 mM και για την έκλουση των ιόντων χλωρίου χρησιμοποιείται ως κινητή φάση υδατικό διάλυμα NaOH 0,1 M. Κατά το μηχανισμό της ιονανταλλαγής τα ιόντα χλωρίου κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, σε κάθε όμως σημείο της στήλης θα πρέπει το άθροισμα των ιόντων χλωρίου και υδροξυλίου της κινητής φάσης να είναι σταθερό και ίσο με τον αριθμό των ιόντων νατρίου, έτσι ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Αυτό συνεπάγεται τη μείωση του αριθμού των ιόντων υδροξυλίου της κινητής φάσης κατά την έκλουση των ιόντων χλωρίου. Επομένως, η μετρούμενη μεταβολή της αγωγιμότητας κατά την έκλουση των ιόντων χλωρίου είναι το αποτέλεσμα δύο παραγόντων: α) της αύξησης της συγκέντρωσης των ιόντων χλωρίου και β) της μείωσης της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξυλίου, η οποία είναι αριθμητικά ίση με την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων χλωρίου. Σε αυτήν την περίπτωση, επειδή η ισοδύναμη αγωγιμότητα των ιόντων υδροξυλίου ($\lambda^\circ = 198 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ eq}^{-1}$ στους 25° C) είναι μεγαλύτερη από την ισοδύναμη αγωγιμότητα των ιόντων χλωρίου ($\lambda^\circ = 76 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ eq}^{-1}$ στους 25° C), η συνολική μεταβολή της αγωγιμότητας είναι αρνητική (Σχήμα 1.5A). Αν αντί για ιόντα υδροξυλίου είχαν χρησιμοποιηθεί ως εκλουστικά ιόντα τα βενζοϊκά ($\lambda^\circ = 32 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ eq}^{-1}$ στους 25° C), τότε η

συνολική μεταβολή θα ήταν θετική (Σχήμα 1.5B). Η ανιχνευσιμότητα και η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται μεταξύ άλλων από δύο παράγοντες: α) τη διαφορά των ισοδύναμων αγωγιμοτήτων του εκλουστικού ιόντος και του εκλουόμενου ιόντος και β) την αγωγιμότητα υποβάθρου, η οποία εξαρτάται από την ισοδύναμη αγωγιμότητα και τη συγκέντρωση του εκλουστικού ιόντος. Ο σημαντικότερος περιορισμός που τίθεται, είναι η ύπαρξη υψηλής αγωγιμότητας υποβάθρου, εξαιτίας της πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης των ιόντων του εκλουστικού υγρού σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των αναλυτών. Στο παραπάνω παράδειγμα έγινε η υπόθεση ότι η συγκέντρωση του εκλουστικού υγρού είναι 0,1 M, ενώ του δείγματος 0,001 M, δηλαδή, αν υποθεθεί ότι εκλουόμενο ιόν έχει διπλάσια ισοδύναμη αγωγιμότητα από το εκλουστικό ιόν, το σήμα υποβάθρου είναι 100 φορές μεγαλύτερο από το αναλυτικό σήμα, ενώ σε άλλες εφαρμογές ιοντικής χρωματογραφίας μπορεί να είναι μέχρι και 10000 φορές μεγαλύτερο. Με βάση τις παραπάνω εκτιμήσεις, είχε αρχικά υποθεθεί ότι δε θα ήταν δυνατή η χρήση αγωγιμομετρικής ανίχνευσης χωρίς κάποια παράλληλη τεχνική που θα μείωνε την αγωγιμότητα υποβάθρου. Για το λόγο αυτό η τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας, όταν έγινε εμπορικά διαθέσιμη, είχε κατάλληλο σύστημα μείωσης του σήματος υποβάθρου και η τεχνική ονομάστηκε καταστέλλομενη ιοντική χρωματογραφία (suppressed ion chromatography). Ωστόσο, τέσσερα χρόνια μετά την εισαγωγή της τεχνικής της ιοντικής χρωματογραφίας, το 1979 οι D. T. Gjerde, J. S. Fritz και G. Schmuckler δημοσίευσαν τον πρώτο προσδιορισμό ιόντων με αγωγιμομετρική ανίχνευση χωρίς την καταστολή της αγωγιμότητας υποβάθρου.¹⁷ Η τεχνική αυτή ονομάστηκε μη καταστέλλομενη ιοντική χρωματογραφία (nonsuppressed ion chromatography) και βασίζεται στη χρήση στηλών μικρής χωρητικότητας, οι οποίες έχουν την ικανότητα να επιτυγχάνουν την έκλυση των ιόντων με εκλουστικά υγρά χαμηλής ιοντικής συγκέντρωσης, περίπου 1mM. Εκτός από την τεχνολογική ανάπτυξη των στηλών μικρής χωρητικότητας, η ευρεία πλέον χρήση της μη καταστέλλομενης ιοντικής χρωματογραφίας οφείλεται σε δύο ακόμη παράγοντες: α) στο υψηλό κόστος των συστημάτων καταστολής και β) στο ότι οι προσδιορισμοί ανιόντων ασθενών οξέων ($pK_a > 7$) και κατιόντων ασθενών βάσεων ($pK_a < 7$), όπως εξηγείται στη συνέχεια, έχουν καλύτερη ανιχνευσιμότητα και ευαισθησία χωρίς τη χρήση συστήματος καταστολής.⁵²

1.5.2 Αρχή Μεθόδου Καταστολής Σήματος Υποβάθρου

Με τον όρο “καταστολή” στην ιοντική χρωματογραφία ονομάζεται η μείωση του σήματος υποβάθρου, η οποία μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: α) με ηλεκτρονικό τρόπο (electronic suppression) και β) με χημικό τρόπο (chemical suppression). Ωστόσο, επειδή στην περίπτωση της ηλεκτρονικής καταστολής το σήμα υποβάθρου ουσιαστικά δεν καταστέλλεται αλλά αφαιρείται, η περίπτωση της ηλεκτρονικής καταστολής δε θεωρείται ότι ανήκει στην καταστέλλομενη ιοντική χρωματογραφία.

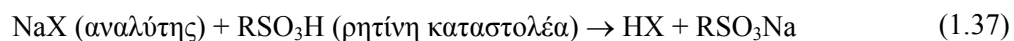
Η καταστολή στην περίπτωση του προσδιορισμού ανιόντων ισοδυναμεί με ανταλλαγή όλων των κατιόντων της κινητής φάσης με κατιόντα υδρογόνου, ενώ στην περίπτωση του προσδιορισμού κατιόντων ισοδυναμεί με ανταλλαγή όλων των ανιόντων της κινητής φάσης με ανιόντα υδροξυλίου. Αυτό έχει δύο συνέπειες:

- 1) Η κινητή φάση, στην περίπτωση του προσδιορισμού ανιόντων, μετατρέπεται σε διάλυμα οξέος και αντίστοιχα, στην περίπτωση του προσδιορισμού κατιόντων, μετατρέπεται σε διάλυμα βάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αγωγιμότητα υποβάθρου να εξαρτάται πλέον από τη σταθερά διάστασης του σχηματιζόμενου μετά τον καταστολέα οξέος και της σχηματιζόμενης βάσης αντίστοιχα και όχι από τους αρχικούς ηλεκτρολύτες της κινητής φάσης. Ιδανικά, θα πρέπει το σχηματιζόμενο οξύ και η σχηματιζόμενη βάση αντίστοιχα, να είναι το νερό, διότι έχει τη μικρότερη σταθερά διάστασης ($K_w = 1 \times 10^{-14}$). Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει στους προσδιορισμούς ανιόντων να χρησιμοποιείται ως εκλουστικό ιόν το OH^- και στους προσδιορισμούς κατιόντων το H^+ . Αντίθετα, αν η κινητή φάση περιέχει άλατα ισχυρών οξέων ή βάσεων αντίστοιχα, η τεχνική της καταστολής δεν οδηγεί σε μείωση της αγωγιμότητας υποβάθρου αλλά σε αύξηση, εξαιτίας των μεγάλων ισοδύναμων αγωγιμοτήτων των H^+ και OH^- που εισάγονται στην κινητή φάση και επομένως δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.
- 2) Η έκλυση των ανιόντων, στους προσδιορισμούς ανιόντων, συνοδεύεται από τη συνέκλυση κατιόντων υδρογόνου με συνέπεια, εξαιτίας της μεγάλης ισοδύναμης αγωγιμότητάς των κατιόντων υδρογόνου, ο ρυθμός μεταβολής της μετρούμενης αγωγιμότητας να είναι μεγαλύτερος με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων. Ωστόσο, αν τα προσδιοριζόμενα ανιόντα είναι ανιόντα ασθενών οξέων, τότε παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού εξαιτίας του σχηματισμού αδιάστατων μορίων. Γι' αυτόν το λόγο, η καταστελλόμενη ιοντική χρωματογραφία πρέπει να χρησιμοποιείται για ανιόντα οξέων με $\text{p}K_a < 7$. Αντίστοιχα συμβαίνει αύξηση ή μείωση της ευαισθησίας στους προσδιορισμούς κατιόντων, με κριτήριο τον $\text{p}K_a$ της συζυγούς βάσεως, για τον οποίο πρέπει να ισχύει $\text{p}K_a > 7$.

1.5.3 Τεχνολογική Εξέλιξη των Τεχνικών Καταστολής

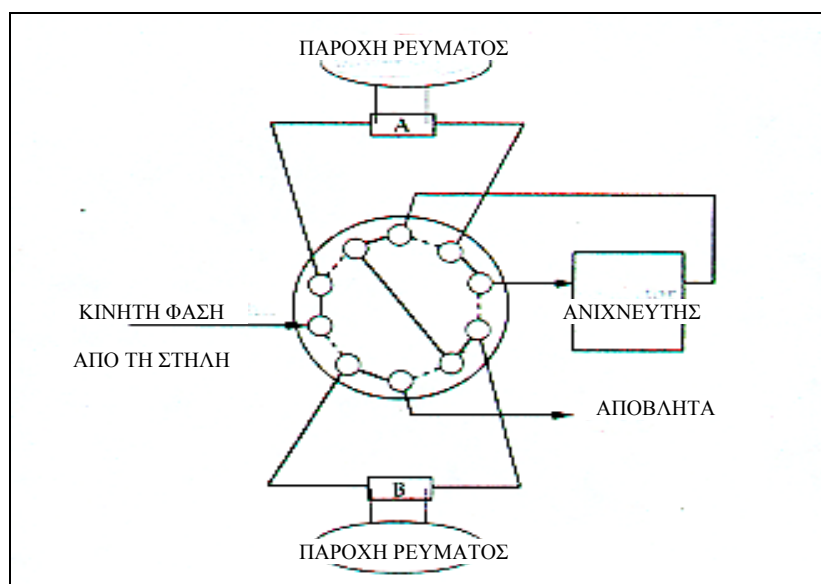
Ο πρώτος τύπος καταστολέα, που κυκλοφόρησε με την εισαγωγή της τεχνικής το 1975, ήταν μία στήλη ιονανταλλακτικής ρητίνης, η οποία ήταν συνδεδεμένη σε σειρά με τη στήλη διαχωρισμού. Στην περίπτωση του διαχωρισμού ανιόντων, η ρητίνη του καταστολέα ήταν ισχυρά όξινη κατιονανταλλακτική ρητίνη με αντισταθμιστικά ιόντα κατιόντα υδρογόνου, με σκοπό τη δέσμευση των κατιόντων της κινητής φάσης και την απελευθέρωση ίσου φορτίου κατιόντων υδρογόνου (Αντιδράσεις 1.36 και 1.37). Οι προσδιορισμοί κατιόντων χρησιμοποιούσαν

αντίστοιχο σύστημα με τη μοναδική διαφορά ότι η ρητίνη ήταν ισχυρά βασική ανιοανταλλακτική ρητίνη με αντισταθμιστικά ιόντα ανιόντα υδροξυλίου.



Τα μειονεκτήματα αυτού του αρχικού τύπου καταστολέων ήταν τα εξής: α) επειδή οι αναλυτικές στήλες ήταν μεγάλης χωρητικότητας, έπρεπε να χρησιμοποιείται υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης κινητή φάση, με αποτέλεσμα, για να εξασφαλίζεται πλήρης καταστολή, να απαιτείται μεγάλη ποσότητα ρητίνης καταστολής και επομένως συστήματα μεγάλου νεκρού όγκου, β) έπειτα από κάποιες ώρες λειτουργίας απαιτείτο η αναγέννηση της ρητίνης και επομένως η διακοπή της λειτουργίας του χρωματογράφου και γ) επηρέαζαν το χρόνο έκλουσης οργανικών κυρίως ιόντων με μηχανισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η επίδραση στο χρόνο έκλουσης δεν ήταν σταθερή και εξαρτιόταν από το χρόνο λειτουργίας της ρητίνης.

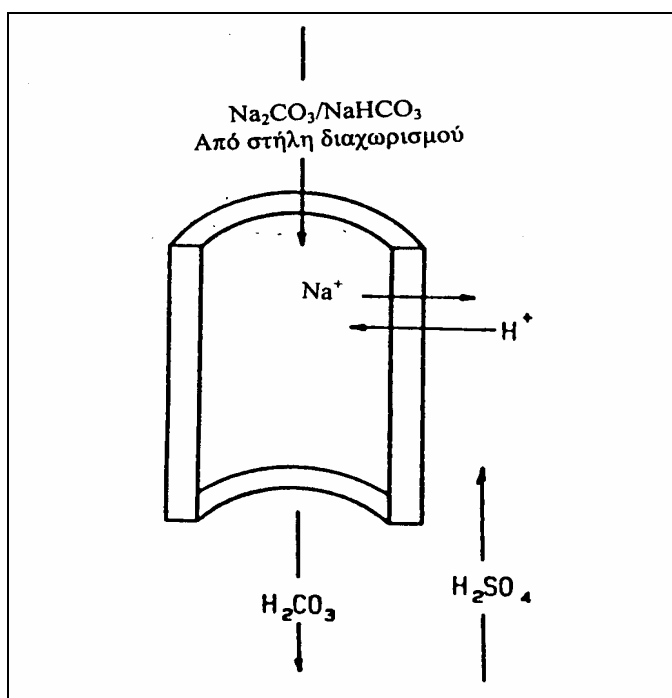
Οι καταστολείς στήλης δεν έχουν καταργηθεί, χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα από την εταιρεία Alltech σε σύγχρονα όργανα ιοντικής χρωματογραφίας, με σύστημα αυτόματης αναγέννησης της ρητίνης (Σχήμα 1.6). Το σύστημα διαθέτει δύο στήλες, όπου η μία χρησιμοποιείται ενώ η δεύτερη υφίσταται αναγέννηση με διάλυμα αναγέννησης την κινητή φάση που ηλεκτρολύεται μετά την έξοδό της από τον ανιχνευτή. Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά από τα προβλήματα των αρχικών καταστολέων στήλης έχουν αντιμετωπιστεί με τη χρήση αναλυτικών στηλών μικρής χωρητικότητας, που απαιτούν στήλη καταστολής μικρού όγκου και όχι συχνή αναγέννηση της ρητίνης.



Σχήμα 1.6: Διάγραμμα συστήματος με δύο καταστολείς ηλεκτροχημικά αναγεννώμενους. Ο καταστολέας A χρησιμοποιείται για την καταστολή της κινητής φάσης, ενώ ο B αναγεννάται.

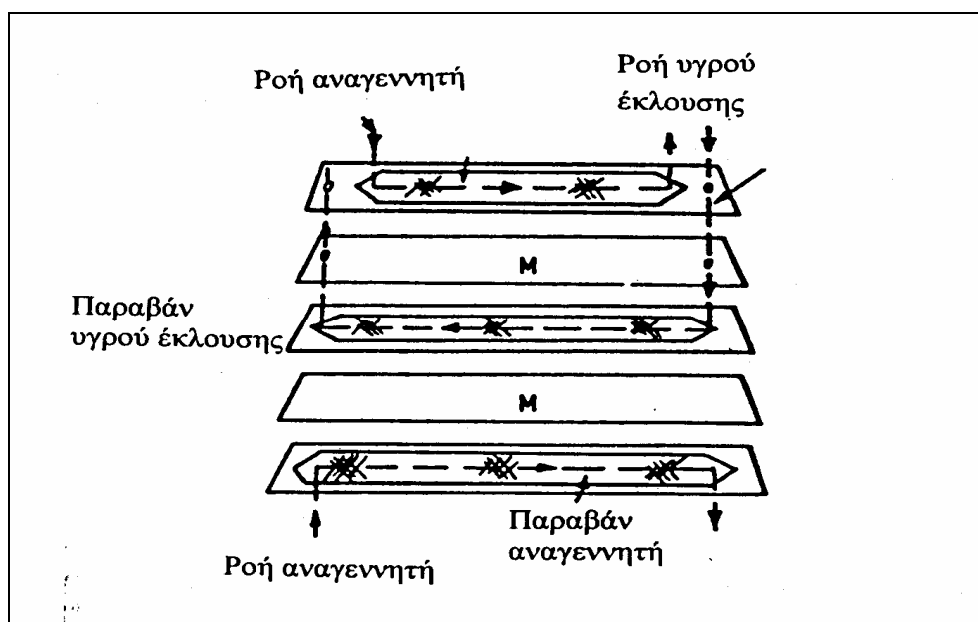
Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων των καταστολέων στήλης, αναπτύχθηκαν οι καταστολείς μεμβράνης. Το 1981 κυκλοφόρησε ο πρώτος καταστολέας μεμβράνης, ο οποίος βασιζόταν σε κοίλο ινώδες υλικό, ημιπερατό στα ιόντα. Η κινητή φάση διερχόταν από το εσωτερικό μέρος της ινώδους μεμβράνης, ενώ κατάλληλο διάλυμα αναγέννησης της καταστολής (regenerating solution) διερχόταν από το εξωτερικό μέρος της μεμβράνης (Σχήμα 1.7). Η ροή του διαλύματος αναγέννησης ήταν συνεχής και δεν απαιτείτο διακοπή της λειτουργίας για την αναγέννηση των μεμβρανών. Στην περίπτωση του προσδιορισμού ανιόντων το διάλυμα αναγέννησης ήταν υδατικό διάλυμα θεικού οξέος και η μεμβράνη ήταν διαπερατή μόνο από τα κατιόντα. Έτσι, η είσοδος κατιόντων υδρογόνου από το χώρο του διαλύματος αναγέννησης στο χώρο της κινητής φάσης είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των κατιόντων της κινητής φάσης προς το χώρο του υγρού αναγέννησης, έτσι ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Αντίστοιχα γινόταν η καταστολή στους προσδιορισμούς κατιόντων, με τη διαφορά ότι το διάλυμα αναγέννησης ήταν υδατικό διάλυμα καυστικού καλίου και η μεμβράνη ήταν διαπερατή μόνο στα ανιόντα.¹⁹

Εκτός από το πλεονέκτημα της συνεχούς λειτουργίας, οι καταστολείς μεμβράνης είχαν μικρότερο νεκρό όγκο (περίπου 300 μl) σε σχέση με τους καταστολείς στήλης και επομένως βελτίωσαν την απόδοση των διαχωρισμών. Μειονέκτημα σε σχέση με τους καταστολείς στήλης ήταν η μικρότερη απόδοση καταστολής ιδιαίτερα σε σχετικά μεγάλες ταχύτητες ροής (>2 ml/min) και υψηλές συγκεντρώσεις εκλουστικών (> 0,005 M).⁵³



Σχήμα 1.7: Καταστολέας ινώδους μεμβράνης για τον προσδιορισμό κατιόντων. Τα ιόντα H^+ από το υγρό καταστολής (H_2SO_4), που ρέει στο εξωτερικό της μεμβράνης, ανταλλάσσονται με τα ιόντα Na^+ και μετατρέπουν το υγρό έκλουσης σε ανθρακικό οξύ.

Η επόμενη εξέλιξη των καταστολέων μεμβράνης έγινε το 1985 με την εισαγωγή των καταστολέων μικρομεμβράνης με πάχος μικρότερο από 0,075 mm, οι οποίοι χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα.²⁰ Οι καταστολείς μικρομεμβράνης είναι κατασκευασμένοι από δύο ημιπερατές μεμβράνες τοποθετημένες ανάμεσα σε τρία δικτυωτά πλέγματα με περιορισμένο ποσοστό σούλφωσης, όπως εικονίζεται στο σχήμα 1.8. Η ροή της κινητής φάσης γίνεται ανάμεσα στις δύο μικρομεμβράνες, ενώ η ροή του διαλύματος αναγέννησης γίνεται από την εξωτερική πλευρά των μεμβρανών, αντίθετα από τη ροή της κινητής φάσης και με ταχύτητα 3 έως 10 φορές μεγαλύτερη. Τα δικτυωτά πλέγματα, που βρίσκονται σε επαφή με τις μεμβράνες, αφενός μεν μειώνουν το νεκρό όγκο στο χώρο της κινητής φάσης και αφετέρου δημιουργούν στροβιλώδη ροή του διαλύματος αναγέννησης με αποτέλεσμα την καλύτερη μεταφορά ιόντων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Επίσης, εξαιτίας των σουλφονικών ομάδων, αυξάνουν τη συγκέντρωση ιόντων καταστολής στην επιφάνεια της μεμβράνης χωρίς να αυξάνουν ταυτόχρονα τη συγκέντρωση των αντισταθμιστικών ιόντων. Αυτό είναι μία πολύ σημαντική βελτίωση σε σχέση με τους καταστολείς ινώδους μεμβράνης, διότι σε αυτούς αν χρησιμοποιείτο διάλυμα καταστολής μεγάλης συγκέντρωσης, τότε, εκτός από τα ιόντα καταστολής, διαπερνούσαν τη μεμβράνη και τα αντισταθμιστικά ιόντα με συνέπεια την αύξηση του σήματος υποβάθρου. Ως διάλυμα αναγέννησης της καταστολής χρησιμοποιείται στην περίπτωση του προσδιορισμού ανιόντων, υδατικό διάλυμα σουλφονικού οξέος και στην περίπτωση του προσδιορισμού κατιόντων, υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου. Τα πλεονεκτήματα των καταστολέων μικρομεμβράνης είναι τα εξής: α) έχουν πολύ μικρό νεκρό όγκο, περίπου 50 μ l, δηλαδή σχεδόν το 1/6 του νεκρού όγκου των καταστολέων ινώδους μεμβράνης (η μείωση του νεκρού όγκου επέτρεψε προσδιορισμούς με αριθμό θεωρητικών πλακών μεγαλύτερο από 8000), β) έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα καταστολής (ισοδύναμα ιόντων που καταστέλλονται ανά μονάδα χρόνου), από 200 έως 300 μ eq / min, γ) έγινε εφικτή η εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης και δ) είναι συμβατοί με τη χρήση οργανικών διαλυτών.⁵⁴ Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτών των καταστολέων είναι ότι απαιτούν συνεχή και σταθερή παροχή διαλύματος αναγέννησης, με συνέπεια την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αντιδραστηρίων. Το μειονέκτημα αυτό αντιμετωπίστηκε με κατασκευή συστήματος αυτόματης αναγέννησης (auto regeneration), που βασίζεται στη χρήση ιονταλλακτικής στήλης αναγέννησης του διαλύματος καταστολής, η οποία δεσμεύει τα ιόντα που έχουν προέλθει από την κινητή φάση με ταυτόχρονη απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου ή ανιόντων υδροξυλίου. Το διάλυμα καταστολής μετά την έξοδό του από τον καταστολέα οδηγείται στη στήλη αναγέννησης και στη συνέχεια επιστρέφει στον καταστολέα. Είναι αυτονόητο ότι η χωρητικότητα και ο νεκρός όγκος της στήλης αναγέννησης δεν έχουν καμία επίδραση στο χρωματογραφικό διαχωρισμό και γι' αυτόν το λόγο οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι μεγάλης χωρητικότητας και νεκρού όγκου, ώστε να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής.



Σχήμα 1.8: Δομή καταστολέα μικρομεμβράνης. Η συσκευή χωρίζεται με δύο ιονανταλακτικές μεμβράνες σε τρία διαμερίσματα, στα δύο ακραία κυκλοφορεί ο αναγεννητής και στο μεσαίο το υγρό έκλυσης.

Το 1991 παρουσιάστηκε μία τροποποίηση του καταστολέα μικρομεμβράνης, κατάλληλη για στήλες εσωτερικής διαμέτρου 2 mm (microbore). Η τροποποίηση που είχε γίνει αφορούσε τη μείωση του όγκου του χώρου ροής της κινητής φάσης δύο έως τρεις φορές, ώστε να διατηρηθεί η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης σταθερή. Αυτού του είδους τα συστήματα ιοντικής χρωματογραφίας, εκτός από τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνολογία των στηλών εσωτερικής διαμέτρου 2 mm, έχουν το επιπλέον πλεονέκτημα της κατά 2 έως 3 φορές μεγαλύτερης χωρητικότητας καταστολής και επομένως είναι εφικτή η χρήση πυκνότερων εκκλουστικών υγρών.

Σημαντικό βήμα στην τεχνολογική εξέλιξη των καταστολέων αποτελεί η παρουσίαση το 1992 του πρώτου ηλεκτρολυτικού καταστολέα μικρομεμβράνης, που ονομάστηκε αυτοαναγεννόμενος καταστολέας (Self Regenerating Suppressor).²⁶ Ο καταστολέας αυτός χρησιμοποιεί δύο ηλεκτρόδια λευκοχρύσου, ένα σε κάθε διαμέρισμα του διαλύματος αναγέννησης, εκ των οποίων το ένα λειτουργεί ως άνοδος και το δεύτερο ως κάθοδος, με σκοπό την ηλεκτρόλυση του νερού. Αυτό το είδος καταστολέων χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας και περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 5.1.1.3.4. Πλεονέκτημα των ηλεκτρολυτικών καταστολέων αποτελεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης της κινητής φάσης ως διάλυμα καταστολής, μετά την έξοδό της από τον ανιχνευτή. Όμως, η μείωση της αγωγιμότητας υποβάθρου είναι μικρότερη σε σχέση με το μη ηλεκτρολυτικό καταστολέα, εξαιτίας της μικρής ροής της κινητής φάσης και της σχετικά μικρής συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου και υδροξυλίου, που παράγονται από την ηλεκτρόλυση του νερού. Επίσης, μειονέκτημα αυτών των καταστολέων είναι η μη συμβατότητα

με οργανικούς διαλύτες και ανόργανα οξέα και επομένως ο περιορισμός της σύστασης της κινητής φάσης στους προσδιορισμούς κατιόντων στο μεθανοσουλφονικό οξύ ή κάποιων υποκαταστατών.⁵⁵

Οι ιδιότητες και η σύσταση των μεμβρανών καθώς και η τεχνολογία των καταστολέων εξελίσσονται συνεχώς. Το 2000 παρουσιάστηκε από την εταιρεία Dionex ο πέμπτης γενιάς καταστολέας μικρομεμβράνης. Αποτέλεσμα είναι η απόδοση των διαχωρισμών και τα χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων να βελτιώνονται συνεχώς. Τυπικώς αναφέρεται ότι για προσδιορισμούς αλογόνων, αλκαλίων και αλκαλικών γαιών το όριο ποσοτικοποίησης των σύγχρονων συστημάτων ιοντικής χρωματογραφίας βρίσκεται στο επίπεδο των 5 ppb.

1.6 ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ^{41, 56, 57}

Ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στις εφαρμογές ιοντικής χρωματογραφίας, καθότι τα προσδιοριζόμενα σωματίδια είναι ιοντισμένα και επομένως εμφανίζουν ηλεκτρική αγωγιμότητα. Παράλληλα, υπάρχει ένας αριθμός άλλων ανιχνευτών κυρίως ηλεκτροχημικών και οπτικών, που επεκτείνουν τις δυνατότητες της ιοντικής χρωματογραφίας σε ένα ευρύ πεδίο προσδιοριζόμενων σωματιδίων, που περιλαμβάνει από ισχυρώς μέχρι πολύ ασθενώς ιονιζόμενα οργανικά ή ανόργανα σωματίδια. Ακόμη και οι υδατάνθρακες, που είναι υπό τη μορφή ιόντος σε $\text{pH} > 12$, μπορούν να προσδιοριστούν με την ιοντική χρωματογραφία.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας των ανιχνευτών ιοντικής χρωματογραφίας είναι όμοια με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ποιότητας που αναφέρονται για όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές και περιλαμβάνουν κυρίως τη γραμμική δυναμική περιοχή, την ευαισθησία και την ανιχνευσιμότητα.

1.6.1 Ηλεκτροχημικοί Ανιχνευτές

1.6.1.1 Αγωγιμομετρικός ανιχνευτής

Η μέθοδος αγωγιμομετρικής ανίχνευσης θεμελιώνεται θεωρητικά από δύο νόμους:

A) Το νόμο του Ohm, με βάση τον οποίο η αγωγιμότητα ενός διαλύματος G είναι ανάλογη της έντασης του ρεύματος i και αντιστρόφως ανάλογη του εφαρμοζόμενου δυναμικού E :

$$G = i/E \quad (1.38)$$

B) Το νόμο του Kohlraush περί της ανεξάρτητης όδευσης των ιόντων, σύμφωνα με τον οποίο το κάθε ιόν προσφέρει ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα ιόντα στην ειδική αγωγιμότητα ενός διαλύματος, δηλαδή η ειδική αγωγιμότητα ενός διαλύματος είναι το άθροισμα των ισοδύναμων αγωγιμοτήτων των ιόντων λ_i° επί τη συγκέντρωση c_i του κάθε ιόντος.

$$\kappa = \sum_i \lambda_i^{\circ} c_i / 1000 \quad (1.39)$$

Η τιμή της λ° αυξάνει με αύξηση του φορτίου του ιόντος και της ευκινησίας του (mobility). Η ευκινησία εξαρτάται από το μέγεθος του εφουδατομένου ιόντος, με τα μικρά ιόντα να είναι πιο ευκίνητα σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Επίσης, είναι ευνόητο ότι στην περίπτωση των ιόντων που συμμετέχουν σε αντίδραση πρωτονίωσης σχηματίζοντας μη ιοντικές μορφές, στη μετρούμενη αγωγιμότητα έχει συνεισφορά μόνο η ιοντισμένη μορφή. Αυτό αποτελεί και το μεγαλύτερο περιορισμό της αγωγιμομετρικής ανίχνευσης με αποτέλεσμα ασθενώς ιοντισμένα σωματίδια, όπως οι υδατάνθρακες και τα κατιόντα των στοιχείων μετάπτωσης, να ανιχνεύονται με άλλες τεχνικές.

Η αγωγιμομετρική ανίχνευση βασίζεται στην εφαρμογή εναλλασσόμενου δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων εντός κατάλληλης κυψελίδας και στη μέτρηση της έντασης του ρεύματος. Στην περίπτωση της καταστέλλομενης χρωματογραφίας, αν υποθεθεί ότι έχουν απομακρυνθεί όλα τα ιόντα της κινητής φάσης, η μετρούμενη ένταση του ρεύματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του εκλούμενου ιόντος. Η περίπτωση της μη καταστέλλομενης χρωματογραφίας είναι περισσότερο περίπλοκη, διότι τα εκλούμενα ιόντα συνυπάρχουν με τα ιόντα της κινητής φάσης, όπου το άθροισμα των συγκεντρώσεων των εκλούμενων ιόντων και των συγκεντρώσεων των ιόντων της κινητής φάσης είναι σταθερό σε κάθε σημείο της χρωματογραφικής στήλης. Όπως εξηγείται στο εδάφιο 1.5.1 αυτό μπορεί να οδηγήσει είτε σε αύξηση (άμεση αγωγιμομετρική ανίχνευση) είτε σε μείωση (έμμεση αγωγιμομετρική ανίχνευση) της μετρούμενης έντασης ρεύματος, σε κάθε περίπτωση όμως η μετρούμενη μεταβολή είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των εκλούμενων ιόντων.

Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής δισδιάστατης αγωγιμομετρικής ανίχνευσης, με σύνδεση δύο αγωγιμομετρικών ανιχνευτών σε σειρά και με κινητή φάση NaOH. Πριν τον πρώτο αγωγιμομετρικό ανιχνευτή γίνεται καταστολή της κινητής φάσης και επομένως ο πρώτος ανιχνευτής ανταποκρίνεται μόνο στα ανιόντα ισχυρών οξέων. Μετά τον πρώτο ανιχνευτή η κινητή φάση οδηγείται σε γεννήτρια παροχής NaOH (Microscale Electrolytic NaOH Generator, MENG), οπότε ο δεύτερος ανιχνευτής χρησιμοποιείται για έμμεση αγωγιμομετρική ανίχνευση, η οποία ανταποκρίνεται σε όλα τα ιόντα. Επίσης, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για την ταυτότητα των ιόντων, διότι ο λόγος του σήματος του πρώτου ανιχνευτή προς το σήμα του δεύτερου είναι χαρακτηριστικός για κάθε ιόν και εξαρτάται από το pK_a .⁵⁸

1.7 ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η επιλογή της κινητής φάσης εξαρτάται από τέσσερις κυρίως παράγοντες: α) το φορτίο, τη σταθερά ιονισμού και το μέγεθος των προς διαχωρισμό ιόντων, β) το είδος της στατικής φάσης, γ) το είδος του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή και δ) την εφαρμογή ή όχι συστήματος καταστολής. Εξαιτίας της άμεσης σχέσης μεταξύ της κινητής φάσης και των υπολοίπων παραγόντων του χρωματογραφικού συστήματος, στοιχεία σχετικά με τη σύσταση της κινητής φάση αναφέρονται και στα υποκεφάλαια 1.4, 1.5 και 1.6.

1.7.1 Εκλουστικά Υγρά Καταστελλόμενης Ιοντικής Χρωματογραφίας

1.7.1.1 Ανάλυση ανιόντων

Το εκλουστικό ιόν, στην περίπτωση της καταστελλόμενης ιοντικής χρωματογραφίας, θα πρέπει να έχει την ικανότητα να μετατρέπεται με μία μη αντιστρεπτή αντίδραση σε σωματίδιο όσο το δυνατόν ελάχιστο ιονιζόμενο. Υπ' αυτήν την άποψη, το ιδανικό εκλουστικό ιόν θα ήταν το ιόν υδροξυλίου, το οποίο με πρωτονίωση μετατρέπεται σε νερό. Ωστόσο, εξαιτίας της μικρής εκλουστικής ικανότητας των ιόντων υδροξυλίου, στους προσδιορισμούς δύσκολα εκλουόμενων ανιόντων θα πρέπει να χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση, η οποία συνεπάγεται υψηλό σήμα υποβάθρου. Για το λόγο αυτό τα υδροξυλιόντα αρχικά είχαν εφαρμογή μόνο στους προσδιορισμούς φθοριούχων, χλωριούχων και μονοβασικών οργανικών ιόντων μικρού μοριακού βάρους (π.χ.: οξικά, μυρμηκικά). Η εξέλιξη της ιοντικής χρωματογραφίας, τόσο στην ικανότητα καταστολής των καταστολέων όσο και στην κατασκευή στηλών μικρής χωρητικότητας, οδήγησε στη διεύρυνση της χρήσης των ιόντων υδροξυλίου ως εκλουστικών ιόντων.

Για την έκλουση ιόντων με μεγαλύτερη σταθερά εκλεκτικότητας, όπως είναι τα πολυσθενή ανιόντα, τα ιόντα φαινοξειδίου είναι μία κατάλληλη επιλογή, διότι αφενός μεν έχουν μεγάλη εκλουστική ικανότητα (μεγάλη σταθερά εκλεκτικότητας), αφετέρου δε το προϊόν καταστολής, η φαινόλη, έχει μικρή σταθερά διάστασης.⁴⁷

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κινητή φάση στην ιοντική χρωματογραφία είναι ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων. Τα ιόντα που συμμετέχουν στο μηχανισμό ιονταλλαγής είναι τα ανθρακικά, όξινα ανθρακικά και ιόντα υδροξυλίου. Επειδή καθένα από αυτά έχει διαφορετική εκλουστική ικανότητα, είναι εφικτό να ρυθμιστεί η ολική εκλουστική ικανότητα της κινητής φάσης με ρύθμιση του pH. Επίσης, η ρύθμιση του pH είναι χρήσιμη στις περιπτώσεις έκλουσης ανιόντων ασθενών οξέων, οπότε σ' αυτήν την περίπτωση ρυθμίζεται το ποσοστό των μορίων του οξέος που δίστανται, δηλαδή ρυθμίζεται η εκλεκτικότητα των εκλουόμενων σωματιδίων. Παράλληλα, έχει αναφερθεί η προσθήκη στο ρυθμιστικό των ανθρακικών, αρωματικών ενώσεων,

όπως η τυροσίνη και η π-κυανοφαινόλη, και N-υποκατεστημένων αμινοαλκυλοσουλφονικών οξέων.⁸⁵

Επίσης, ευρεία είναι η χρήση κινητής φάσης βορικών ιόντων, τα οποία, παρότι δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα έναντι των ανθρακικών, έχουν καλύτερη συμπεριφορά σε συγκεκριμένους προσδιορισμούς, όπως στο EDTA.⁸⁶

Έχει επίσης αναφερθεί η χρήση εκλουστικών ιόντων, τα οποία είναι αμφολύτες, όπως τα γλουταμινικά. Παρότι η χρήση τους είναι περιορισμένη έχουν δύο σημαντικά πλεονεκτήματα: α) έχουν μεγάλη σταθερά εκλεκτικότητας προς τη ρητίνη και β) μπορούν να απομακρυνθούν πλήρως με καταστολείς στήλης σε όξινη μορφή.

1.7.1.2 Ανάλυση κατιόντων

Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα εκλουστικά υγρά είναι υδατικά διαλύματα ανόργανων οξέων, όπως το HCl, HNO₃ και H₂SO₄. Κινητή φάση σε περιοχή συγκέντρωσης από 1 mM έως 10 mM σε ένα από τα παραπάνω οξέα έχει την ικανότητα σε στήλες μικρής χωρητικότητας να εκλούσει γρήγορα κατιόντα αλκαλίων, αμμωνίου και οργανικές αμίνες μικρού μοριακού βάρους. Σε συστήματα καταστολής, που δεν είναι συμβατά με τα ανόργανα οξέα, χρησιμοποιείται το τριφθοροξικό οξύ ή το μεθανοσουλφονικό οξύ. Το κατιόν υδρογόνου, όπως αντίστοιχα το ανιόν υδροξυλίου στην ανάλυση ανιόντων, παρουσιάζει το πλεονέκτημα της μικρής αγωγιμότητας υποβάθρου μετά τη διέλευση από τον καταστολέα, έχει όμως το μειονέκτημα της μικρής σταθεράς εκλεκτικότητας με τη ρητίνη, με αποτέλεσμα να απαιτείται υψηλή συγκέντρωση κινητής φάσης.

Μία λύση στο πρόβλημα αυτό είναι η χρήση ιόντων σιδήρου ή χαλκού, σε αυτήν όμως την περίπτωση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίπλοκο σύστημα καταστολής, το οποίο να βασίζεται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης και καταβύθισης.

Ευρεία είναι επίσης η χρήση οργανικών αμινών, όπως η ανιλίνη και η πυριδίνη, ως εκλουστικών ιόντων, διότι παρουσιάζουν καλή εκλουστική ικανότητα και ταυτόχρονα μπορεί η αγωγιμότητα υποβάθρου να κατασταλεί εύκολα.

Για τις περιπτώσεις των πολυσθενών κατιόντων και γενικά των δύσκολα εκλουόμενων κατιόντων, το εκλουστικό επιλογής είναι η μ-φαινυλοδιαμίνη, ενώ αυξανόμενο πεδίο εφαρμογών παρουσιάζει το διαμινοπροπιονικό οξύ (DAP). Το DAP εμφανίζεται ως μονοσθενές και δισθενές κατιόν, η αναλογία των οποίων καθορίζεται από το pH της κινητής φάσης και ρυθμίζεται με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος. Μετά τη διέλευση από τον καταστολέα το DAP μετατρέπεται σε εσωτερικό άλας με μηδενική αγωγιμότητα και το υδροχλωρικό οξύ σε νερό.

1.7.2 Εκλουστικά Υγρά Μη Καταστελλόμενης Ιοντικής Χρωματογραφίας

Στην περίπτωση της μη καταστελλόμενης ιοντικής χρωματογραφίας προσδιορισμού ανιόντων, θα πρέπει το εκλουστικό υγρό να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή εκλουστική ικανότητα, έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται μικρές συγκεντρώσεις και επομένως να εμφανίζεται μικρή αγωγιμότητα υποβάθρου. Επίσης, θα πρέπει η διαφορά της ισοδύναμης αγωγιμότητας ανάμεσα στα εκλούμενα και εκλουστικά ιόντα να είναι η μεγαλύτερη δυνατή ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη ευαισθησία. Για το λόγο αυτό προτείνεται, όταν το εκλούμενο ανιόν είναι ασθενής βάση, η παρασκευή της κινητής φάσης να γίνεται με τα οξέα των επιθυμητών εκλουστικών ανιόντων και όχι με άλατα.⁸⁷ Τα ιόντα που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι τα βενζοϊκά και λιγότερο τα φθαλικά και σουλφοβενζοϊκά. Επίσης, χρησιμοποιούνται και τα ανιόντα υδροξυλίου, σε αυτήν την περίπτωση όμως η ανίχνευση είναι έμμεση (indirect conductometric detection), δηλαδή οι λαμβανόμενες κορυφές είναι αρνητικές.

Στην περίπτωση της ανάλυσης κατιόντων τα χρησιμοποιούμενα υγρά έκλουσης είναι, όπως και στην καταστελλόμενη ανίχνευση, διαλύματα ανόργανων οξέων και επομένως το εκλουστικό ιόν είναι το κατιόν του υδρογόνου. Εξαιτίας της μεγάλης ειδικής αγωγιμότητας του κατιόντος υδρογόνου, οι περισσότερες εφαρμογές μη καταστελλόμενης ανίχνευσης κατιόντων βασίζονται στην έμμεση ανίχνευση. Για την επίτευξη άμεσης ανίχνευσης χρησιμοποιείται η αιθυλενοδιαμίνη παρουσία οργανικού δικαρβοξυλικού οξέος, όπως είναι το οξαλικό και το τρυγικό οξύ.⁸⁸

1.7.3 Βαθμιδωτή Έκλουση

Η βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην ιοντική χρωματογραφία για να επιτευχθεί ο συμπροσδιορισμός ιόντων με πολύ διαφορετικούς συντελεστές εκλεκτικότητας (π.χ.: ιόντα με διαφορετικό φορτίο). Η βαθμιδωτή έκλουση αντιστοιχεί σε αύξηση της εκλουστικής ισχύος της κινητής φάσης, η οποία επιτυγχάνεται είτε με αύξηση της συγκέντρωσης είτε με μεταβολή της σύστασης, δηλαδή αντικατάσταση ενός ασθενώς συγκρατούμενου από ένα ισχυρά συγκρατούμενο ιόν. Η μεταβολή του pH μπορεί επίσης να προκαλέσει αύξηση της εκλουστικής ισχύος, για παράδειγμα με προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης διαλύματος ισχυρής βάσης σε διάλυμα ασθενούς οξέος, οπότε αυξάνεται η συγκέντρωση της ιοντισμένης μορφής του οξέος. Κατά τη βαθμιδωτή έκλουση παρουσιάζονται δύο σημαντικά προβλήματα: α) αύξηση του χρόνου ανάλυσης και β) όχι σταθερή αγωγιμότητα υποβάθρου κατά τη διάρκεια της έκλουσης.

Η μεταβολή της σύστασης του υγρού έκλουσης αυξάνει το χρόνο ανάλυσης. Προκειμένου να εκλουστούν οι πλέον ισχυρά συγκρατούμενοι αναλύτες από τη στήλη, πρέπει εκλουστικό ιόν με μεγάλη συγγένεια προς τη ρητίνη να εκτοπίσει σταδιακά κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού

το ασθενές εκλουστικό ιόν από τις ιονανταλλακτικές θέσεις της ρητίνης. Επιπλέον, πριν τη διεξαγωγή της επόμενης ανάλυσης πρέπει να εξισορροπηθεί ξανά η στήλη με το ασθενές εκλουστικό ιόν. Αν αντίθετα επιλεγεί η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης με μεταβολή της συγκέντρωσης δεν παρουσιάζεται αυτό το μειονέκτημα.⁸⁹

Το σημαντικότερο πρόβλημα που εμφανίζεται στην εφαρμογή της βαθμιδωτής έκλουσης στην ιοντική χρωματογραφία, είναι ότι η μεταβολή στη σύσταση του υγρού έκλουσης προκαλεί μεταβολή στην αγωγιμότητα υποβάθρου και επομένως σημαντική διατάραξη στη γραμμή βάσης. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος επίλυσης του προβλήματος είναι η χρήση καταστολέα, που εξουδετερώνει το υγρό έκλουσης ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή του. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο καταστολέας σε συνδυασμό με ηλεκτρονική διόρθωση της γραμμής βάσης, η οποία επιτυγχάνεται με τη βοήθεια υπολογιστή. Δηλαδή, καταγράφεται η γραμμή βάσης σε χρωματογράφημα που λαμβάνεται χωρίς εισαγωγή δείγματος και αυτή η γραμμή βάσης αφαιρείται ηλεκτρονικά από όλα τα χρωματογραφήματα.⁹⁰ Ένας δεύτερος τρόπος, που έχει προταθεί για την επίλυση του προβλήματος, είναι η προσθήκη μανιτόλης στο υγρό έκλουσης, με μειούμενη συγκέντρωση κατά τη διάρκεια της μέτρησης, σε συνδυασμό με βορικό οξύ, που προστίθεται στο υγρό αναγέννησης του καταστολέα. Το βορικό οξύ διαχέεται μέσω των μεμβρανών του καταστολέα στην κινητή φάση σχηματίζοντας με τη μανιτόλη ιοντική ένωση της οποίας η συγκέντρωση μειώνεται όσο αυξάνει η συγκέντρωση του εκλουστικού ιόντος, διατηρώντας έτσι συνολικά σταθερή αγωγιμότητα υποβάθρου. Σε παρόμοιο σκεπτικό στηρίζεται η τεχνική της ισοαγωγιμής βαθμιδωτής έκλουσης (isoconductance gradient), στην οποία επιλέγονται αντισταθμιστικά ιόντα με κατάλληλη ισοδύναμη αγωγιμότητα, ώστε να μην παρουσιάζεται μεταβολή στην ολική αγωγιμότητα της κινητής φάσης.⁹¹