

IZNENAĐENJA U IONSKOJ KROMATOGRAFIJI

Štefica CERJAN Stefanović,
Šime Ukić, Tomislav Bolanača

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u
Zagrebu

Zavod za analitičku kemiju, Zagreb , Marulićev trg 20,
scerjan@fkit.hr

WW2009

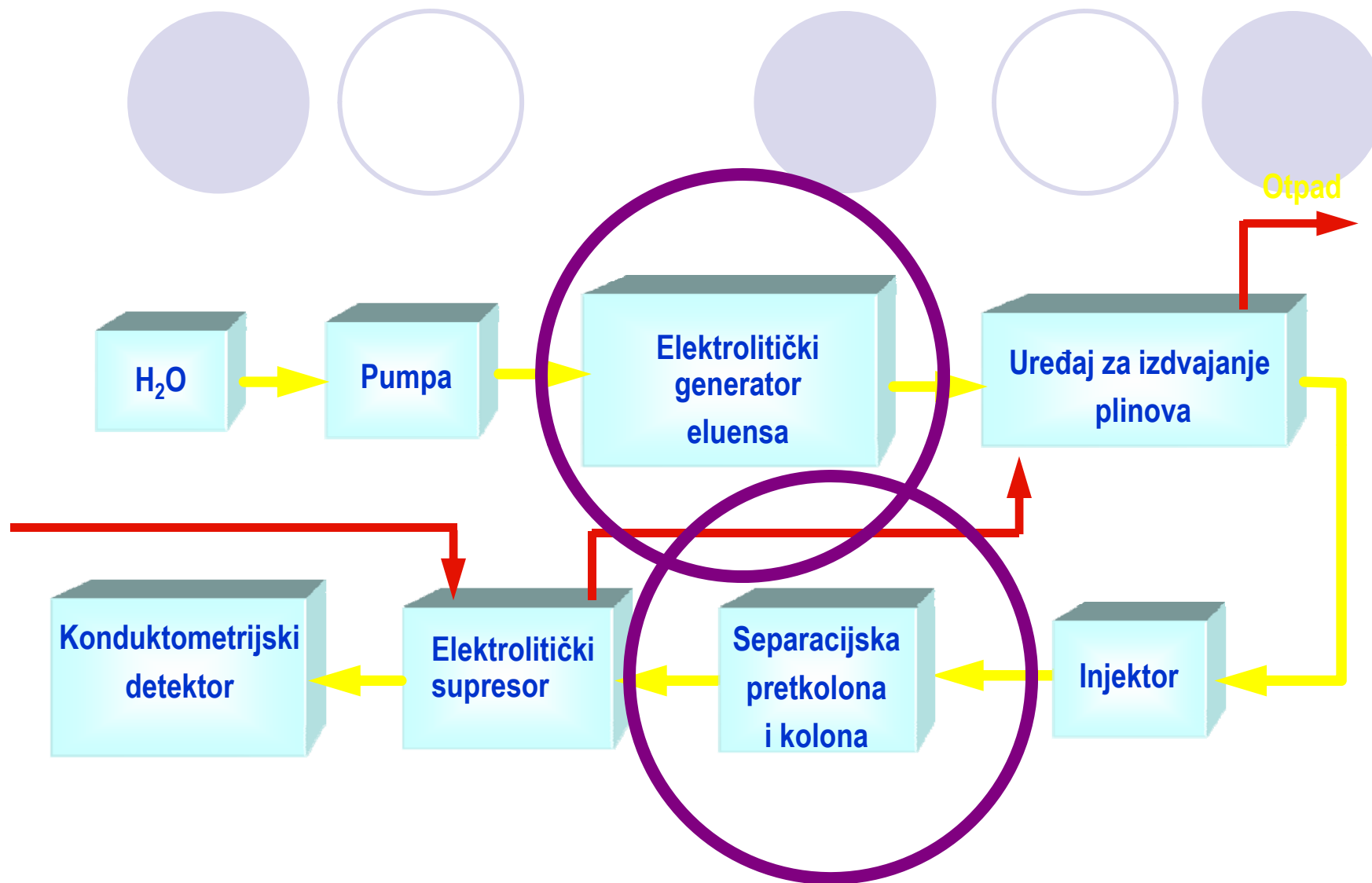
Novi Sad 08.-11.09.2009

Plan predavanja

- Karakteristične veličine u kromatografiji
- **MODELIRANJE KROMATOGRFSKIH VELIČINA**
 - 1.1. Model linearne jakosti otapala
 - 1.2. Hooverov model
 - 1.3. Model dvokompeticijskog eluensa
 - 1.4. Model multikompeticijskog eluensa
 - 1.5. Model Noviča i suradnika
 - 1.6. Model krajnjih točaka
 - 1.7. Kvantitativni odnosi strukture i vremena zadržavanja analita
 - 1.8. Model zagrebačke škole

Ionska kromatografija standardna analitička tehnika

- Ionska kromatografija prihvaćena kao standardna analitička tehnika već duži niz godina (**AOAC, ASTM, ISO**) njena popularnost i dalje raste. Osobito je omiljena za razdvajanje i analizu anorganskih aniona i kationa, te organskih iona malih dimenzija. Ona omogućava brzu analizu, obogaćenu sposobnošću simultanog određivanja velikog broja komponenti, u poprilično različitim matricama



Slika 1. Shematski prikaz modernog ionskog kromatografskog sustava

Svrha ionske kromatografije

- Glavna svrha ionske kromatografije jest razdvajanje komponenti, na čiju kvalitetu ponajviše utječu vrijeme zadržavanja komponente u sustavu i širina zone njene raspodjele. Oni ovise o drugim uvjetima sustava, poput vrste nepokretne faze, sastava pokretne faze, protoka, temperature. Određivanje optimalnih uvjeta kromatografskog razdvajanja korištenjem metode „pokušaja i pogrešaka“ obično zahtjeva iznimno mnogo vremena. Skraćivanja vremenskog perioda potrebnog za razvoj metode, tijekom godina razvijani su mnogi modeli predviđanja vremena zadržavanja.



Predviđanja modela

- Bitno je istaknuti da sposobnost predviđanja modela raste s porastom njihove kompleksnosti, čime raste i broj parametara potreban za modeliranje. Stoga se u obzir mora uzeti znatno veći broj kalkulacija, pa je razvoj kompleksnijih opisa kromatografskog procesa osobit impuls dobio razvojem informatičkih znanosti u zadnjim dekadama 20-og stoljeća.
- Najveći razlog relativno sporom razvoju teorije kromatografije leži u složenost samog kromatografskog procesa. Razjašnjavanja i opisivanja modela razdvajanja često koriste raznorazna pojednostavljenja posljedica, jer ne postoje teorijski modeli, koji bi u potpunosti ispravno simulirao kromatografski proces, što se ovim radom pokušalo riješiti

Reakcija anionske izmjene

- $\text{Cl}^- + \text{ROH} \leftrightarrow \text{RCl} + \text{OH}^- \quad (1)$
- $\text{E-nepok} + \text{A-pok} \leftrightarrow \text{A-nepok} + \text{E-pok}$

- $$K_A = \frac{[\text{A}^-]_{\text{nepok}} \times [\text{E}^-]_{\text{pok}}}{[\text{A}^-]_{\text{pok}} \times [\text{E}^-]_{\text{nepok}}} \quad (2)$$

- A: anion uzorka
- E: anion izmjenjivača (protuion)

Donannova teorija membrane

- a, b veličina naboja iona A i B,

$$\frac{(B)^a * [A]^b}{(A)^a * [B]^b} = K_{cA}^B$$

$$a \neq b$$

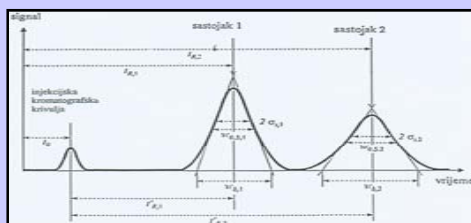
$$\frac{(B)}{[B]} = \sqrt[a]{K_{cA}^B * \frac{(A)^b}{[A]^b}} = \left(K_{cA}^B\right)^{1/a} * \left(\frac{(A)^b}{[A]^b}\right)^{1/b} = K_d$$

$$a = b$$

$$K_d = \frac{(B)}{[B]} = K_{cA}^B * \frac{(A)}{[A]}$$

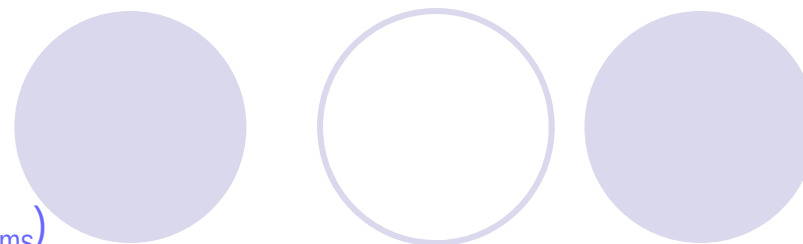
KOEFICIJENT
RASPODJELE,
Utezni
Volumni

Karakteristične veličine u kromatografiji

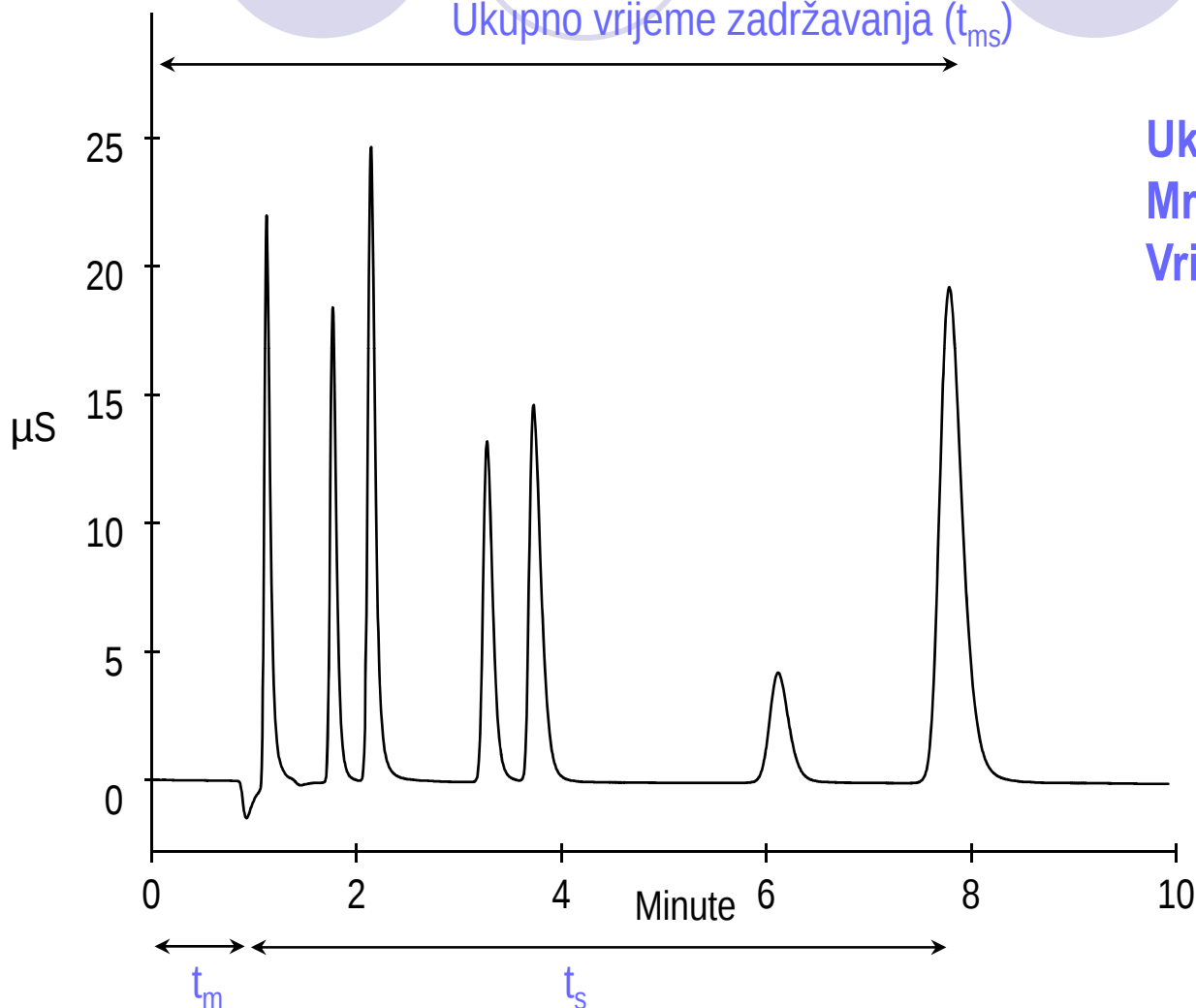


t_0	mrtvo vrijeme	vrijeme potrebno da pokretna faza proteče kroz separacijski sustav
t_R	vrijeme zadržavanja	vrijeme proteklo od injektiranja uzorka do pojavljivanja njegovog maksimuma na kraju separacijskog sustava
t_R'	ukupno vrijeme zadržavanja	vrijeme zadržavanja umanjeno za mrtvo vrijeme
σ_t	standardno odstupanje	polovina širine kromatografska krivulja u točki infleksije
$w_{0,5}$	širina kromatografske krivulje na polovini visine kromatografske krivulje	$2,345 \sigma_t$
w_b	širina baze kromatografske krivulje	$4 \sigma_t$

Kromatogram



Ukupno vrijeme zadržavanja (t_{ms})



Ukupno vrijeme zadržavanja: t_{ms}

Mrtvo vrijeme: t_m

Vrijeme zadržavanja: t_s

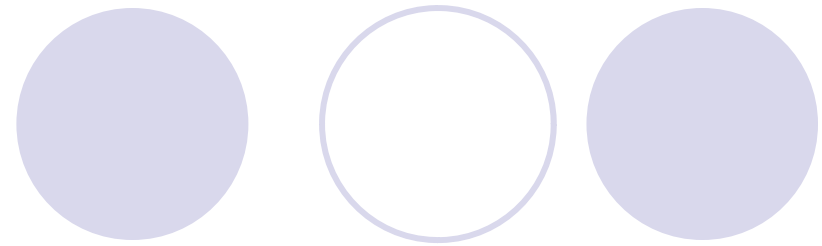
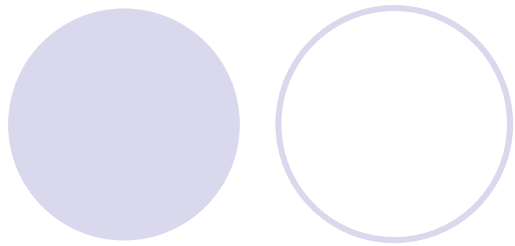
$$t_{ms} = t_m + t_s$$

selektivnost

$$\alpha = \frac{t_{s2}}{t_{s1}} = \frac{t_{ms2} - t_m}{t_{ms1} - t_m}$$

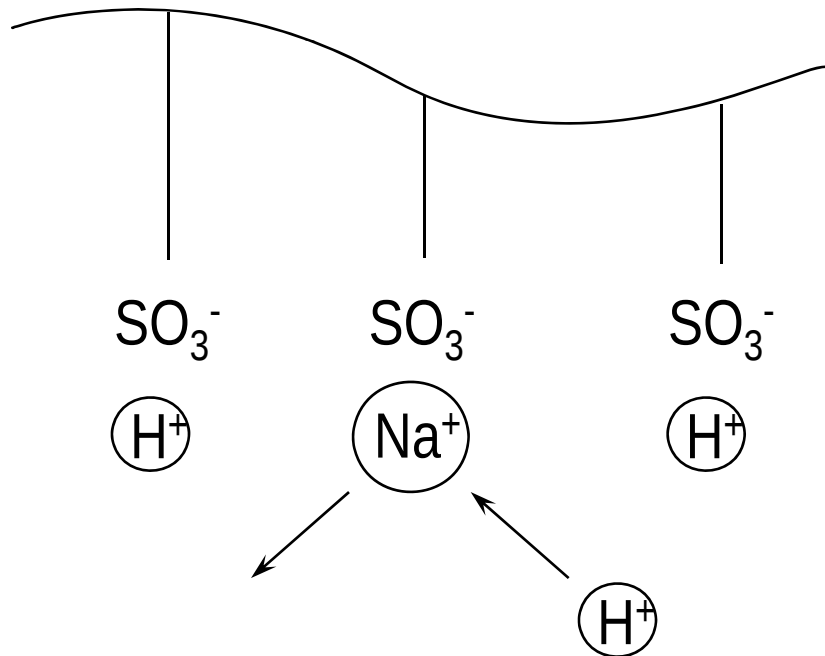
Faktor kapaciteta:

$$k' = t_s / t_m$$



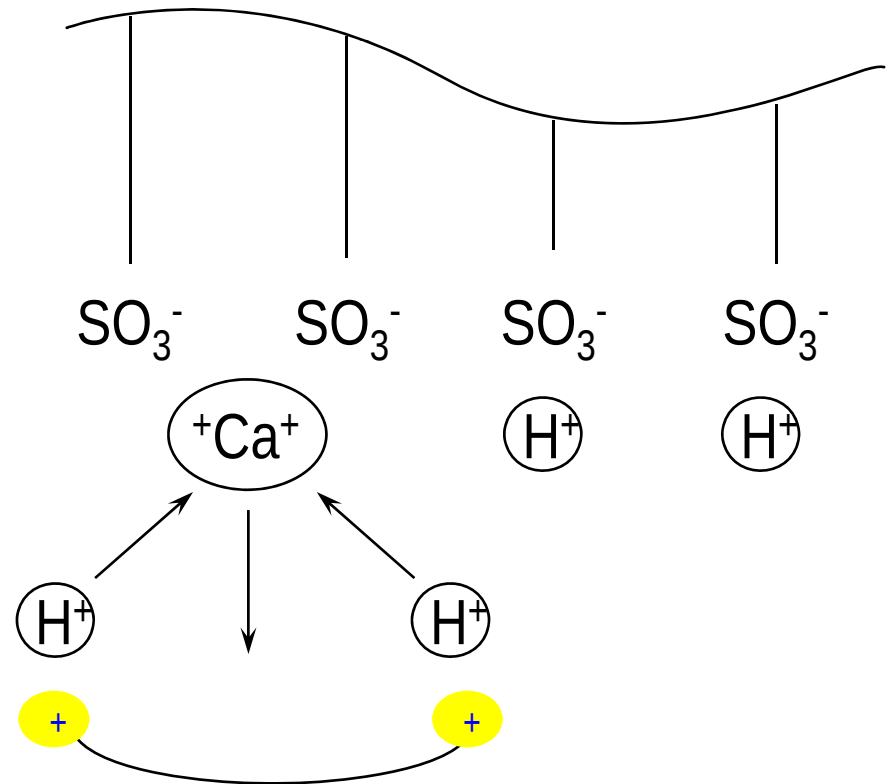
monovalenti kation

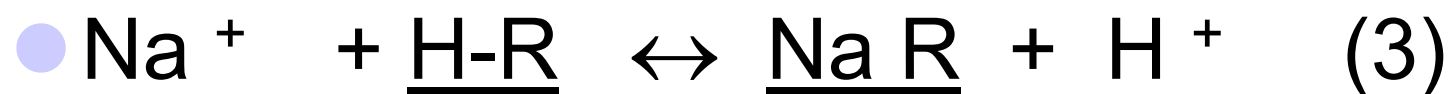
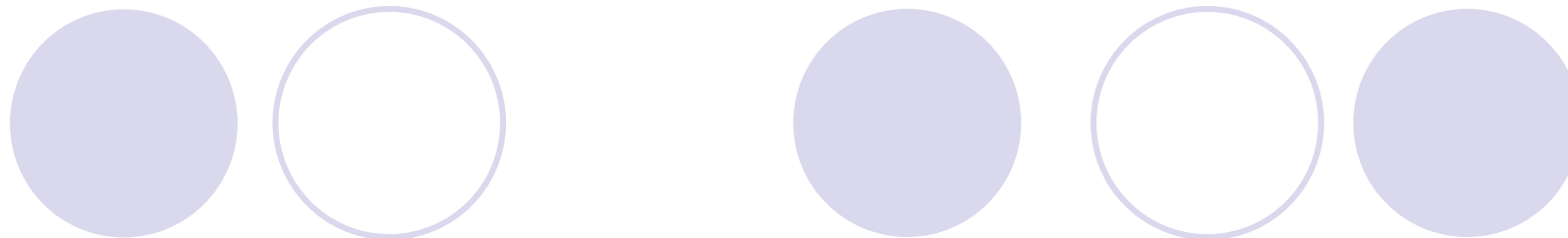
Polymer



divalenti kation

Polymer

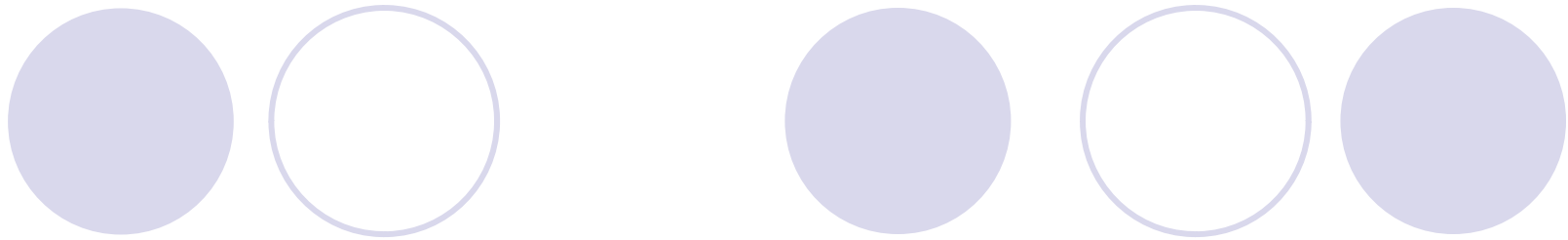




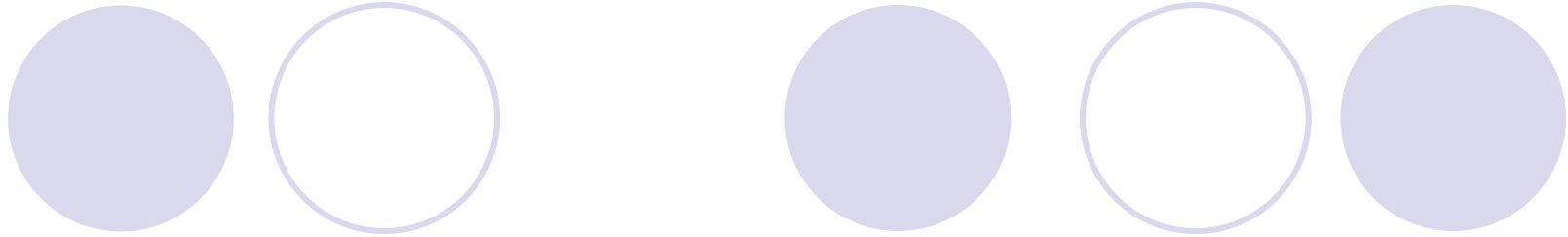
● $k' = \frac{t_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} - 1 \quad (4)$

1.MODELIRANJE KROMATOGRAFSKIH VELIČINA

- 1.1.Model linearne jakosti otapala
- Model linearne jakosti otapala (engl. *linear solvent strength model*; LSS model) prvi je i najjednostavniji teorijski model predviđanja vremena zadržavanja i u izvornom obliku izveden je za monokompetijske eluense¹⁵. Ovaj model, razvijen 1979. godine od strane Lloyd Snydera i suradnika^{14,17}, temelji se na linearnoj ovisnosti logaritma faktora zadržavanja i logaritma koncentracije kompeticijskog iona u eluensu
- Promotrimo ravnotežu procesa ionske izmjene dviju hipotetskih komponenti Am^- i Ex^- :



- Promotrimo ravnotežu procesa ionske izmjene dviju hipotetskih komponenti Am^- i Ex^- :
- $$A_M^{m-} + \frac{m}{x} E_S^{x-} \rightleftharpoons A_S^{m-} + \frac{m}{x} E_M^{x-}$$
- Neka ion Am^- predstavlja ispitivanu komponentu, dok je Ex^- kompeticijski ion iz eluensa. Prema zakonu o djelovanju masa²⁰ konstanta ravnoteže procesa njihove ionske izmjene bila bi:
- $$K_{A/E} = \frac{c_S(A^{m-}) \cdot c_M^{m/x}(E^{x-})}{c_M(A^{m-}) \cdot c_S^{m/x}(E^{x-})}$$
- U ionskoj kromatografiji ova konstanta naziva se *koeficijentom selektivnosti*.

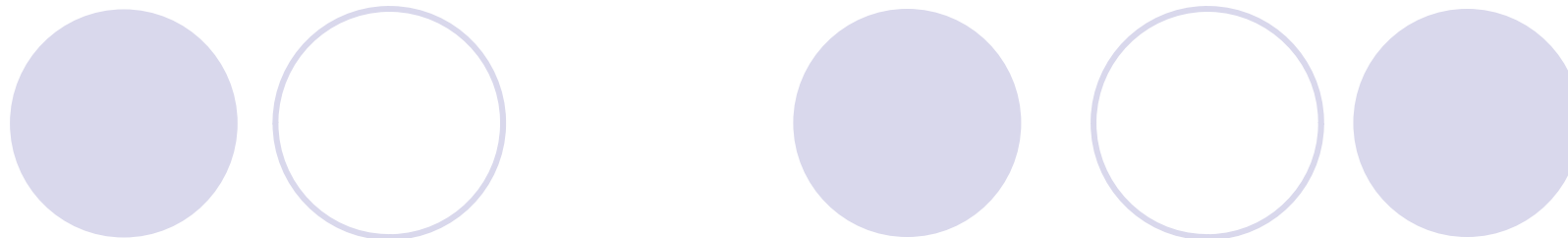


- Uzimajući u obzir da se koncentracija kompeticijskih iona vezanih na ionski izmjenjivač kolone može smatrati konstantnom i jednakom omjeru *kapaciteta proboja kolone, Q_B* , i nabojnog broja kompeticijskog iona, x , te uvrštavanjem jednadžbe u jednadžbu dobije se novi izraz za faktor zadržavanja:

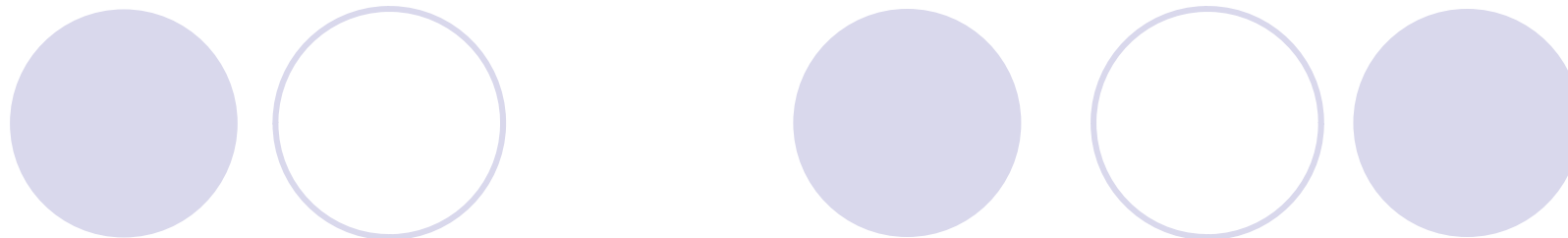
- $$k_A = \frac{V_S}{V_M} \cdot K_{A/E} \cdot \left(\frac{Q_B}{x} \right)^{\frac{m}{x}} \cdot c_M(E^{x-})^{-\frac{m}{x}}$$

- Logaritmiranjem izraz poprima sljedeći oblik:

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



- U izrazu koncentracija kompeticijskog iona u pokretnoj fazi jedini je promijenjivi dio, pa se stoga izraz može pojednostavljeno pisati:
- $\log k_A = C - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x-})$
- Veličina **C** sumarna je konstanta sviju konstantnih segmenata jednadžbe .
- S ciljem da se omogući primjena na polikomponentne eluense LSS model doživio je nekoliko modifikacija¹⁵.

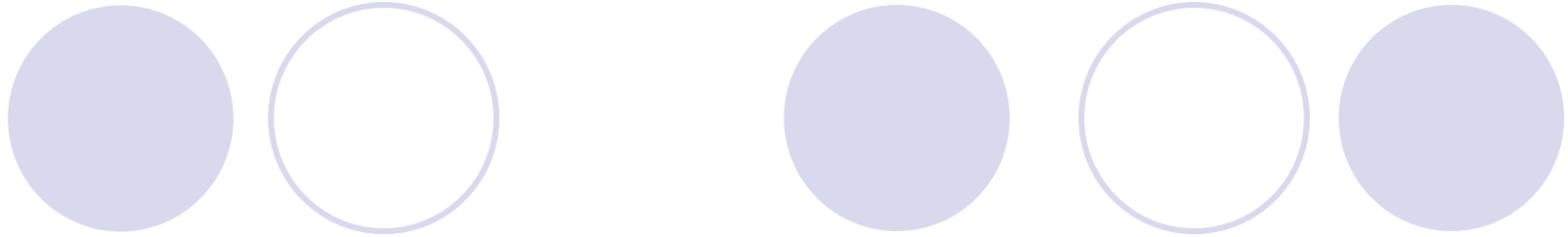


- 1.2. Hooverov model

- Ovaj model predložio je 1982. godine T. B. Hoove i za razliku od LSS modela primjenjiv je za polikomponentne eluense. Model uzima u obzir utjecaj svih komponenti eluensa na vrijeme zadržavanja. Za svaku komponentu eluensa eksperimentalno se određuje koeficijent selektivnosti odgovarajućeg ionsko izmjenjivačkog procesa

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

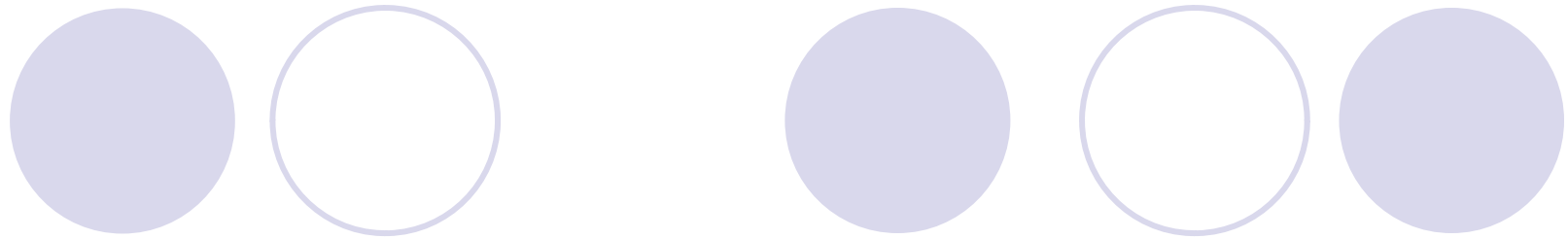
- Konačnih verzija Hooverova modela ovisn je o naboju broju analita, m .



- 1.3. Model dvokompetijskog eluensa

- Kao modifikaciju Hooverova modela, 1984. godine Janke i Pagenkopf uvode model dvokompetijskog eluensa (engl. *dual eluent species model*, DES). DES model pojednostavljuje Hooverov model utoliko što reducira broj parametara koje je potrebno eksperimentalno odrediti sa tri na dva. Rješenje jednačbe glasi:

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



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



1.4. Model multikompetijskog eluensa

Do danas najkompleksniji od svih teorijskih modela uveli su Hajós i suradnici 1995. godine^{16,27}. Model se naziva modelom multikompetijskog eluensa (engl. *multiple species eluent/analyte model*; MSEA) jer uzima u obzir interakcije svih tvari koje se nalaze u eluensu sa svim komponentama analita. U svakom sustavu u kojem se razdvajanje analita ispituje kroz široko pH područje, moguće su različite protonizacije komponenti analita. Samim time odnosi u ravnoteži ionske izmjene sustava postaju znatno kompleksniji, osobito ukoliko se upotrebljavaju i polikomponentni eluensi.



- Promotrimo ravnotežu ionske izmjene jednog od iona uzorka kompeticijskim ionima eluensa. Neka je u promatranom sustavu eluens **trokomponentna otopina** sastavljena od iona . Kemijska jednadžba reakcije ionske izmjene odabranog iona Am^- na nepokretnoj fazi opisana je izrazom a kapacitet nepokretne faze jednadžbom. Označimo udio ukupnog kapaciteta nepokretne faze koji zaposjedne **pojedini kompeticijski ion sa X_1 , X_2 , odnosno X_3** :
- Dobivena finalna verzija MSEA modela:
-

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

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



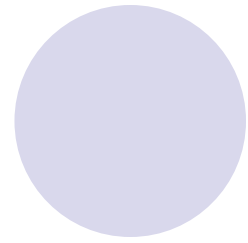
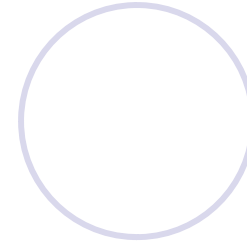
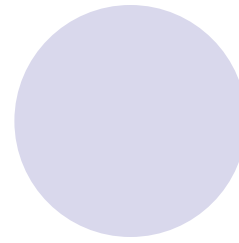
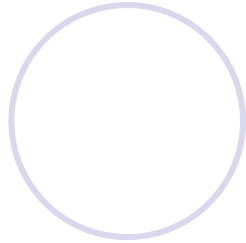
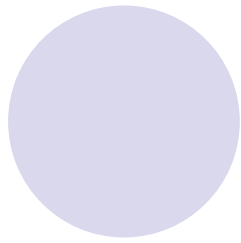
1.5. Kvantitativni odnosi strukture i vremena zadržavanja analita

- QSRR (engl. *quantitative structure-retention relationships*) modeliranje bavi se kvantitativnim odnosima strukture tvari i vremena zadržavanja. Ovakve modeli opisivali i primjenjivali su mnogi autori. Postupak modeliranja je sljedeći. Za odabrane strukturno definirane veličine provode se kromatografske analize smjese tvari pri predefiniranim uvjetima analize. Na osnovu dobivenih podataka izvodi se općenita QSRR jednačba, važeća za spomenute uvjete. Korištenjem jednačbe, za promatrani sustav kolona/eluens mogu se predvidjeti vremena zadržavanja bilo koje strukturno definirane komponente. Iako se QSRR pristupom dobivaju samo aproksimativna predviđanja, njegova pozitivna strana jest u tome što su na koloni koja je jednom okarakterizirana moguća predviđanja za svaki strukturno definirani analit.



1.6. Model krajnjih točaka

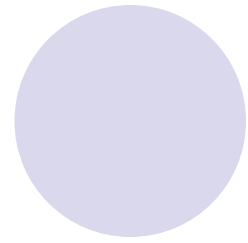
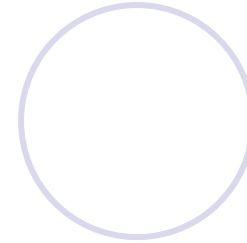
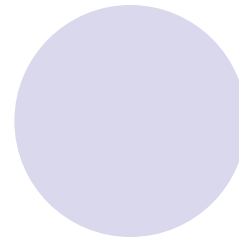
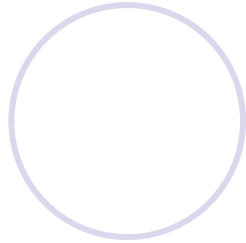
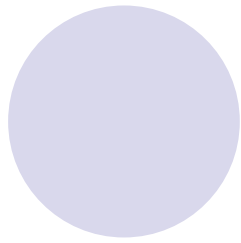
- 1.6. Model krajnjih točaka
- Model krajnjih točaka (eng. *end points model*, EP) osmislili su Madden i Haddad 1998. godine^{26,27}. Iako je model izveden na temelju LSS modela, modificiran je na takav način da se ne oslanja na teorijski izvedene vrijednosti nagiba izokratičnog modela već čisto na eksperimentalno određene vrijednosti. Stoga u svojoj suštini model krajnjih točaka nije teorijski već **empirijski model**.
- EP je **multikompeticijski model** za čije je rješavanje eksperimentalnu domenu potrebno razdijeliti na dva područja; područje visokih i područje niskih koncentracija eluensa. Za svako područje eksperimentalno je potrebno odrediti vremena zadržavanja komponenti analita u njegovim rubnim točkama.
- Pretpostavimo da imamo dvokompeticijski eluens sastavljen od iona i i j . Ovisnost faktora zadržavanja komponente i o koncentraciji jednog od kompeticijskih iona, j , u skladu sa LSS modelom, može se pisati kao:



- $\log k_A = C_1 + S_1 \log c(E_1^{x-})$
- $\log k_A = C_2 + S_2 \log c(E_1^{x-})$
- gdje izraz opisuje ovisnost faktora zadržavanja pri višim C_1 , a izraz pri nižim koncentracijama kompeticijskog iona. Veličine C_1 , C_2 , S_1 i S_2 predstavljaju konstante modela.
-
- Uvažavajući sve do sada navedene postavke konačna verzija EP modela može se pisati kao:
- $$\log k_A = D_1 + D_2 \cdot [c(E_1^{x-}) + c(E_2^{y-})] + \{D_3 + D_4 \cdot [c(E_1^{x-}) + c(E_2^{y-})]\} \cdot \log c(E_1^{x-})$$

1.7. Model Noviča i suradnika⁷

- 1.7. Model Noviča i suradnika⁷
- Sukladno teoriji odsječaka kolona se i ovdje promatra kao cjelina sastavljena od niza zasebnih, jednako dugih segmenata (teorijskih odsječaka), unutar kojih dolazi do uspostavljanja ravnoteže ionske izmjene između analita i nepokretne faze kolone. Neprekinuti protok eluensa prikazuje se pak nizom odvojenih procesa prijenosa tvari. Iznos svakog prijenosa eluensa ovisi o volumnom udjelu pokretne faze sadržanom u pojedinom odsječku kolone. Sam model temelji se na proračunima ravnoteže ionske izmjene kako komponenti analita, tako i kompeticijskih iona unutar svakog od odsječaka, pa se tako za svaki prijenos eluensa rade proračuni ravnoteže u svim segmentima kolone. Za dobivanje konačnog profila vremena zadržavanja analita promatra se ravnoteža ionske izmjene u posljednjem segmentu kolone.



●
$$c_M^2(A^-)_z(K_{AE}-1)V_M^2 + c_M(A^-)_z[(K_{AE}-1)V_S Q_{Bz} + (2-K_{AE})\beta + \gamma]V_M - \beta(\beta + \gamma - V_S Q_{Bz}) = 0$$

- rješavanjem koje se lako dolazi do ravnotežne koncentracije analita u pokretnoj fazi

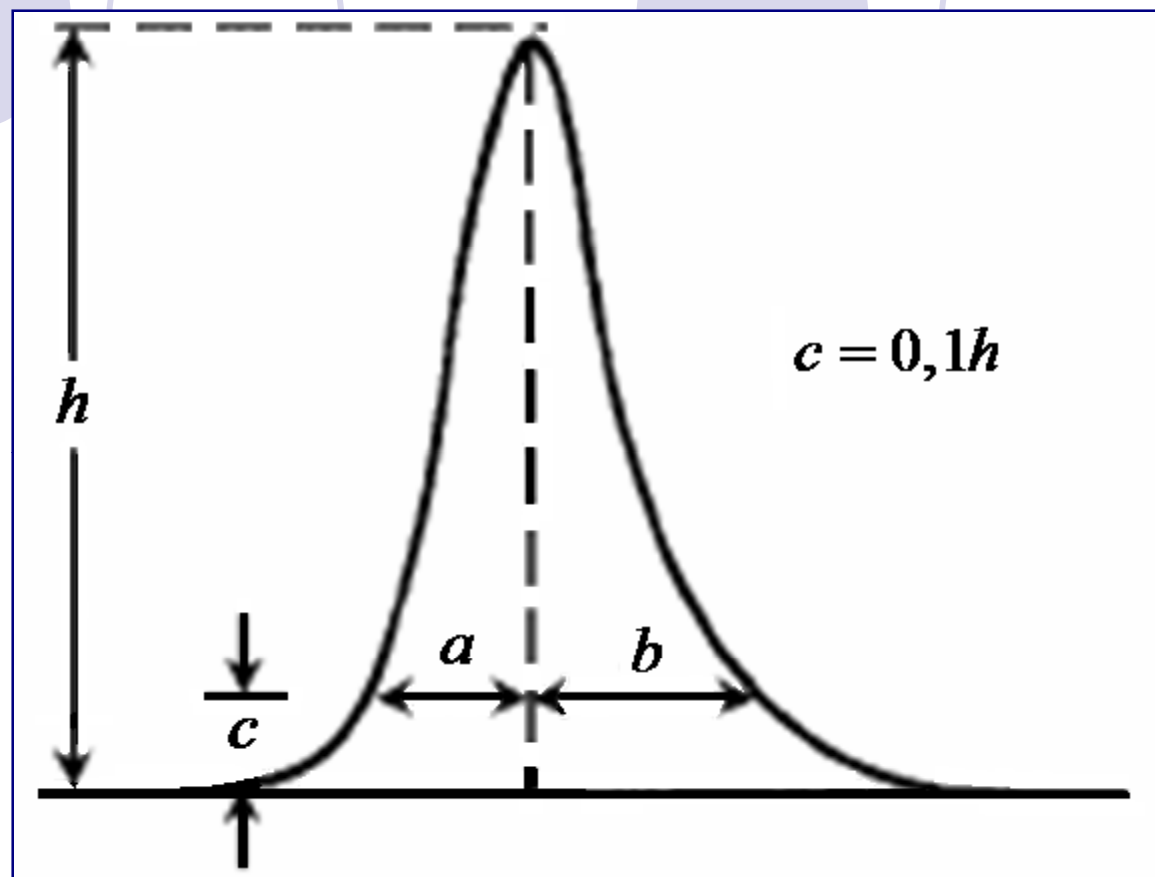
2.MODELIRANJE OBLIKA KROMATOGRFSKE KRIVULJE

-zabrebački model

- Kromatografska krivulja može se opisati matematičkom funkcijom koja uzima u obzir najmanje tri parametra pika: položaj pika, širinu njegove zone i njegovu asimetričnost²⁸⁻³³. Tri parametra zahtijevaju poznavanje najmanje triju točaka krivulje za njeno uspješno opisivanje.

Za potrebe proračuna odabrano je da to budu:

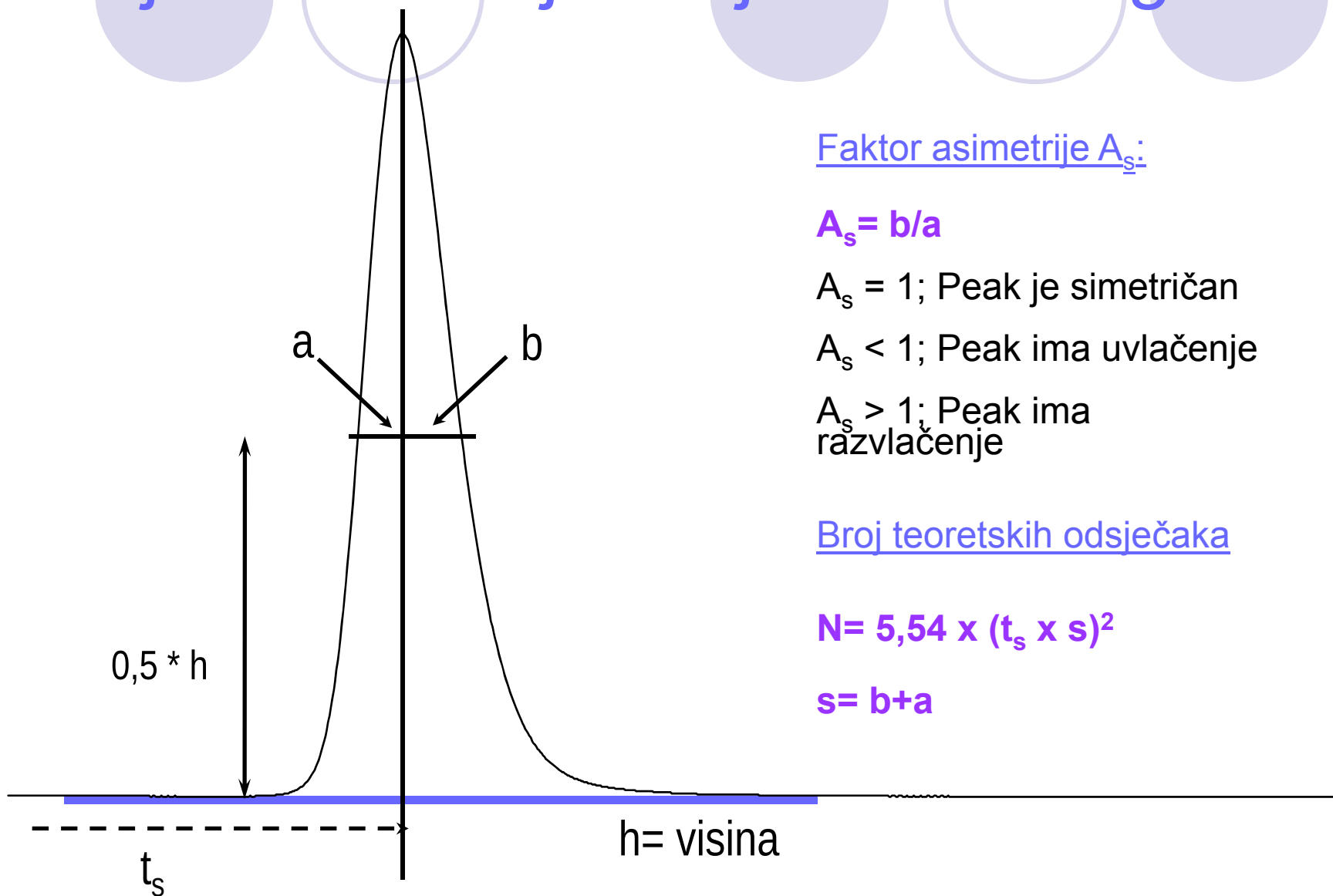
- vrijeme zadržavanja maksimuma kromatografske krivulje, t_R
- vrijeme zadržavanja na polovici visine kromatografske krivulje s lijeve strane maksimuma, $t_{0,5L}$
- vrijeme zadržavanja na polovici visine kromatografske krivulje s desne strane maksimuma, $t_{0,5D}$



Slika 3. Asimetrija kromatografskog pika

$$A_s = \frac{b}{a}$$

Koje informacije “daje” kromatogram?



Faktor asimetrije A_s :

$$A_s = b/a$$

$A_s = 1$; Peak je simetričan

$A_s < 1$; Peak ima uvlačenje

$A_s > 1$; Peak ima
razvlačenje

Broj teoretskih odsječaka

$$N = 5,54 \times (t_s \times s)^2$$

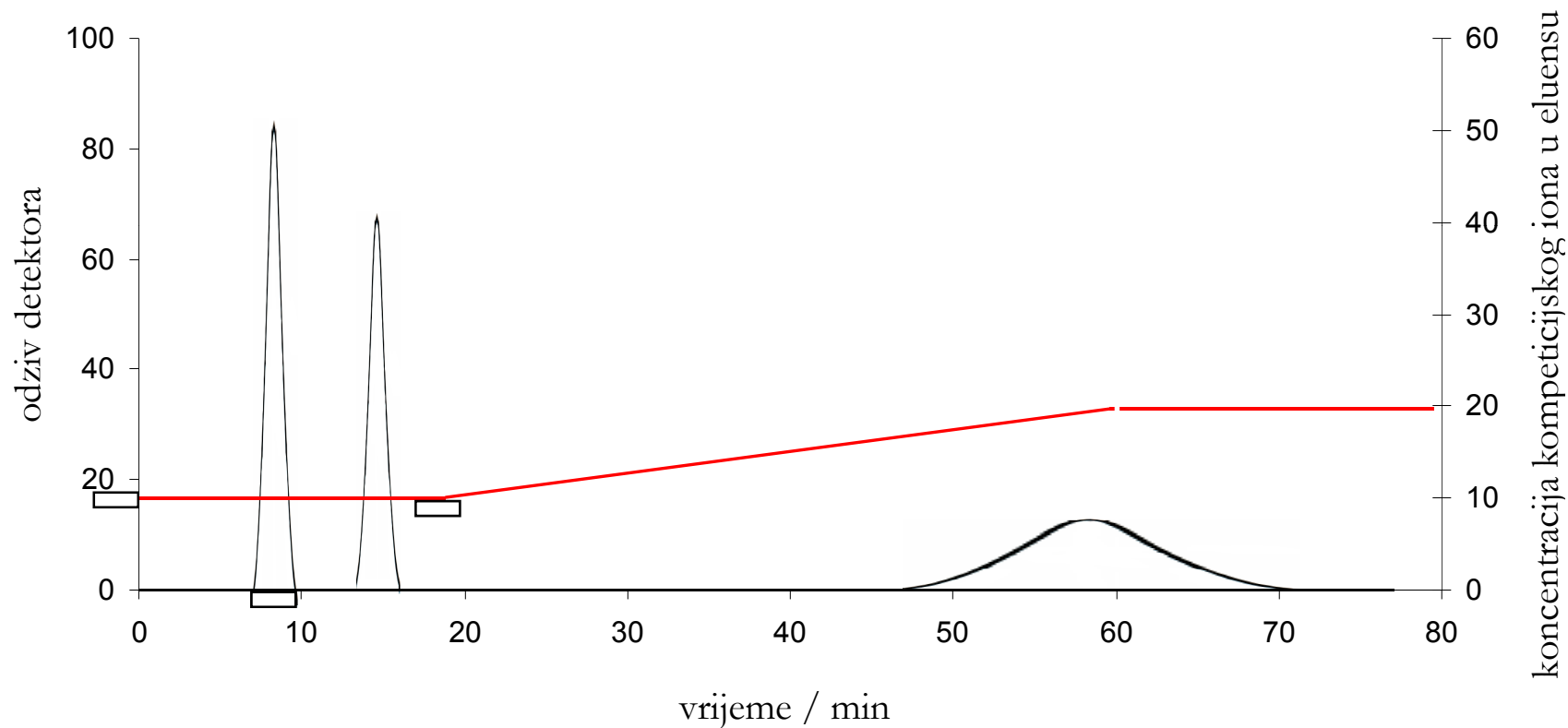
$$s = b + a$$



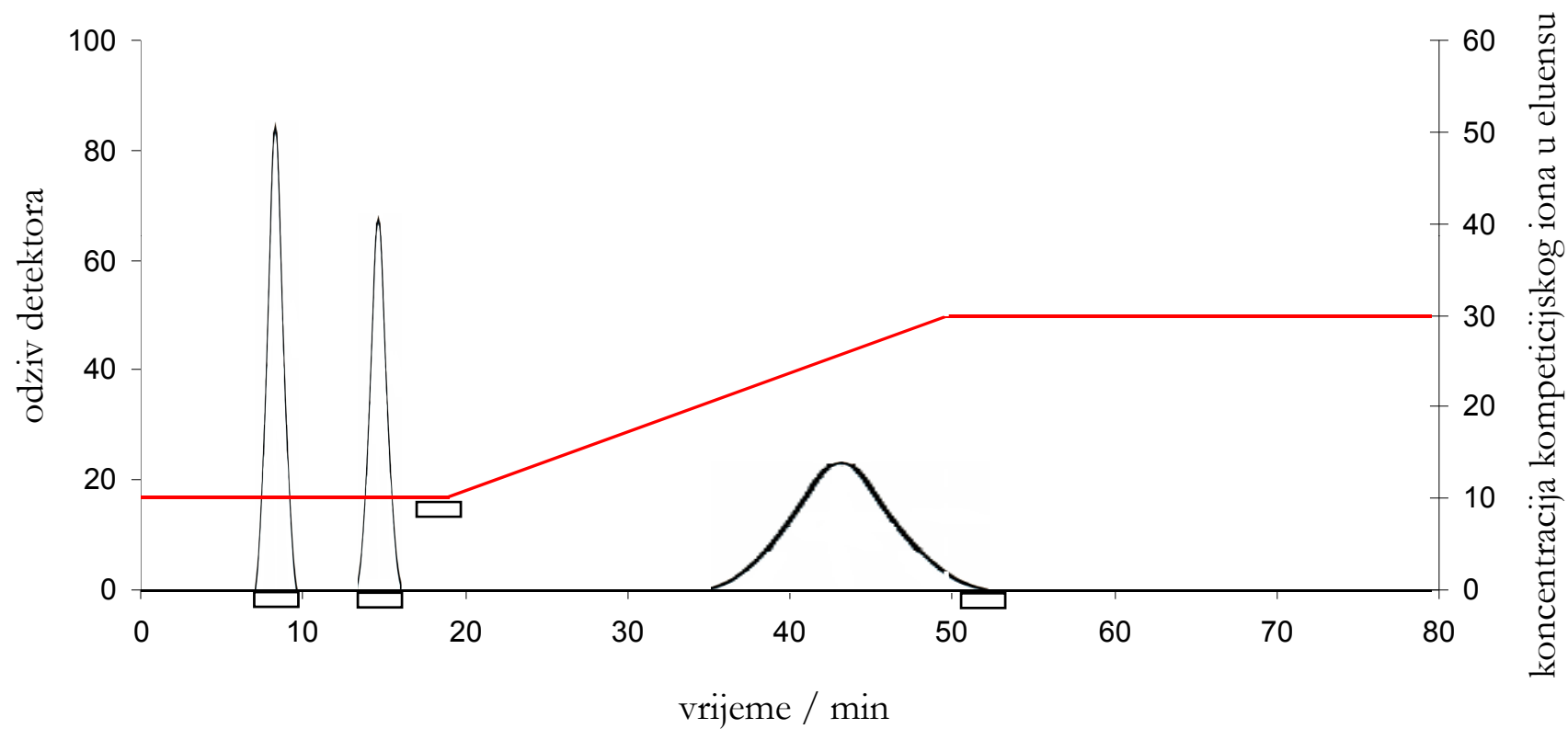
- Kao četvrti parametar dodana je **površina pika**, čime je dobivena poveznica s koncentracijom ispitivane tvari. Za parametar površine pretpostavlja se da ostaje konstantan neovisno o uvjetima analize. Sva četiri potrebna parametra očitana su iz izokratičnih mjerenja.
- Zbog svoje jednostavnosti primjene, kao funkcija za opisivanje kromatografske krivulje odabrana je poopćena logistička funkcija čiji se diferencijalni oblik prikazuje jednađbom:

$$f(t) = \frac{C}{B} \cdot \frac{e^{\frac{A-t}{B}}}{\left(1 + e^{\frac{A-t}{B}}\right)^{C+1}}$$

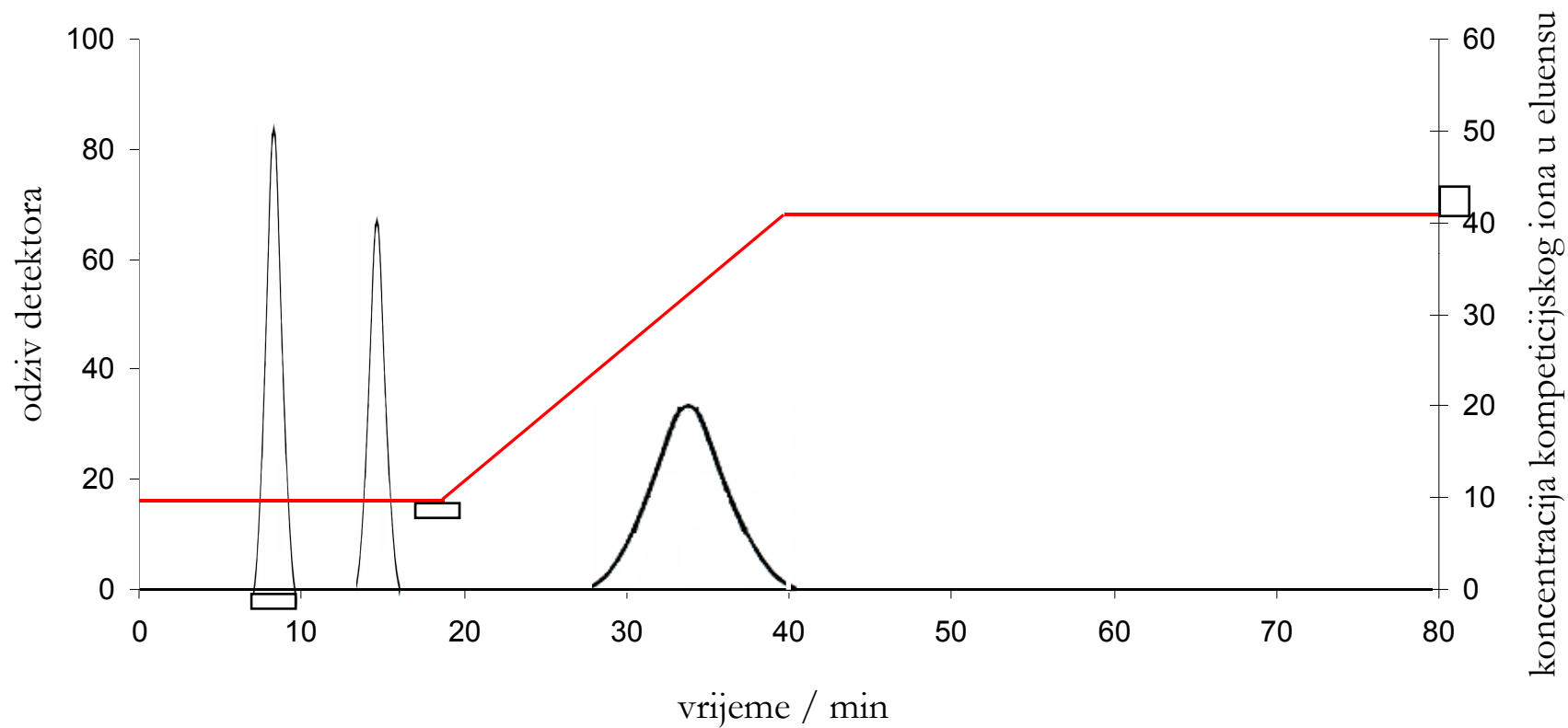
Shema razdvajanja na kromatografskoj koloni pri gradijentnoj eluciji



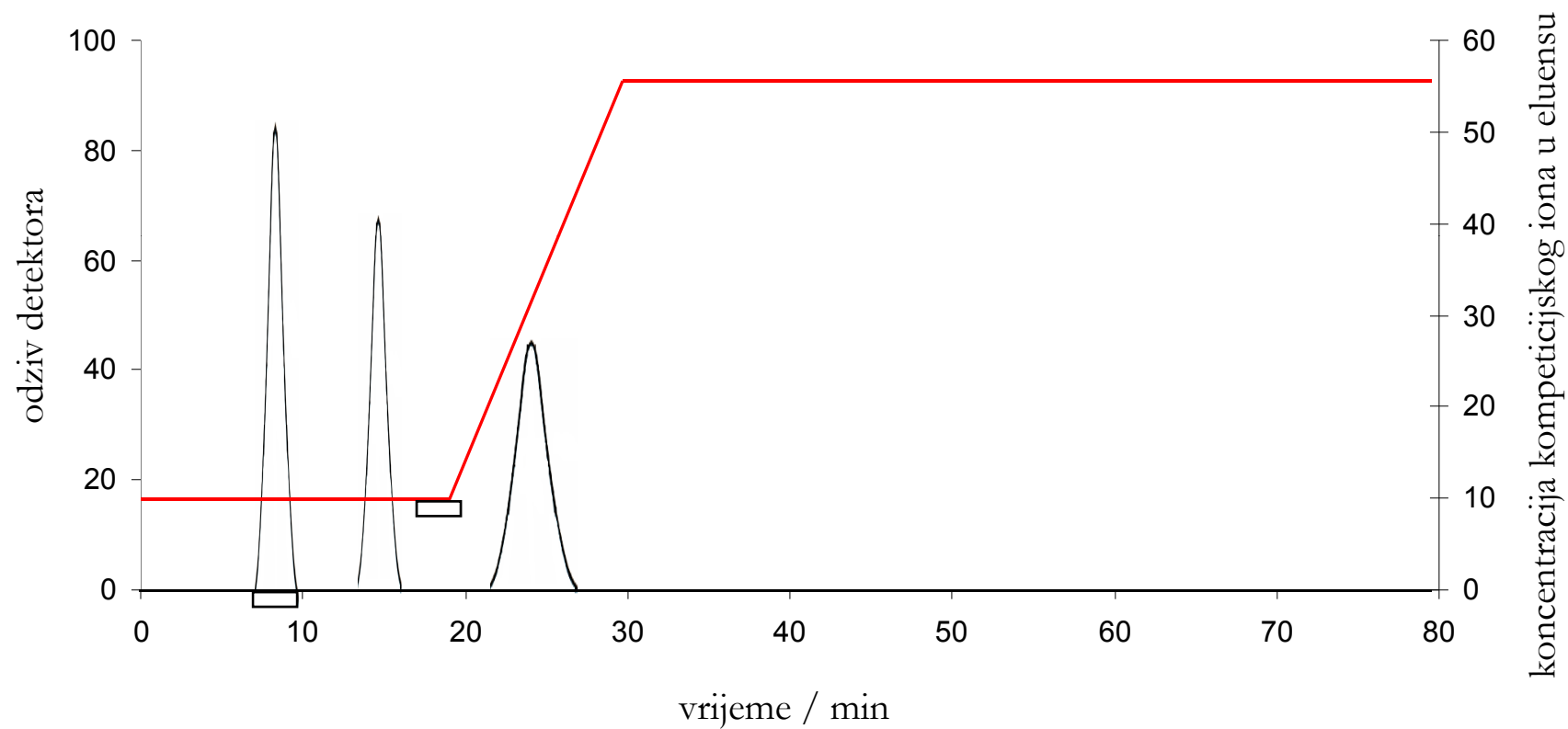
Shema razdvajanja na kromatografskoj koloni

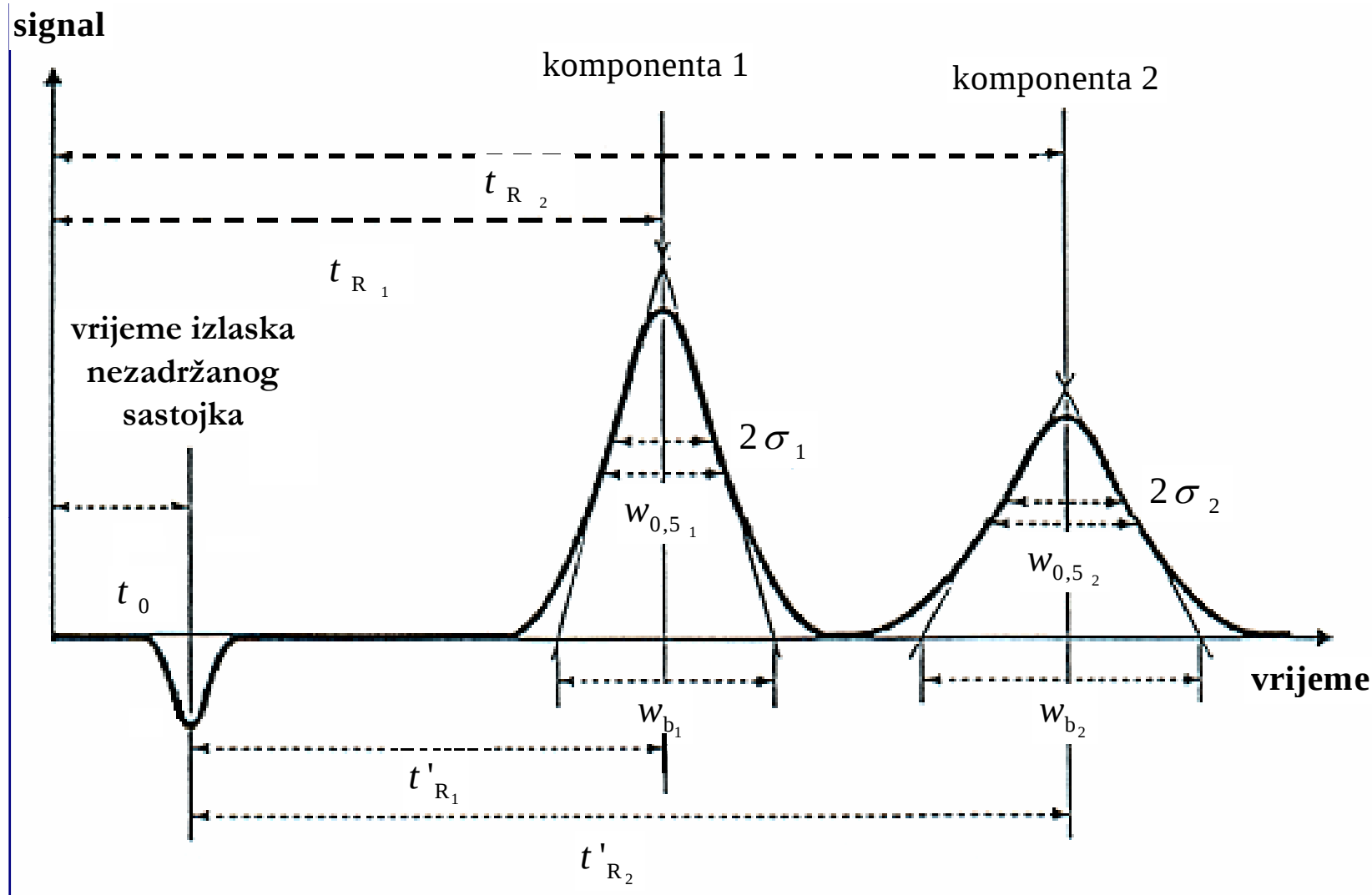


Shema razdvajanja na kromatografskoj koloni pri gradijentnoj eluciji



Shema razdvajanja na kromatografskoj koloni pri gradijentnoj eluciji



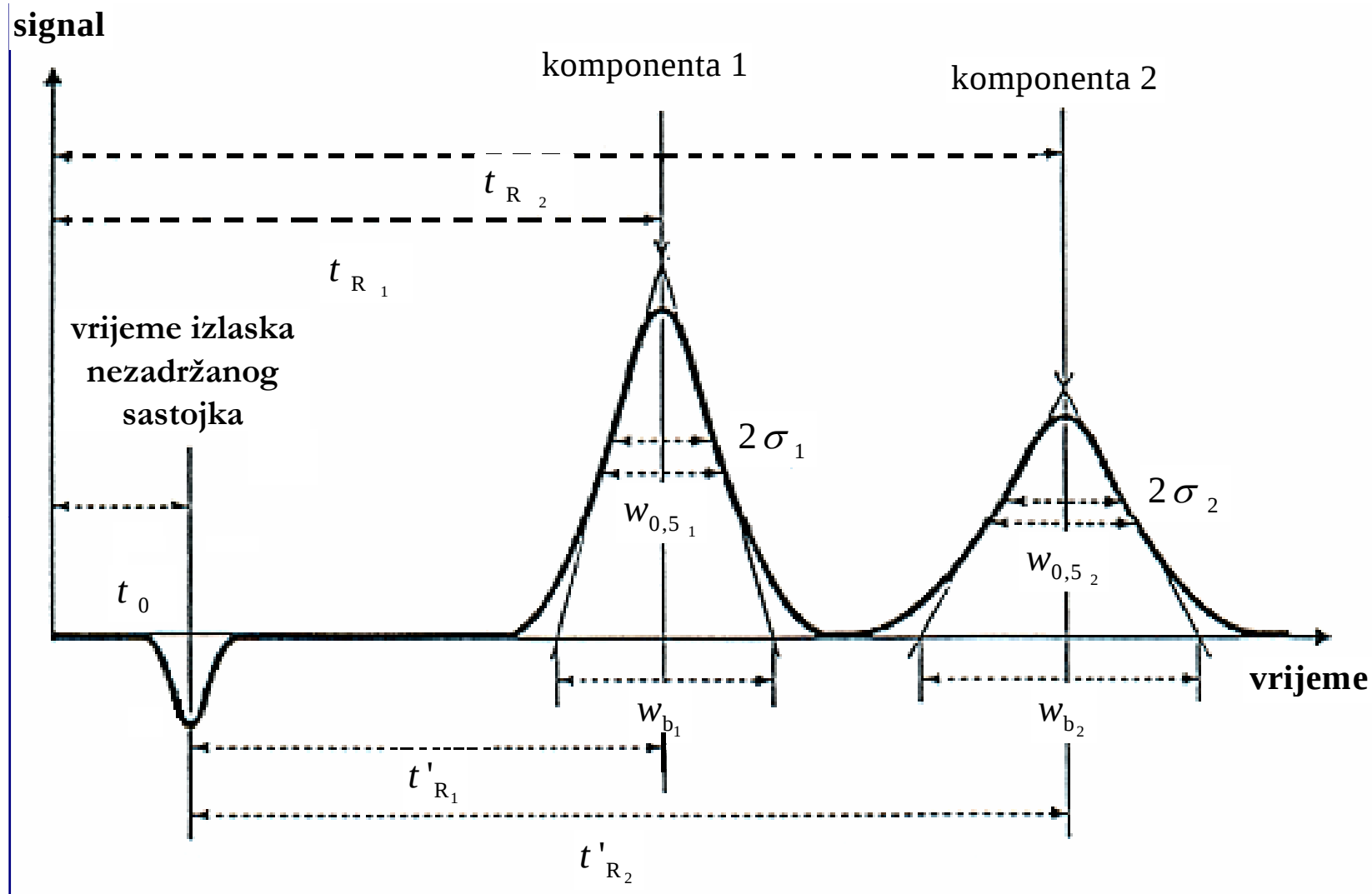


Slika 2. Shema odziva kromatografske analize s najznačenim karakterističnim parametrima

Za Gaussovu krivulju vrijedi:

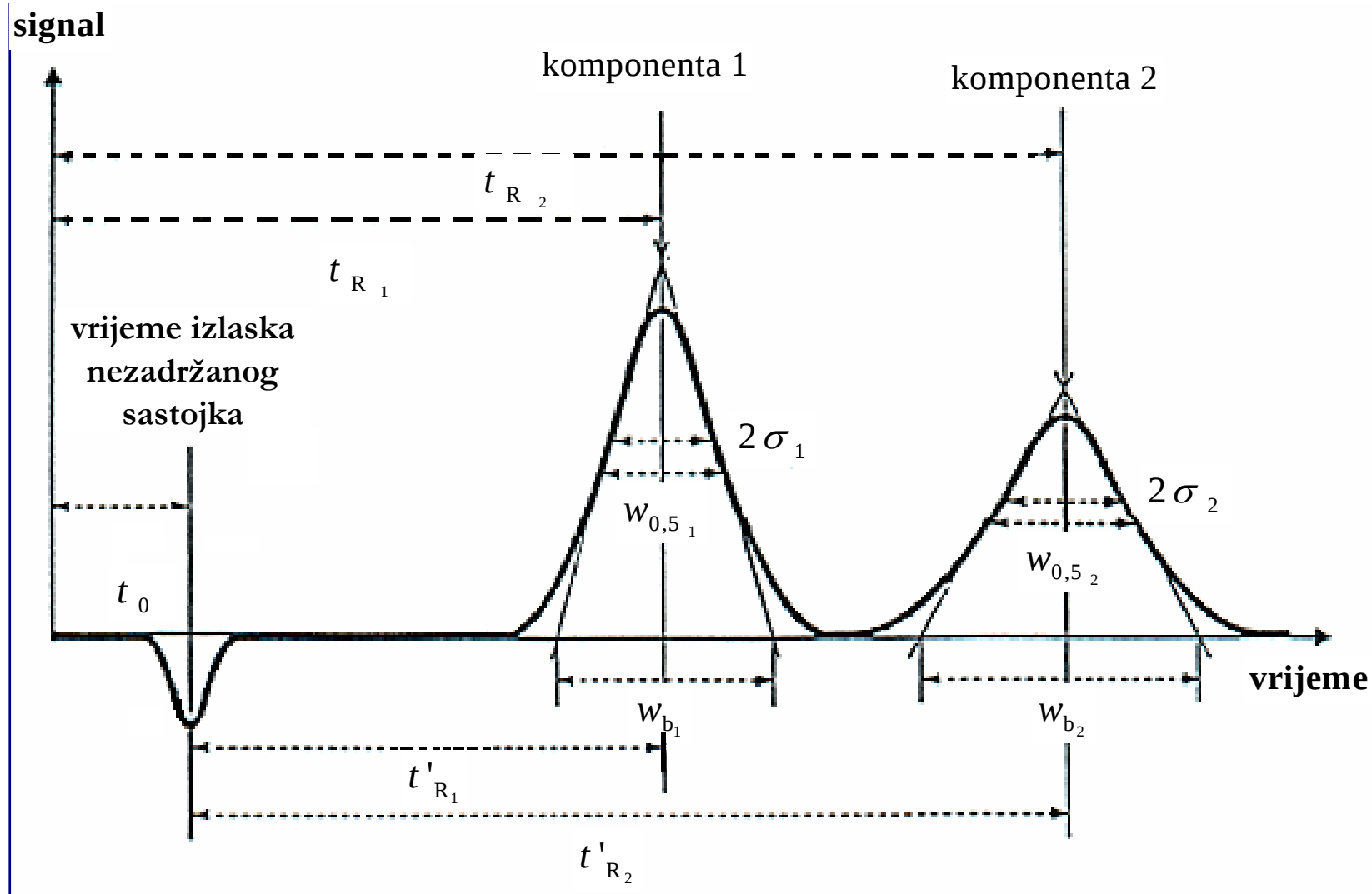
$$w_b = 4\sigma$$

$$w_{0,5} = 2,355\sigma$$



Selektivnost:

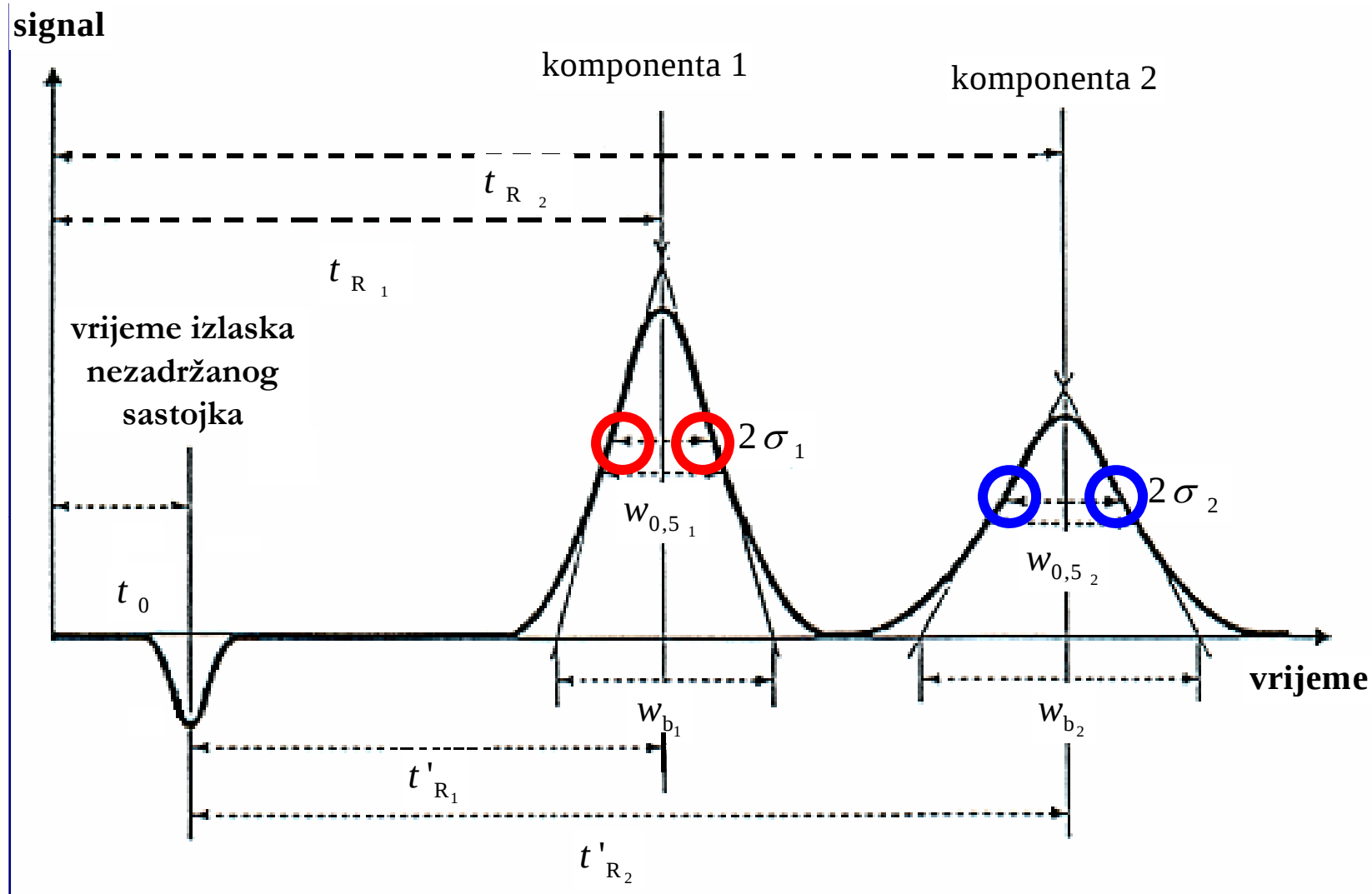
$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{(t_{R_2} - t_0)}{(t_{R_1} - t_0)}$$



Broj teoretskih odsječaka⁽¹⁾:

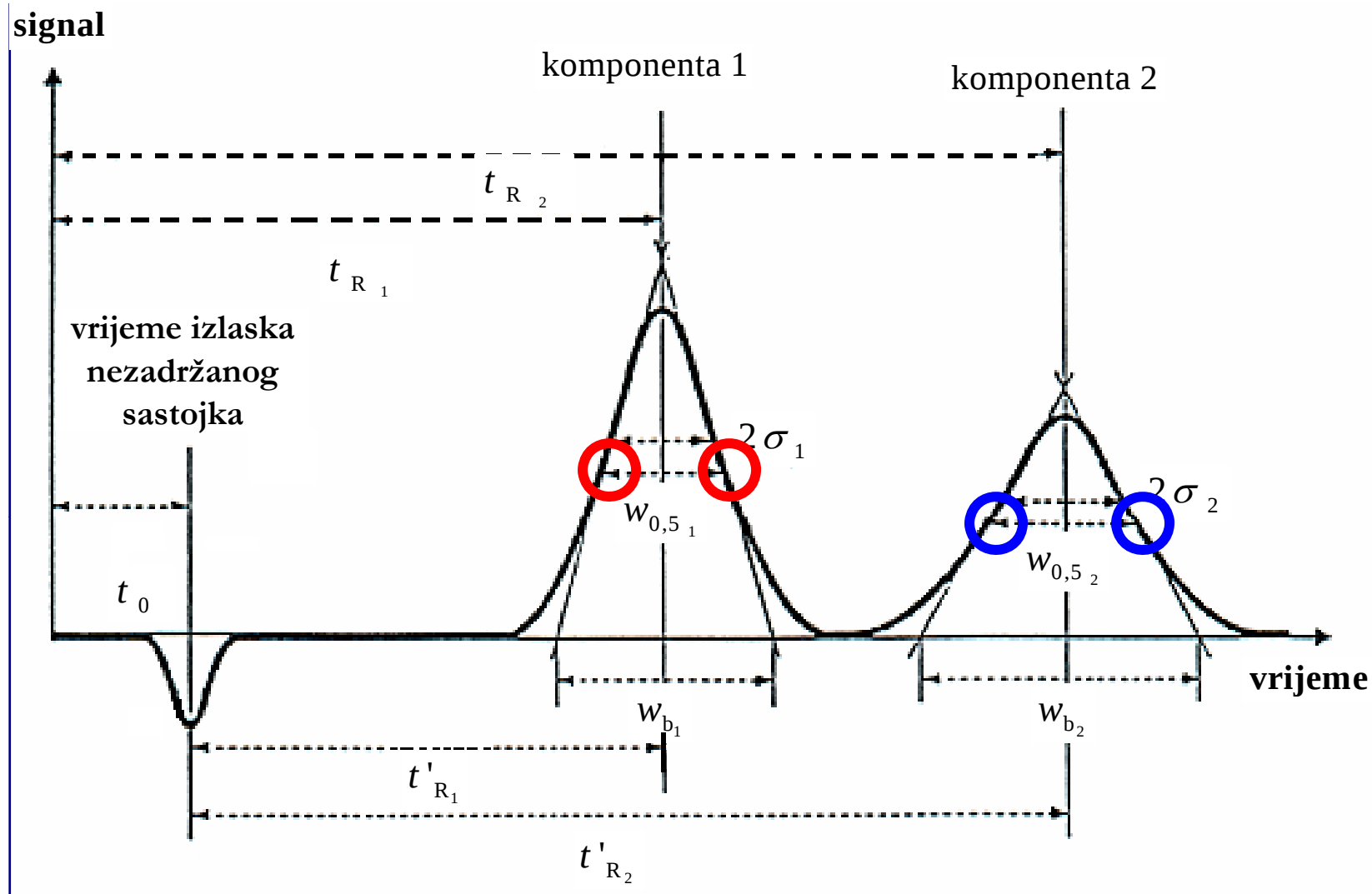
$$N = \left(\frac{t'_R}{\sigma} \right) = 5,54 \cdot \left(\frac{t'_R}{w_{0,5}} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2$$

1) A.Braithwaite, F.J.Smith, *Chromatographic Methods*, 5th Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.



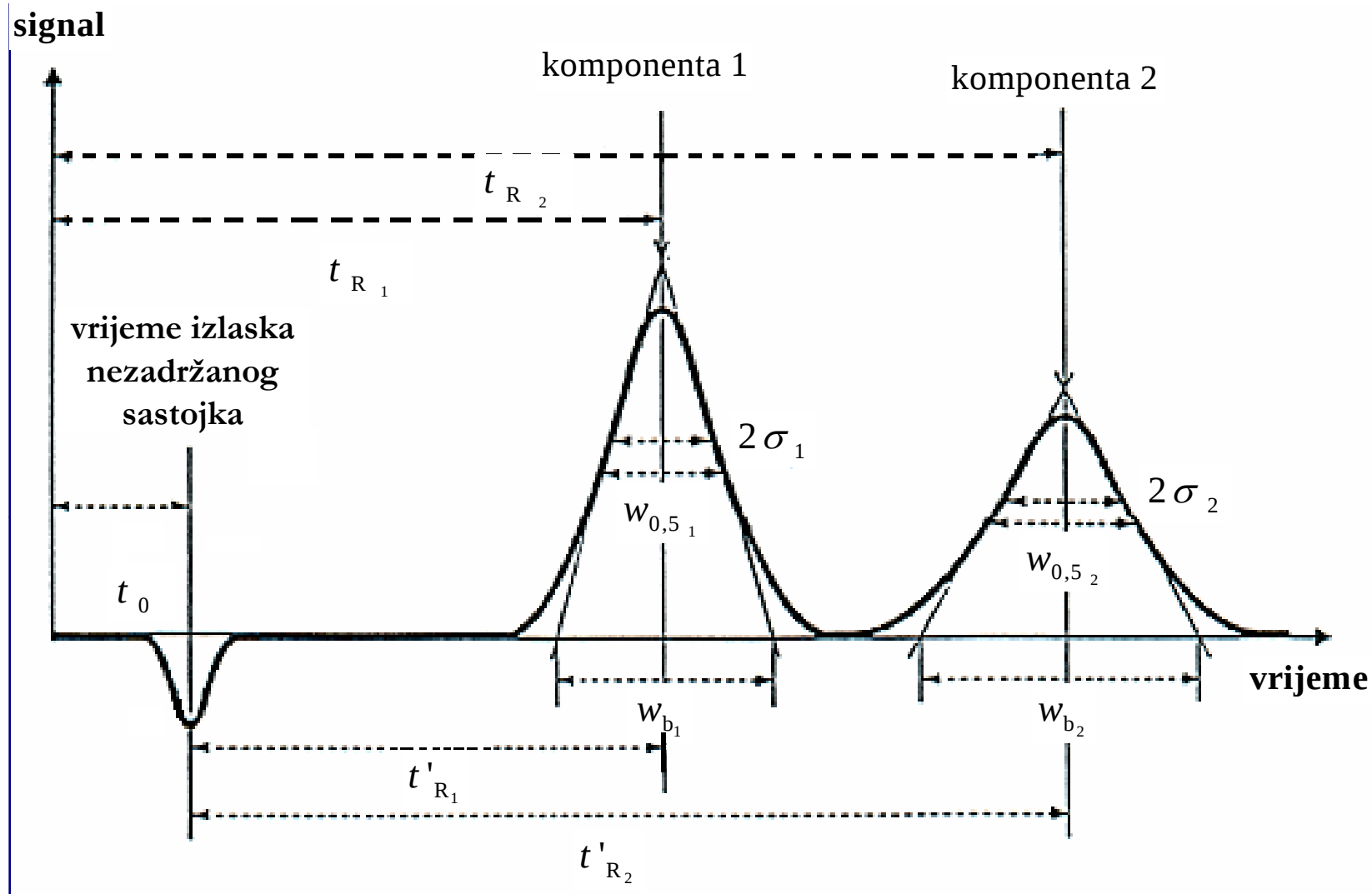
Razlučivanje⁽¹⁾:

$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{2(\sigma_2 + \sigma_1)}$$



Razlučivanje⁽¹⁾:

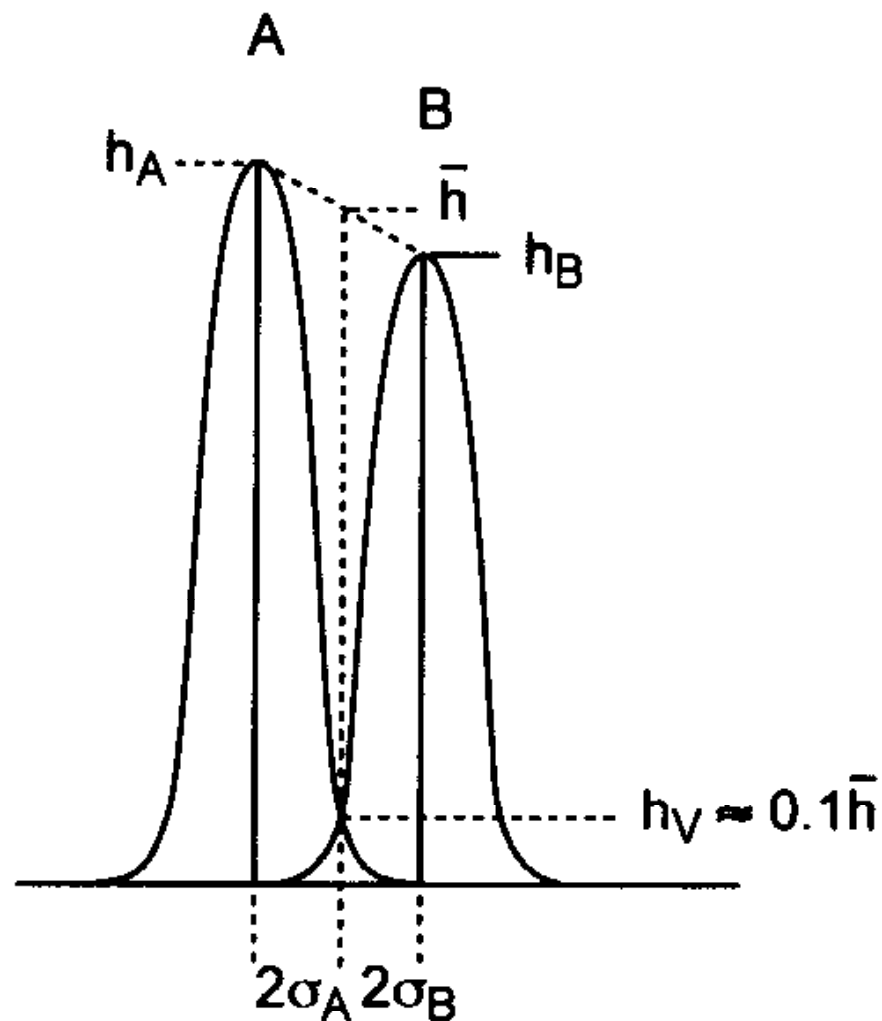
$$R_S = 1,18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{0,5_1} + w_{0,5_2}}$$



Razlučivanje⁽¹⁾:

$$R_s = \frac{1}{2} \sqrt{N} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{(\alpha + 1)} \cdot \left(\frac{k'}{k' + 1} \right); \quad k' = \frac{k_1 + k_2}{2}$$

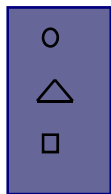
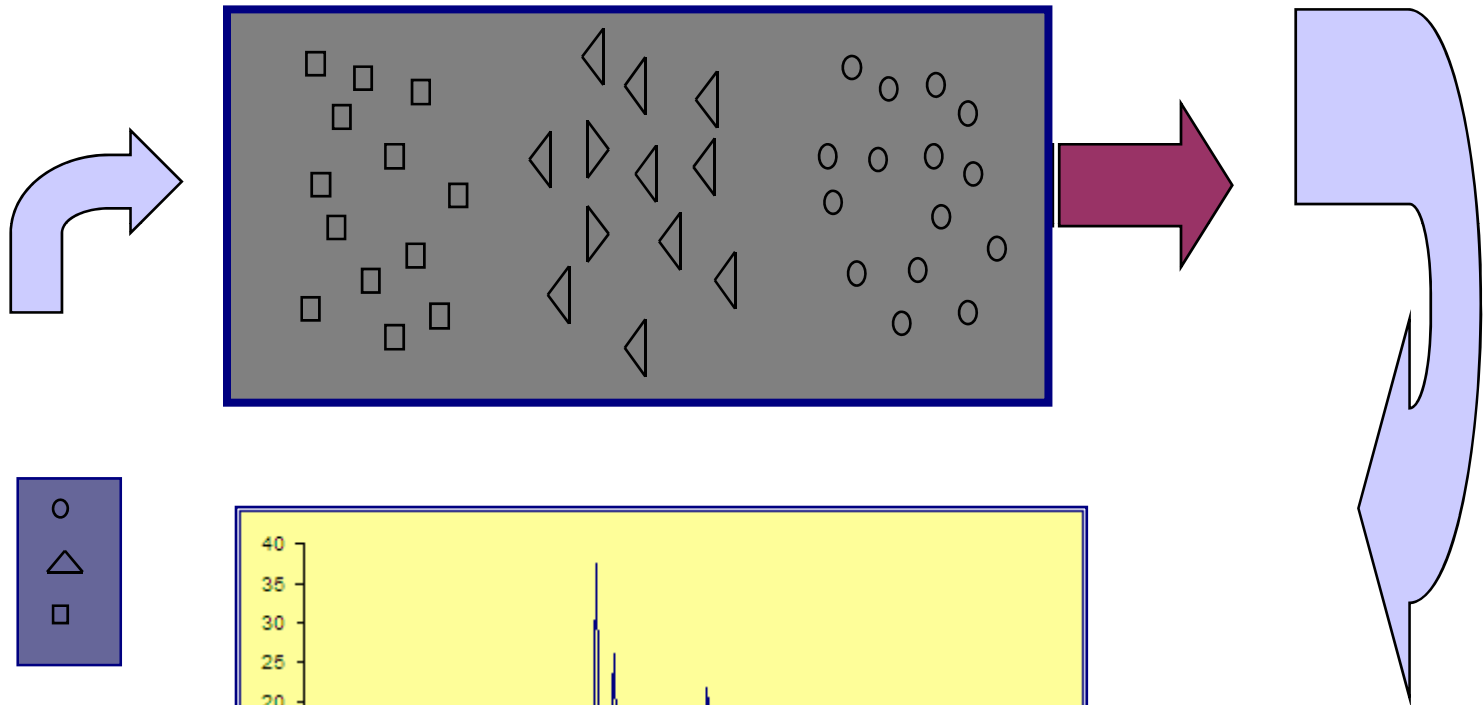
1) C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, Elsevier, New York, 1991.



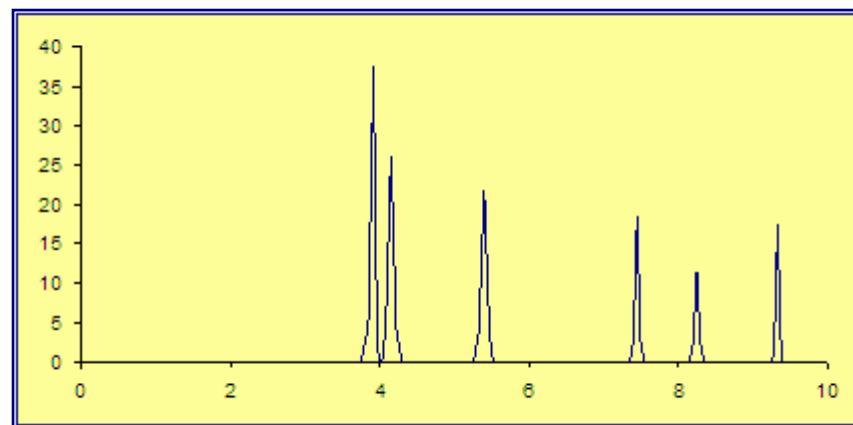
Razlučivanje⁽¹⁾:

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

Eksperimentalni dio



otopina



OPTIMIZACIJA

Treba postići:

- zadovoljavajuće razdvajanje ($R_s > 1,5$)⁽¹⁾
- zadovoljavajuću asimetriju ($0,9 \leq A_s \leq 1,2$)⁽²⁾
- što kraće trajanje analize
- što veću osjetljivost metode
- smanjenje granice kvantifikacije i detekcije

Mogućnost variranja:

- tipa kolone (izbor stacionarne faze)
- tipa eluensa
- koncentracije kompeticijskih iona u eluensu
- protoka eluensa
- temperature
- tipa detektora
- količine injektiranog uzorka

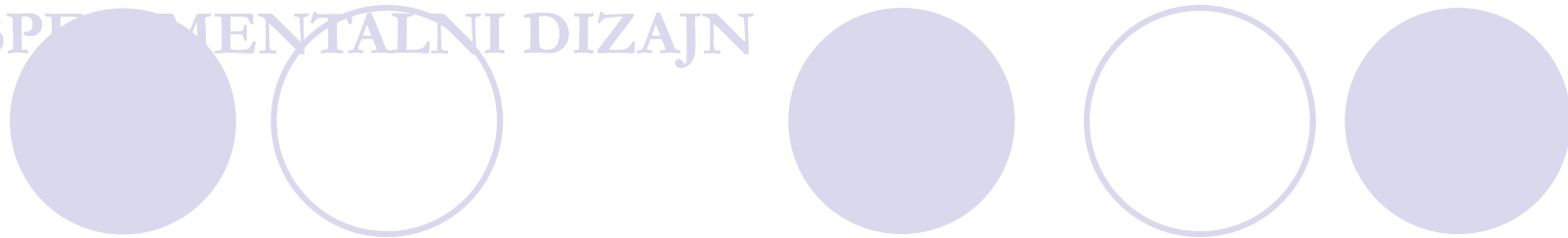
1) C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, Elsevier, New York, 1991.

2) J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 3rd Ed., Wiley, Weinheim, 2004.



OPTIMIZACIJSKI PROCES

- potrebno provesti niz eksperimenata
 - eksperimenti pod točno definiranim uvjetima
 - EKSPERIMENTALNI DIZAJN
- matematičkim izrazom opisati ovisnost vremena zadržavanja parametrima optimiranja
- pronalazak odgovarajućeg modela glavni problem optimizacije

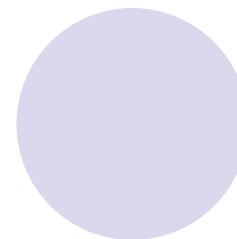
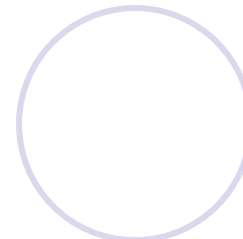
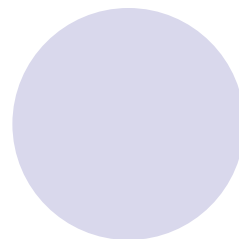
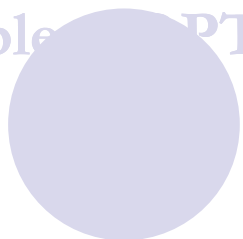


dvije mogućnosti⁽¹⁾:

1. simultani dizajn (*simultaneous design*)
2. dizajn unutar odgovarajuće sekvence
(*sequential design*)

1) D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

Problem OPTIMIZACIJE!!!



1. SIMULTANI DIZAJN

- velik broj eksperimenata unutar cijele domene rada
- opisivanje krivulje vremena zadržavanja odgovarajućim matematičkim izrazom
- ekstrem izraza daje optimalne uvjete kromatografske analize

Problem OPTIMIZACIJE!!!

- 2.DIZAJN UNUTAR ODGOVARAJUĆE SEKVENCE

- mali broj eksperimenata unutar domene rada
- dobiveni rezultati usmjeravaju ka intervalu unutar kojeg bi se trebali nalaziti optimalni uvjeti analize (ciljano približavanje optimalni uvjetima)
- ponavljanje postupka unutar dobivenog intervala

1.

1. Model predviđanja vremena zadržavanja gradijentne elucije na temelju izokratičnih podataka

- potreban mali broj podataka (5-10, teoretski 2 dostatno)
- eksperimentalni podaci za gradijentnu retenciju potrebni samo za provjeru modela

Izokratični polinomni model:

$$\log k = a_0 + a_1 \log c_{(KOH)} + a_2 \log^2 c_{(KOH)}$$

-polinomna ovisnost $k = f(c)$

- adekvatna ili neadekvatna aproksimacija? →
unošenje sustavne pogreške (?)

$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_g - t_0) - t_i} = \frac{I_{0,i+1} - I_{0,i}}{t_{i+1} - t_i}$$

$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_g - t_0) - t_i} = \frac{I_{i,i+1}}{t_{i+1} - t_i} = \frac{1}{k(c)_{i,i+1}}$$

$$t_g = t_0 + t_i + (t_0 - I_{0,i})k(c)_{i,i+1}$$

Razvoj gradijentnog modela⁽¹⁾:

$$k[c] = \frac{t_g - t_0}{t_0}$$

$$t_0 = \frac{1}{k[c]} \{t_g - t_0\}$$

$$t_0 = \frac{1}{k[c]} \{ (t_g - t_0) - (t_0 - t_0) \}$$

$$t_0 = \frac{1}{k[c]} \int_{t_0 - t_0}^{t_g - t_0} d(t - t_0) = \frac{1}{k[c]} \int_0^{t_g - t_0} dt$$

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k[c(t)]}$$

1) T. Bolanča, Š. Cerjan-Stefanović, M. Luša, M. Rogošić, Š. Ukić, *J. Chrom. A* **1121** (2006) 228.

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k[c(t)]}$$

$$t_0 = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k[c(t)]} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k[c(t)]} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k[c(t)]} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k[c(t)]}$$

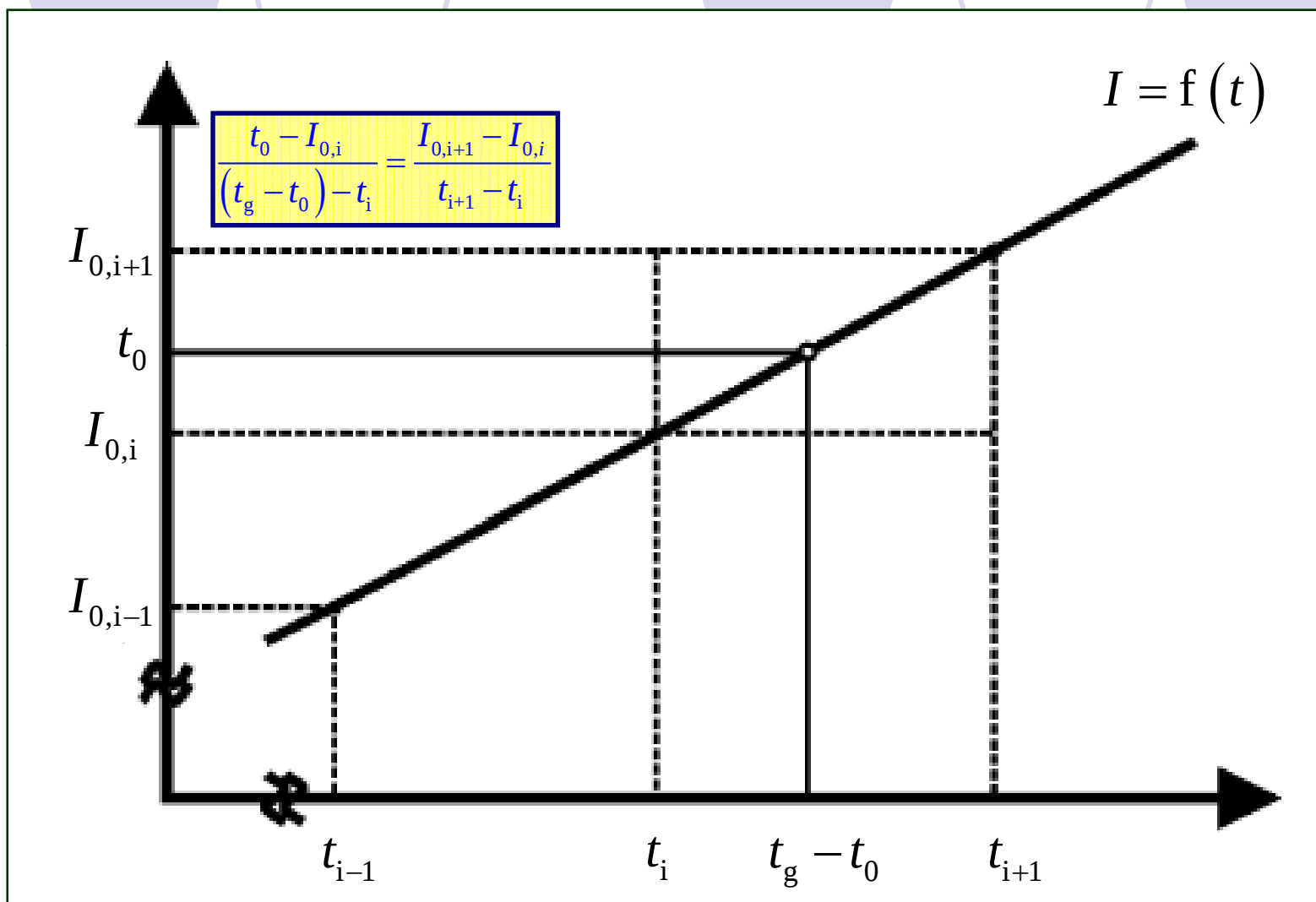
$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} = I_{0,i} + I_{i,i+1} = I_{0,i+1}$$

$$k(c)_{i,i+1} = \frac{k[c(t_i)] + k[c(t_{i+1})]}{2}$$

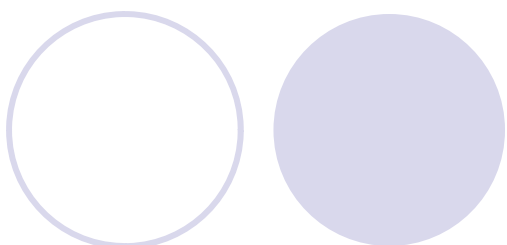
$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_g - t_0) - t_i} = \frac{I_{0,i+1} - I_{0,i}}{t_{i+1} - t_i}$$

$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_g - t_0) - t_i} = \frac{I_{i,i+1}}{t_{i+1} - t_i} = \frac{1}{k(c)_{i,i+1}}$$

$$t_g = t_0 + t_i + (t_0 - I_{0,i})k(c)_{i,i+1}$$



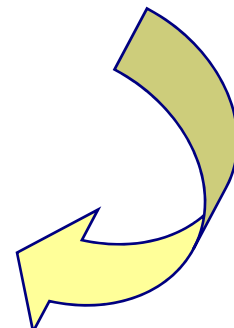
Slika 4. Shematski prikaz postupka integracije pri proračunu vremena zadržavanja gradijentne elucije, t_g

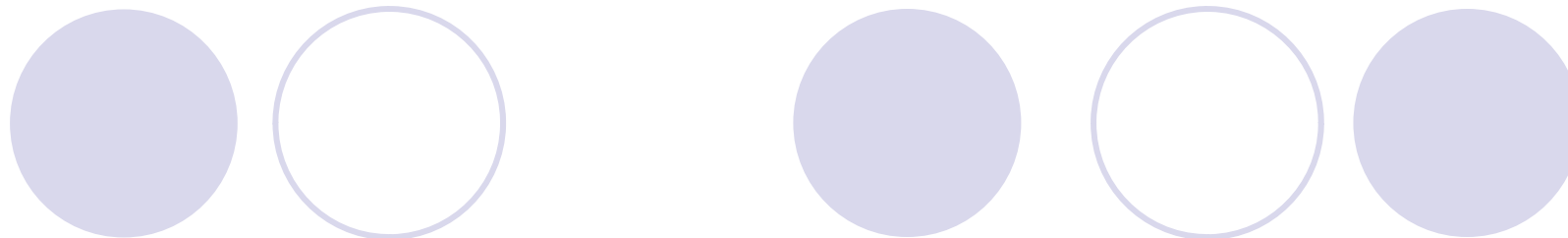
-
1. Vrijeme zadržavanja
2. Lijeva širina pika (na 50% visine)
3. Desna širina pika (na 50% visine)
4. Površina kromatografskog pika
5. (Void) prazno vrijeme
- 
- ```
graph LR; ULAZ[ULAZ] --> MM(Matematički model); MM --> IZLAZ[IZLAZ];
```

**ULAZ**

**Matematički model**

**IZLAZ**

1. Vrijeme zadržavanja  
2. Visina pika  
3. Širina pika (lijeva i desna na 50% visine)  
4. Faktor rezolucije  
5. Asimetrija pika (na 50% visine)  
6. Shematski prikaz kromatograma  
7. Optimalni uvjeti razdvajanja
- 



# **EKSPERIMENTALNI DIO**

➤ Dionexov DX600 kromatografski sustav:

- gradientna pumpa (GS50)
- kromatografski modul (LC30)
- detektorski modul (ED50)
- pretkolone i kolone:
  - ❖ AG16 (4x50 mm), AS16 (4x250 mm)
  - ❖ AG19 (4x50 mm), AS19 (4x250 mm)
  - ❖ AG20 (4x50 mm), AS20 (4x250 mm)
- supresor ASRS – ULTRA II
- modul za generiranje eluensa (eluens = vodena otopina KOH)
- volumen injekcijske petlje → 25 µL

➤ software:

- Chromeleon 6.40
- MATLAB 7.0

## PLAN RADA:

- ispitati mogućnosti predloženog matematičkog modela u ionskoj kromatografiji:
  - ❖ primjenjivost modela za predviđanje vremena zadržavanja
  - ❖ primjenjivost modela za predviđanje rezolucije
  - ❖ primjenjivost modela za predviđanje asimetrije
- izvršena preliminarna ispitivanja na podacima analiza smjese aniona na AS15<sup>(1)</sup>
- primjenjivost ispitati na trima različitim anionskim kolonama:
  - ❖ AS16
  - ❖ AS19
  - ❖ AS20
- ispitati primjenjivost modela da na temelju izokratičnih analiza jedne od kolona predviđa vremena zadržavanja iona na novim, do tada nekorištenim kolonama istog tipa pri izokratičnim i gradijentnim uvjetima

## KOLONA AS19:

### OTOPINA 1

- ispitano ponašanje vremena zadržavanja smjese 6 iona:

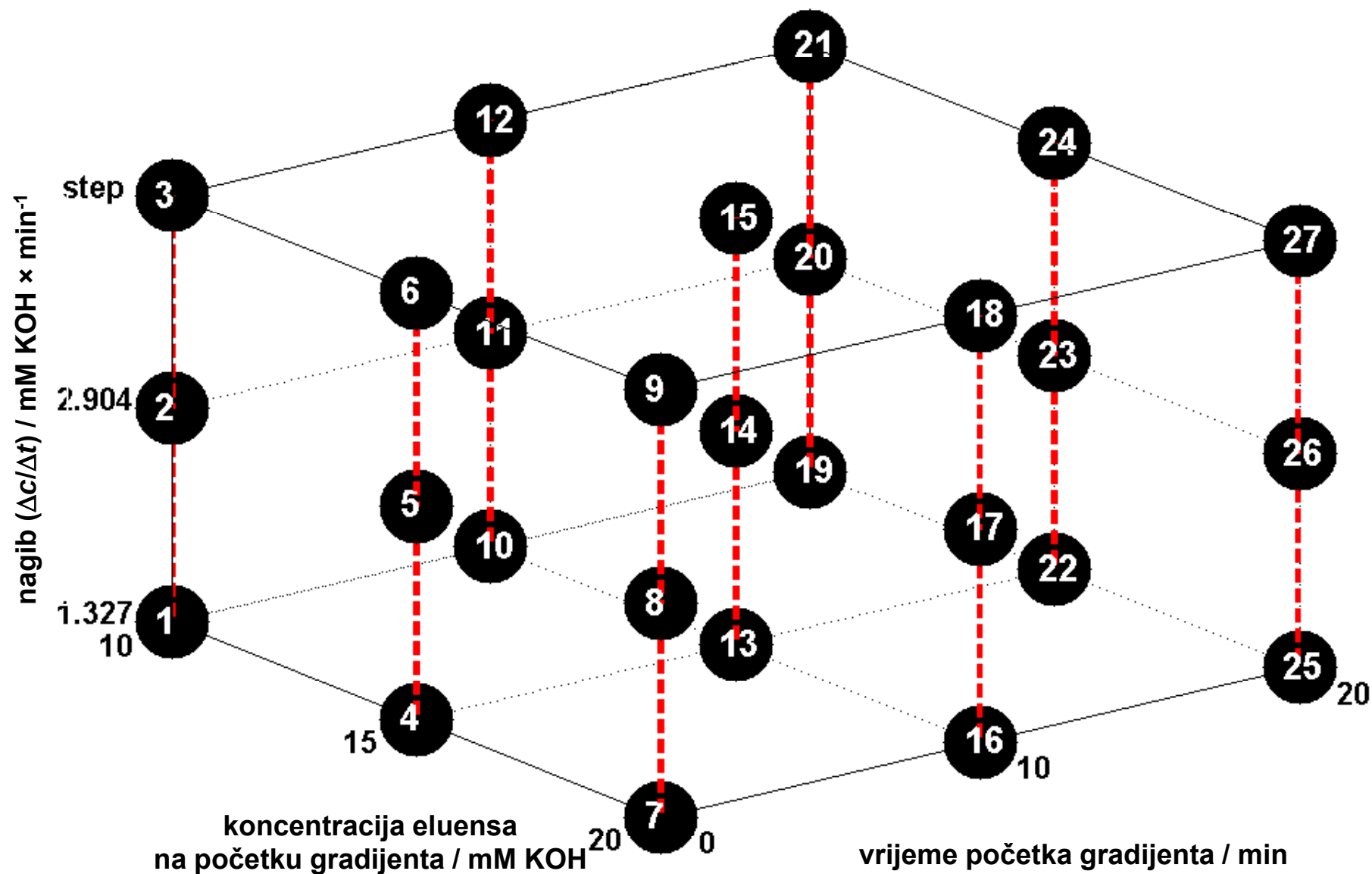


- pripravljene standardne otopine:

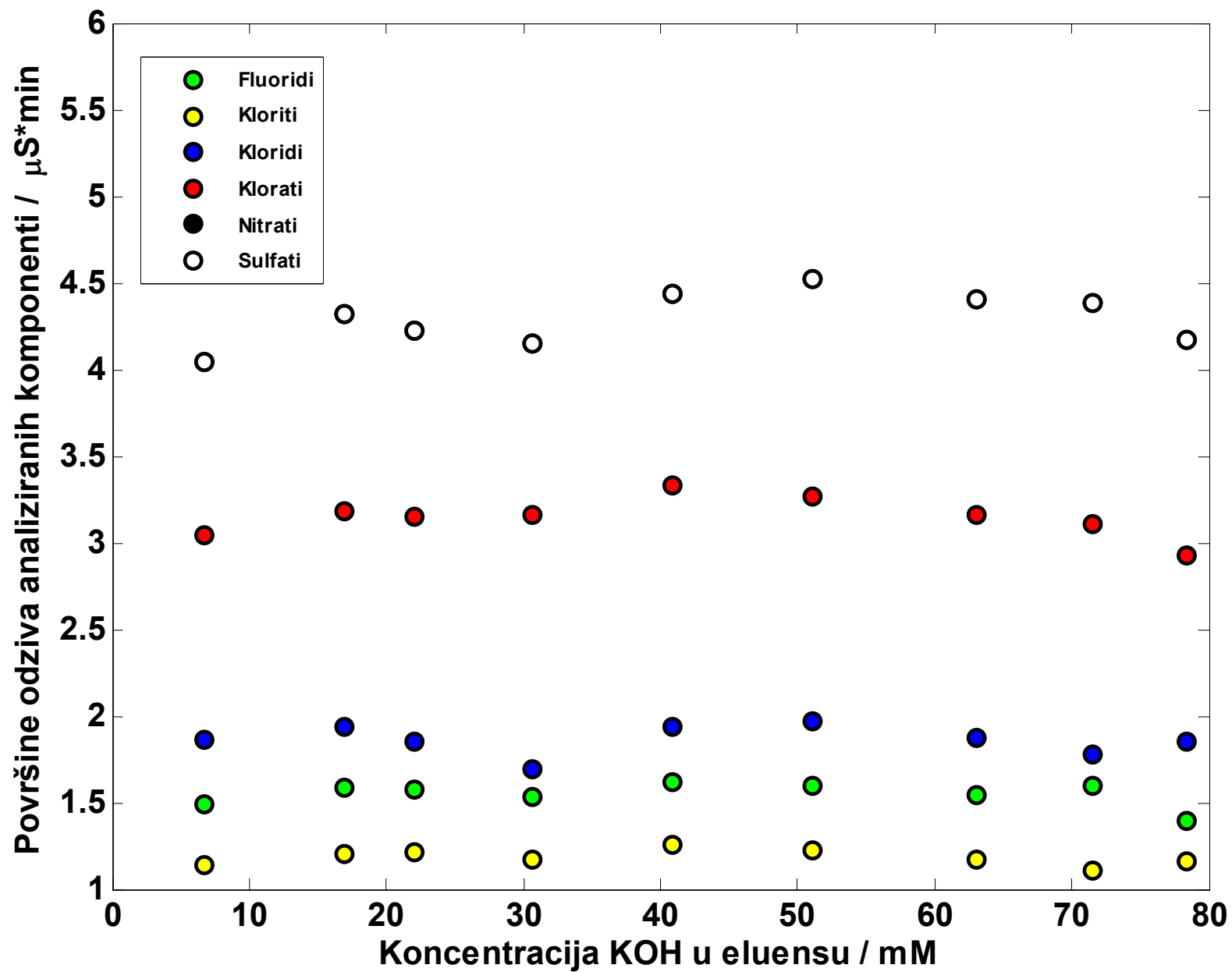
|                    |           |
|--------------------|-----------|
| ❖ otopina fluorida | (30 ppm)  |
| ❖ otopina klorita  | (100 ppm) |
| ❖ otopina klorida  | (60 ppm)  |
| ❖ otopina klorata  | (250 ppm) |
| ❖ otopina nitrata  | (250 ppm) |
| ❖ otopina sulfata  | (250 ppm) |

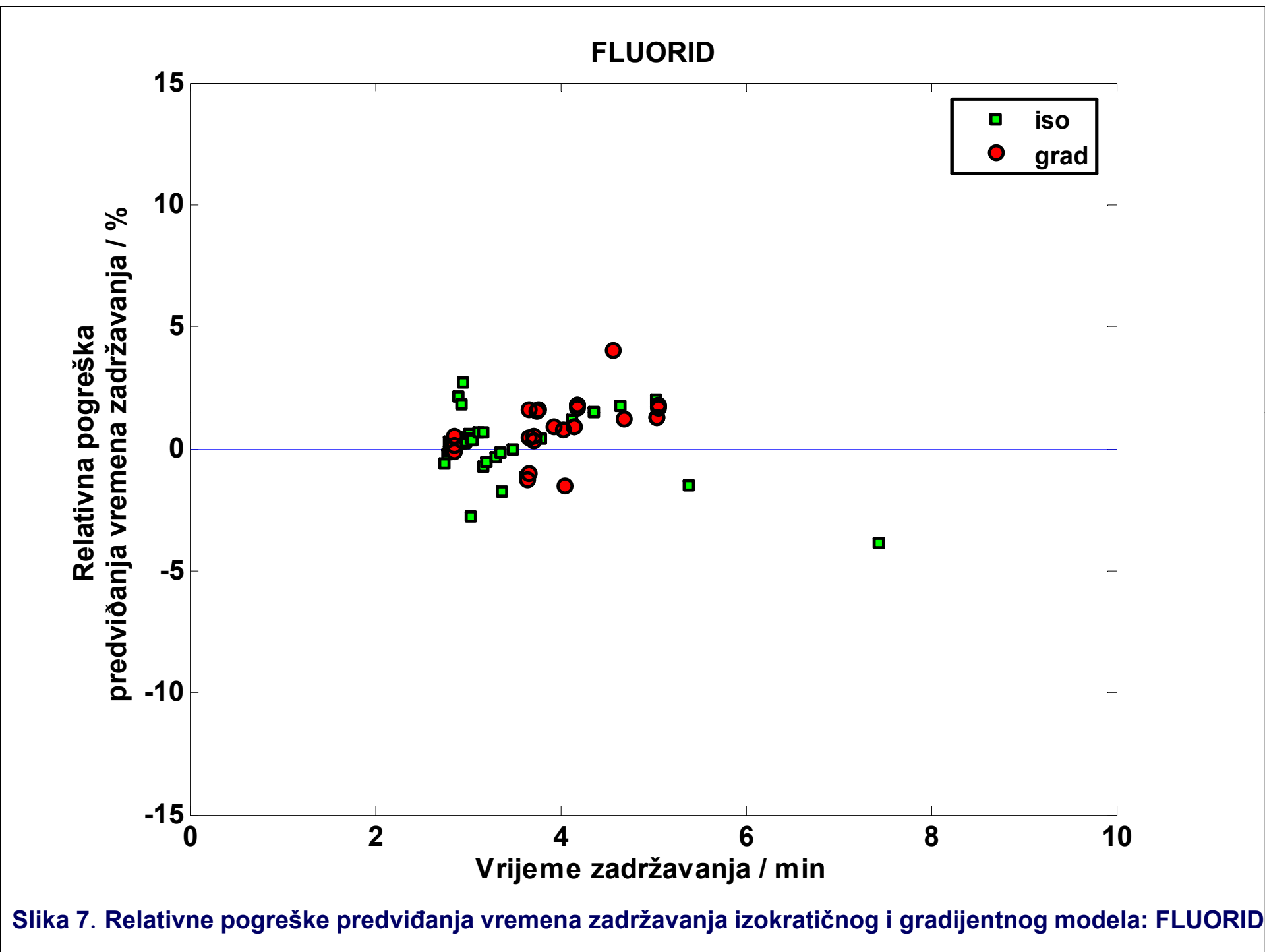
## **Eksperimentalni uvjeti:**

- kolona i pretkolona – AS19 (4×250mm) i AG19 (4×50mm)
- protok 1,00 mL/min
- radna temperatura 35°C
- provedene isokratične elucije na 45 ekvidistantnih koncentracijskih točaka u intervalu od 5 do 80 mM KOH
- provedene gradijentne elucije pri 27 eksperimentalnih uvjeta (Slika 5.)
- varirani:
  - 1) koncentracija početka gradijenta
  - 2) vrijeme početka gradijenta
  - 3) nagib gradijenta
- sva izokratična i gradijentna mjerenja rađena u tripletu
- u kalkulacijama rabljena srednja vrijednost triju mjerenja

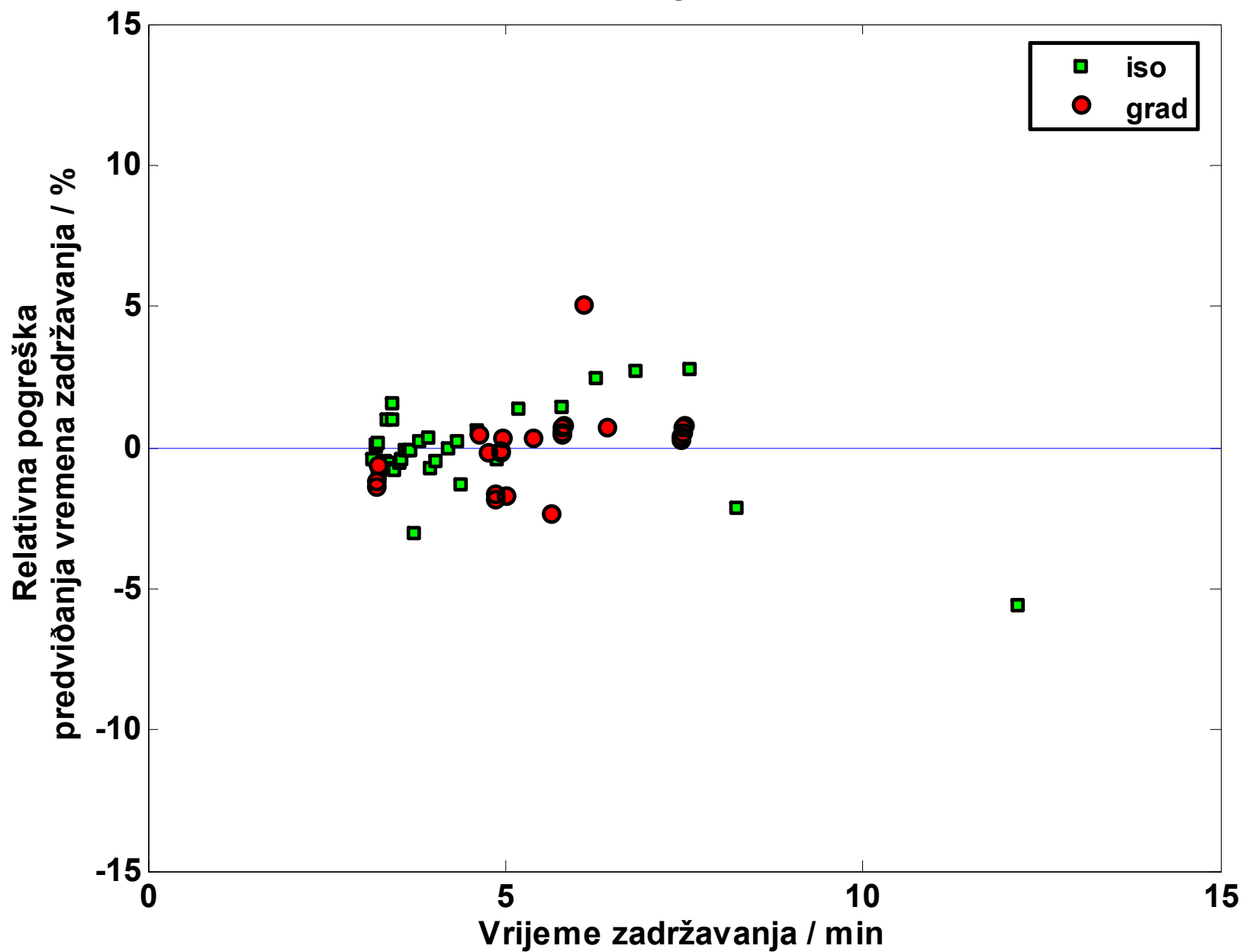


Slika 5. Design gradijenog eksperimentiranja, "full-factorial" metoda

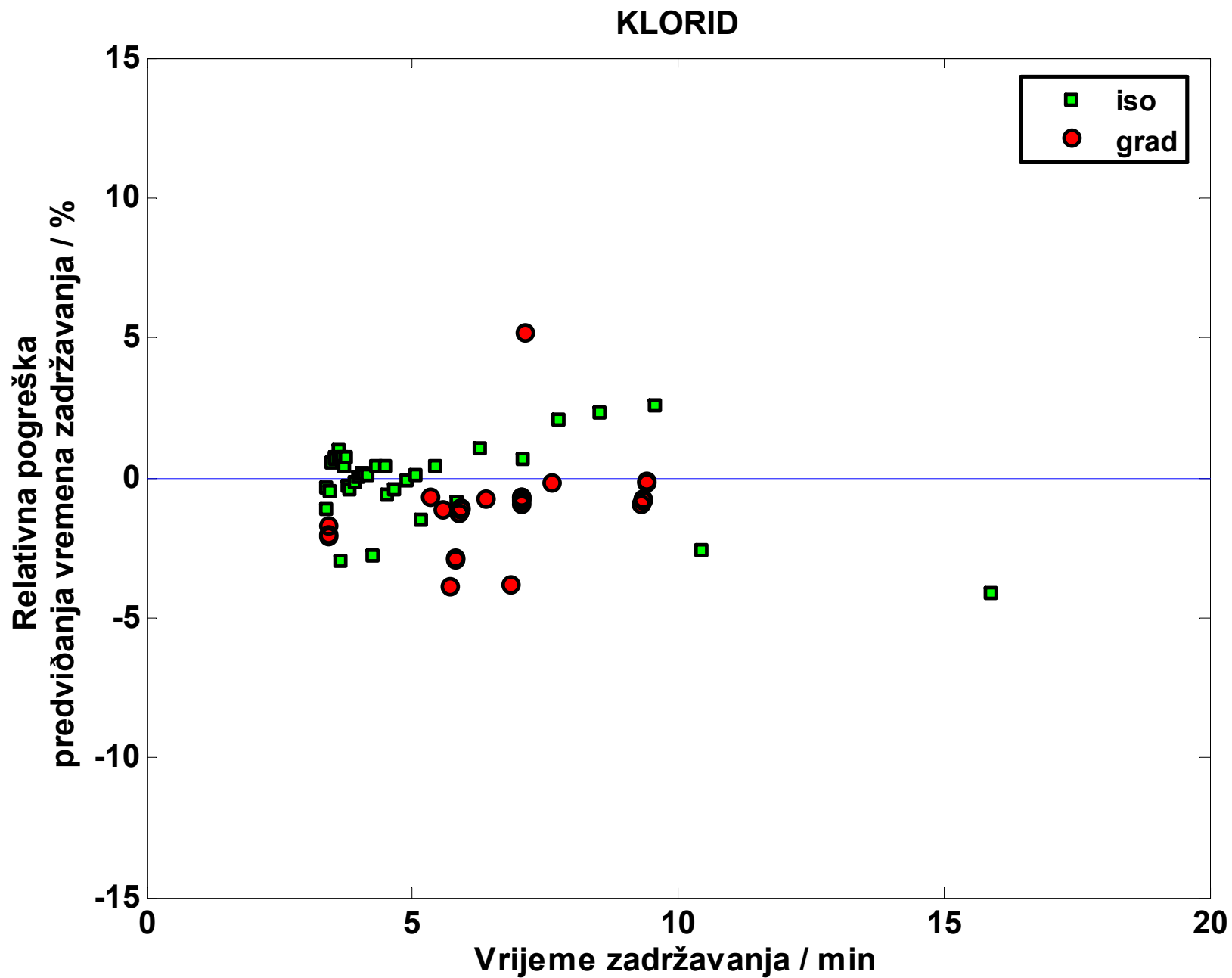




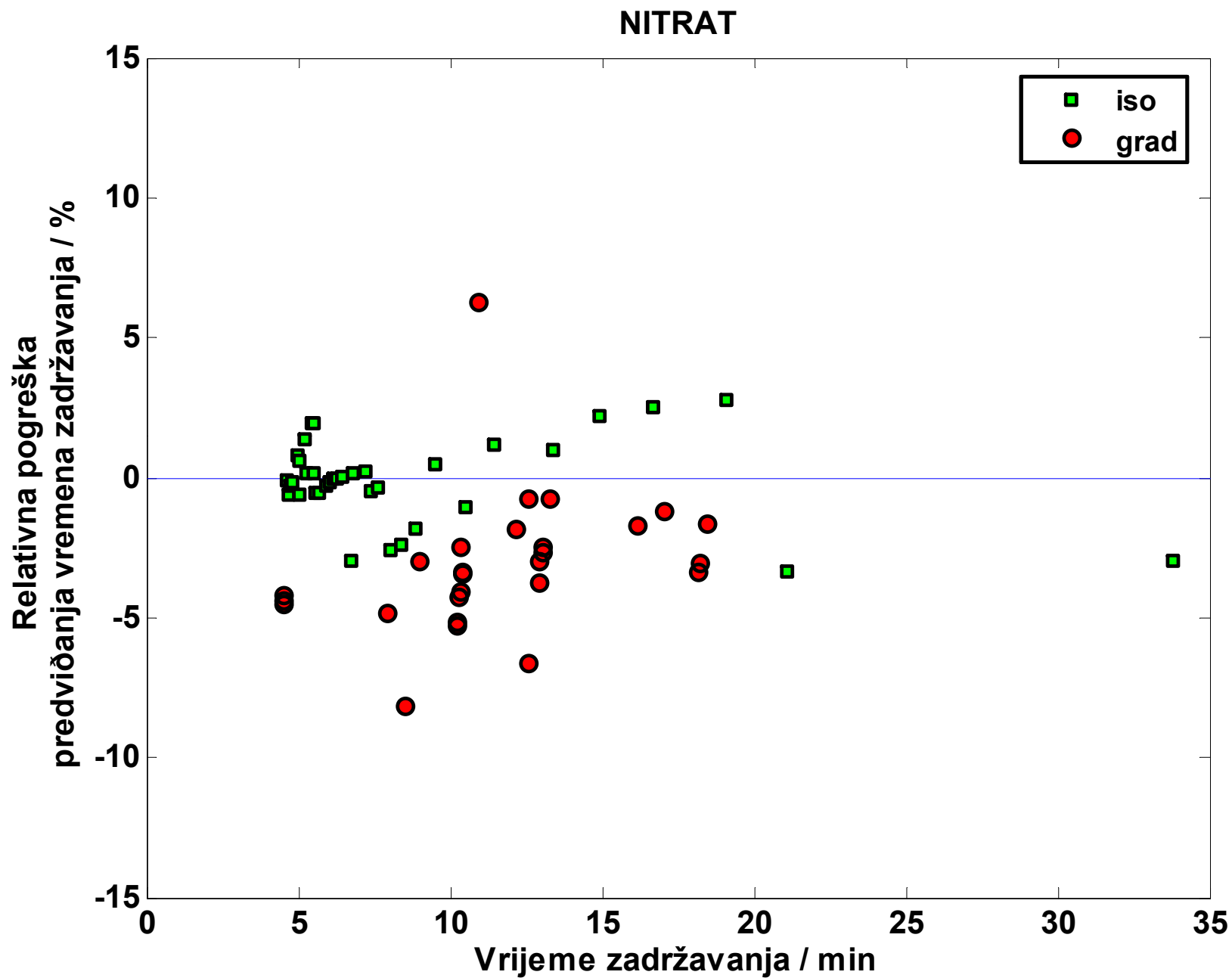
# KLORIT



Slika 8. Relativne pogreške predviđanja vremena zadržavanja izokratičnog i gradijentnog modela: KLORIT

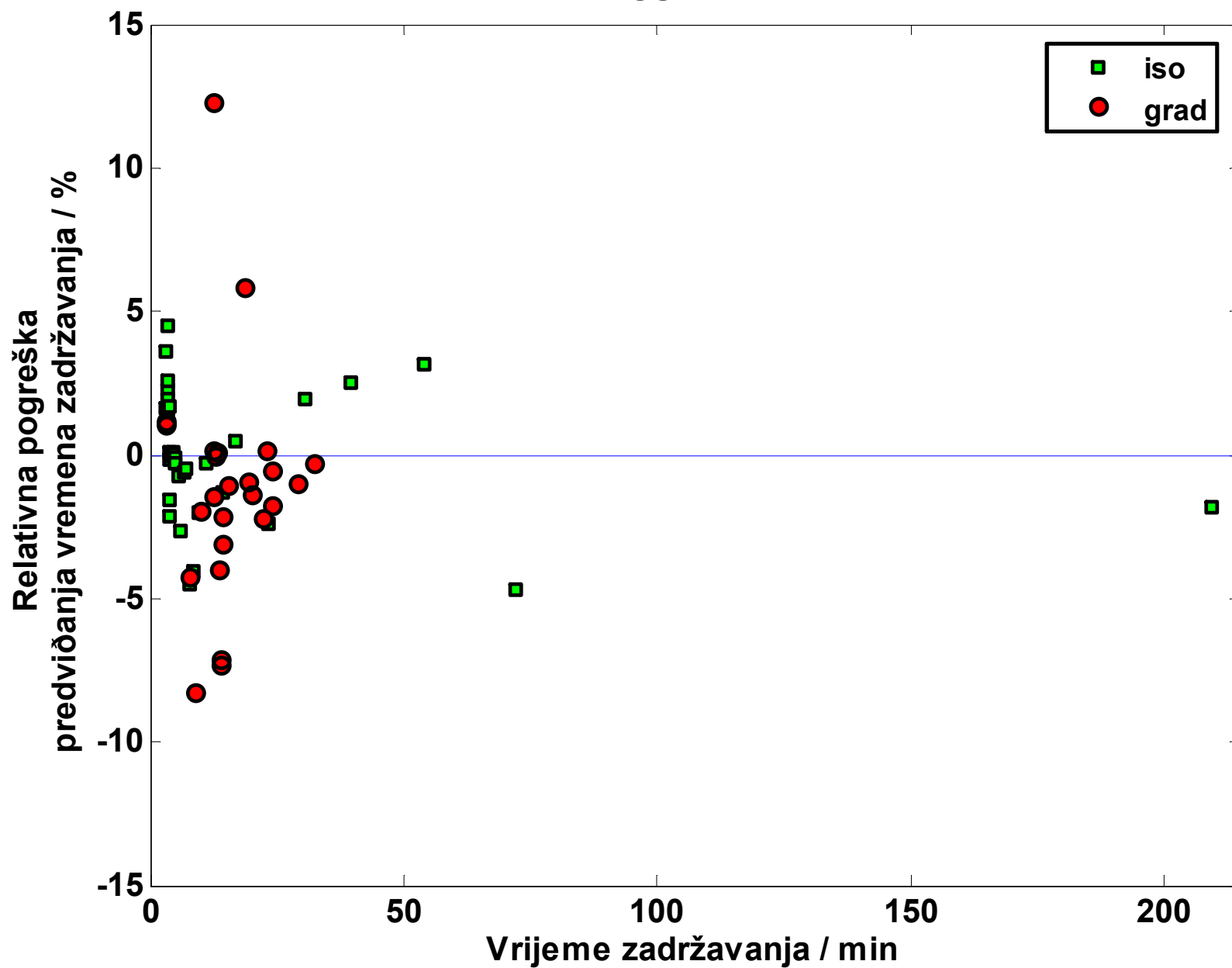


Slika 9. Relativne pogreške predviđanja vremena zadržavanja izokratičnog i gradijentnog modela: KLORID

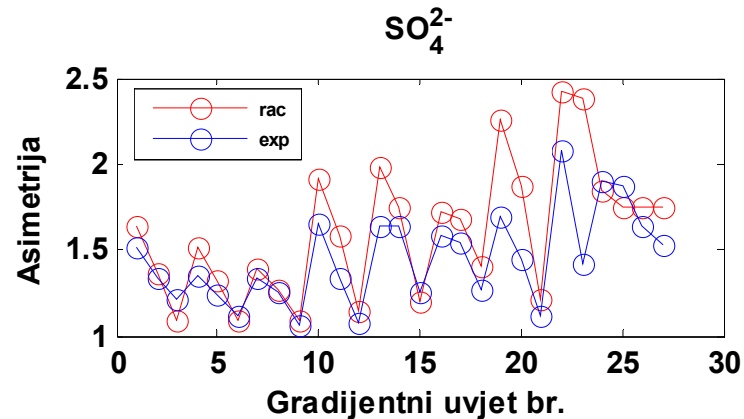
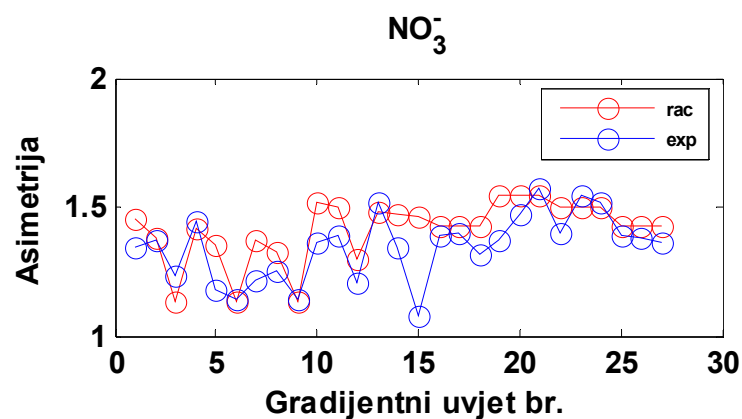
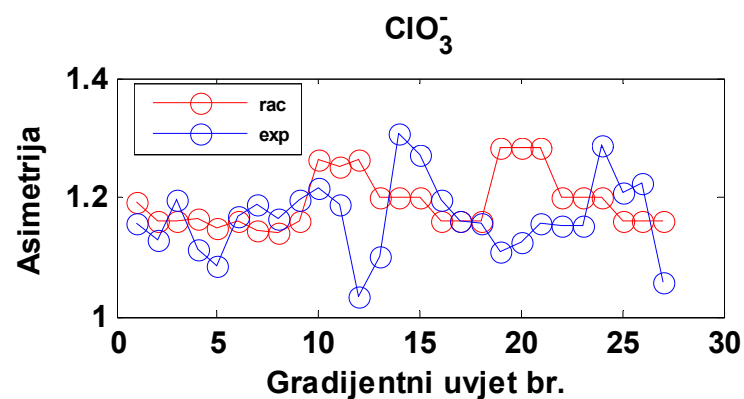
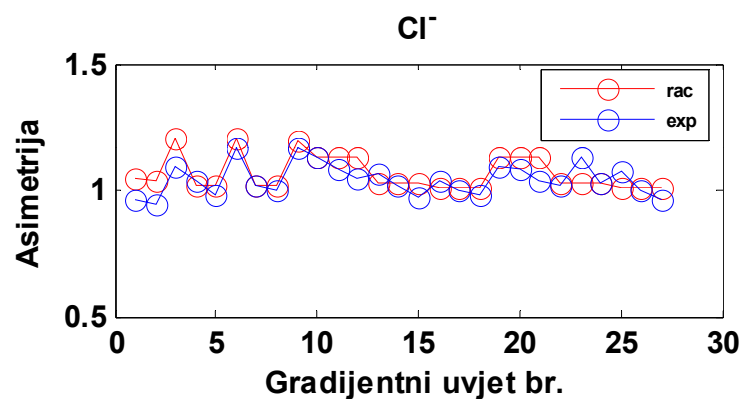
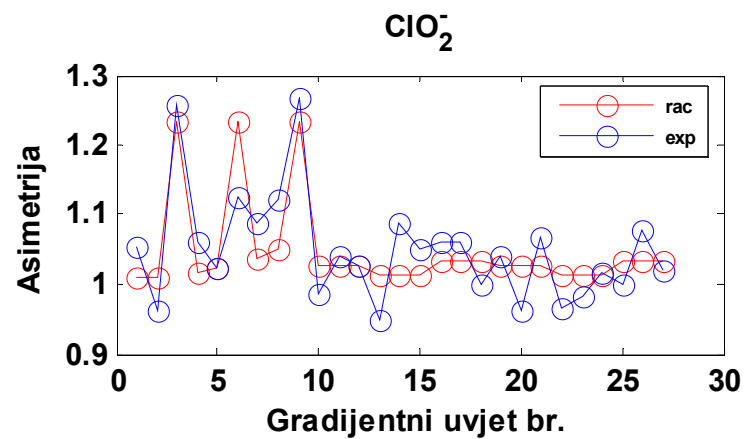
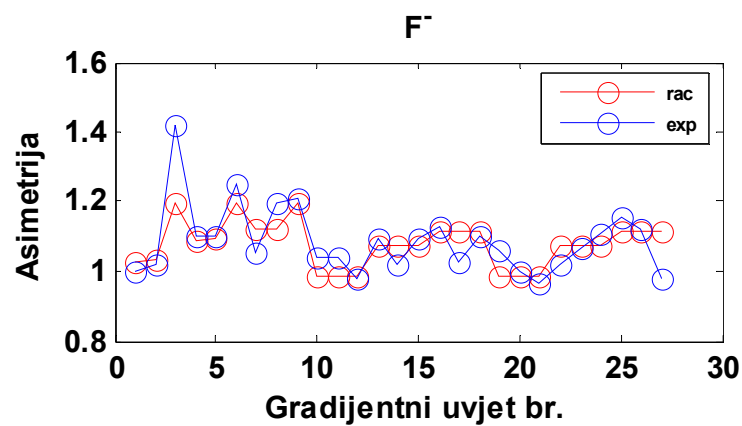


Slika 11. Relativne pogreške predviđanja vremena zadržavanja izokratičnog i gradijentnog modela: NITRAT

## SULFAT



Slika 12. Relativne pogreške predviđanja vremena zadržavanja izokratičnog i gradijentnog modela: SULFAT



**Slika 13. Usporedba predviđene i mjerene asimetrije pri gradientnoj eluciji**



## Zaključak primjene modeliranja

- U ovom radu razvijen je model predviđanja parametara gradijentno vođenih ionskih kromatografskih analiza na temelju izokratičnih eksperimentalnih podataka.
- Provedena istraživanja pokazala su da se razvijeni model odlikuje više nego zadovoljavajućom sposobnošću predviđanja vremena zadržavanja kako pri izokratičnim tako i pri gradijentnim elucijama, dočim se kvalitetno može upotrijebiti i za predviđanje razlučivanja i asimetrije kromatografskih krivulja. Mogućnost predviđanja kromatografskih parametara na svim istovrsnim kolonama rabeći univerzalno izrađen model vremena zadržavanja njegova je iznimna osobina. Sve ove karakteristike definitivno prezentiraju model u najboljem svijetlu, te ga ujedno nameću kao iznimno rješenje pri razvoju novih ionskih kromatografskih metoda.



## Što želimo postići?

- uklanjanje nedostataka metode pokušaja i pogrešaka pri traženju optimalne metode separacije → ekonomski učinak:
  - ušteda vremena
  - ušteda kemikalija
- ukloniti sustavnu pogrešku unesenu izokratičnim modelom

## **ZAPAŽANJA:**

- **Ispitana je primjenjivost predloženog matematičkog**
- **modela za predviđanje vremena zadržavanja niza otopina**
- **I kolona**
- **Predviđanje vremena zadržavanja izokratične i**
- **gradijentne elucije**
- **Postojanje pogreške izokratičnog modela predviđanja**
- **vremena zadržavanja na bazi polinomne ovisnosti**
- **logaritma koncentracije eluensa i logaritma faktora**
- **zadržavanja**
- **Postojanje pogreške gradijentnog modela baziranog na**
- **izokratičnim eksperimentalnim podacima**  
**te se ponekad i preklapao s drugim pikovima**

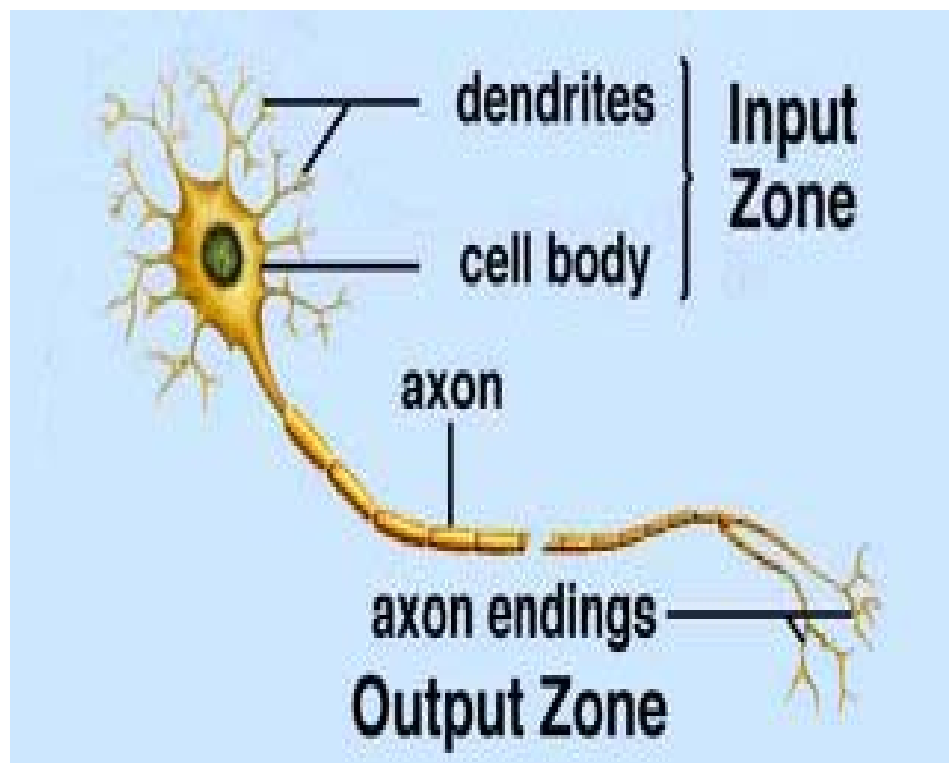
# ZAPAZANJA

- $\text{SO}_4^{2-}$  mijenjao mjesta u redosljedu eluiranja ovisno o koncentraciji  $\text{OH}^-$ ,
- rezultati preklopljenih pikova dobiveni analizom otopina čistih komponenti  
⇒ ne uzimaju se u obzir međusobne interakcije ⇒ unošenje pogreške
- pogreška gradijentnog modela sličnog ponašanja i raspona kao i pogreška izokratičnog modela →

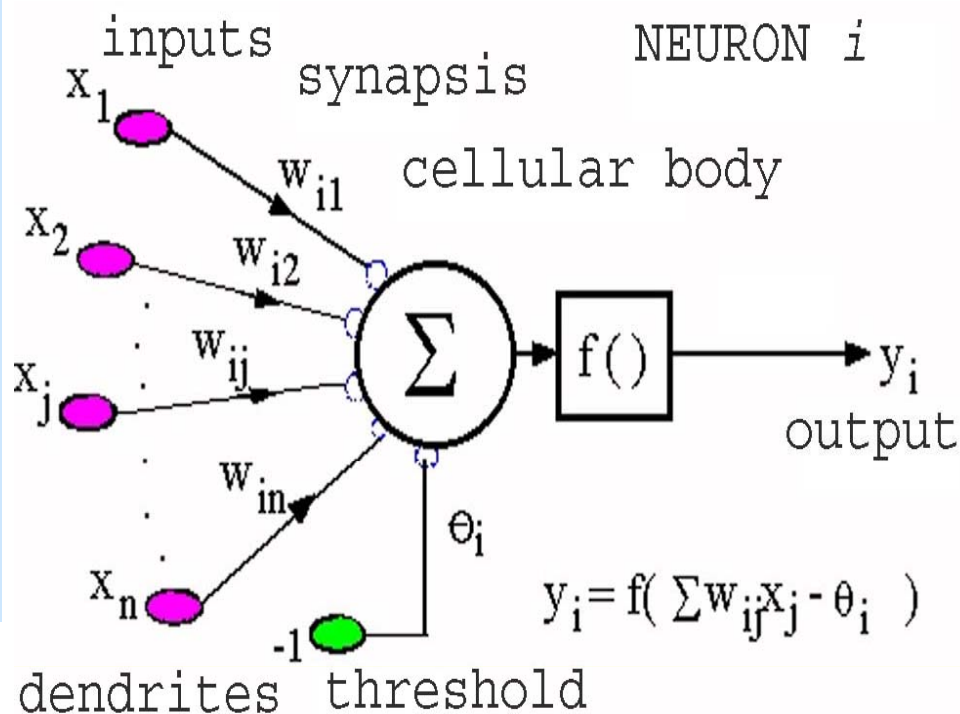
**SUSTAVNA POGREŠKA UNESENA  
IZOKRATIČNIM MODELOM  
Ukloniti !**

# Razvoj IC metode - ANN

## Biološki neuron



## Umjetni neuron



Treća međunarodna konferencija  
**KOMPETENTNOST LABORATORIJI 2009.**  
**14. - 17. listopada 2009.**

**CAVTAT- DUBROVNIK**

[www.crolab.hr](http://www.crolab.hr)





# Plenarna predavanja

- J. Topić (IE) HRV. Krstelj (EFNDT) HRM. Golze (BAM) DI. Leito (UT) ET. Muhić-Šarac (PMF) BiHN. Majcen (MIRS) SLD. Vlašić Pleše (MVPEI)
- HRCROLAB-support to Competence of laboratories
- Quality infrastructure in the European Union – the Role of EUROLAB and the Conformity Assessment Community
- Fostering measurement science education in Europe - the Measurement Science in Chemistry consortium
- The best available analytical techniques for metrology in ChemistryThe challenge of upgrading the national infrastructure with the actual needs of an EU member state
- State of play of negotiations between Croatia and EU in Chapter 1: Free movement of goods – harmonisation of technical legislation



# Okrugli stolovi i posteri

- TEME:
- **1. Sustavi kvalitete laboratorija prema HRN EN ISO/IEC 17025**  
(međulaboratorijska ispitivanja, referentni materijali, mjerna nesigurnost, slijedljivost do etalona)  
**Moderator: B. Bajzek-Brezak (HAA)**
- **2. Tehničko zakonodavstvo u području industrijskih proizvoda i sloboda kretanja roba** (koordinacija unutarnjeg tržišta, tijela za ocjenu sukladnosti, akreditirani laboratoriji, priznavanje rezultata i implementacija direktiva)  
**Moderator: L. Čelar, M. Zečević (MINGORP)**
- **3. Sigurnost predmeta opće uporabe** (igračke, posuđe, kozmetika, detergents)  
**Moderator: predstavnik HZJZ**
- **4. Rezultati ispitivanja u zaštiti okoliša** (zrak, tlo, voda)  
**Moderator: predstavnik MZOPUG**
- **5. Obrazovanje, istraživanja i razvoj laboratorija** (cijeloživotno obrazovanje, istraživačka iskustva kao sastavnice kompetentnosti laboratorija)  
**Moderator: D. Zvizdić (FSB)**
- **POSTERSKA IZLAGANJA**

Hvala i vidimo se u Cavtatu 14.-17.10.2009.  
**Kompetentnost laboratorija**

