

## **Določitev izbranih organskih kislin v sadnih sokovih z ionsko kromatografijo visoke ločljivosti**

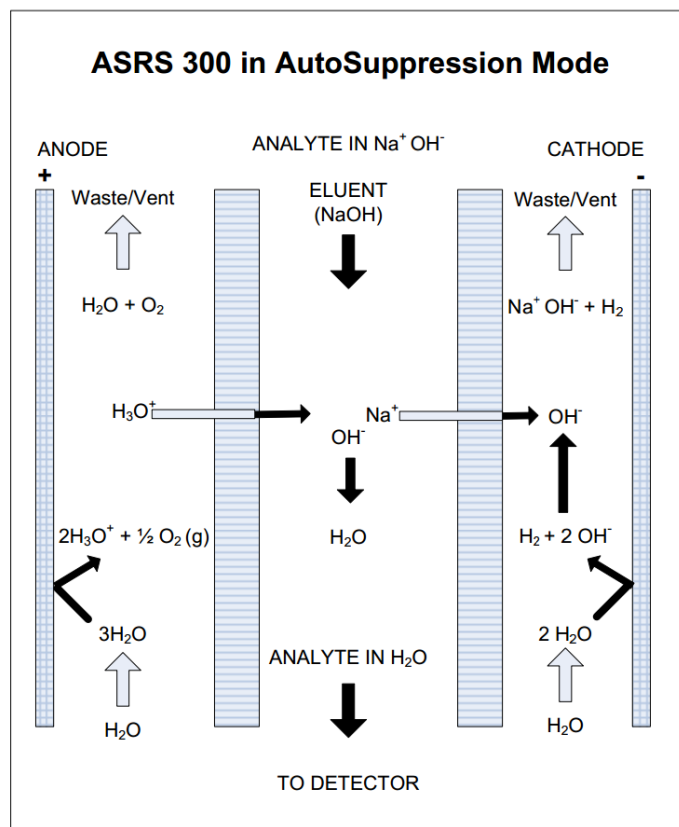
### **1. Namen vaje**

Spoznali boste analizno metodo ionsko kromatografijo (IC, ang. Ion Chromatography), pri kateri boste za detekcijo izbranih analitov (anionov organskih kislin) uporabili detektor na merjenje električne prevodnosti (CD, ang. Conductivity Detector) ter UV detektor z nizom fotodiod (PDA, ang. Photodiode Array Detector). Pripravili boste t.i. multistandardne raztopine, optimizirali ločbo analitov ter izvedli ustrezno predpripravo in analizo vzorca sadnega soka. Z uporabo umeritvenih premic boste določili vsebnost askorbinske, maleinske, malonske, jabolčne, ter citronske kisline.

### **2. Teoretične osnove**

Ionska kromatografija visoke ločljivosti (HPIC, ang. High-Performance Ion Chromatography) je kromatografska metoda, katere delovanje ima sicer nekaj podobnosti z metodo HPLC, vendar temelji njen princip ločevanja spojin (ionov) na povsem drugačnem principu. Ločevanje poteka na kolonah, pri katerih so kot stacionarna faza uporabljene zamrežene polimerne smole (običajno so to polistirenske smole, zamrežene z divinil-benzenom), na katere so glede na namen dela lahko vezane različne ionske funkcionalne skupine. Če želimo npr. ločevati anionske zvrsti, bomo seveda uporabili kolono, na kateri so vezane skupine s pozitivnim nabojem, ki tako ustvarijo bolj ali manj intenzivno vezno interakcijo z negativno nabitimi analiti iz vzorca. Le-ti se glede na stopnjo ter porazdelitev (gostoto) naboja zadržujejo v koloni različno dolgo in se zatorej posledično ločijo med seboj. Za elucijo anionov iz kolone se najpogosteje uporablja raztopino alkaliskega hidroksida ( $\text{OH}^-$ ) ali karbonatnega pufra ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ). Ločene komponente je potrebno v končni fazi še detektirati, za kar je v splošnem najbolj primeren in najpogosteje uporabljen kar detektor na merjenje električne prevodnosti, saj imamo opravka z nabitimi analiti, ki prevajajo električni tok. Ker pa električni tok prevaja tudi eluent sam (npr. ionski par  $[\text{Na}^+ + \text{OH}^-]$ ), uporabimo za njegovo odstranitev anionski supresor s kontinuirno regeneracijo (ASRS, ang. Anion Self-Regenerating Suppressor), katerega

delovanje temelji na elektrodializi. Pri elektrolizi vode se na anodi proizvajajo  $\text{H}_3\text{O}^+$  ioni, ki zaradi koncentracijskega gradienta prehajajo preko kationske izmenjalne membrane in nevtralizirajo  $\text{OH}^-$  ione;  $\text{Na}^+$  ioni pa zaradi privlaka električnega potenciala prehajajo preko druge membrane na katodno stran in se tako odstranijo iz raztopine z analiti, ki nadaljujejo pot na detektor (*Slika 1*).

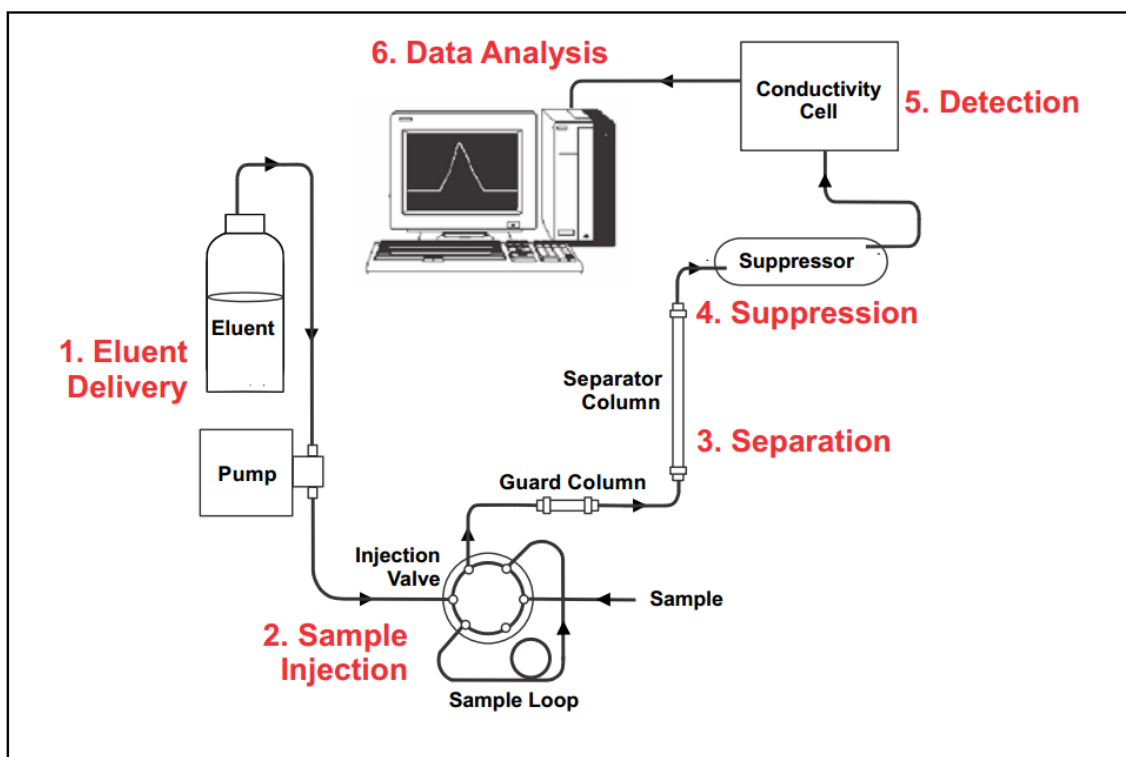


*Slika 1.* Princip delovanja anionskega supresorja. (Vir: Dionex Product Manual ASRS 300, Thermo Scientific®).

Z uporabo supresorja močno znižamo ozadje in povišamo razmerje signal/šum, kar nam omogoči relativno nizko mejo kvantifikacije (LOQ), ki znaša okoli 0,2 mg/L. Za bolj specifične analize so na voljo tudi drugi detektorji, denimo amperometrični detektor, ki omogoča uporabo različnih elektrokemijskih metod (DC, PAD, CV), ter različni spekrofotometrični detektorji (UV, fluorescenca...) z detekcijo bodisi pri (eni) izbrani valovni dolžini, ali snemanjem celotnega spektra. Na vaji boste poleg detektorja na merjenje električne prevodnosti tako uporabili UV detektor z nizom fotodiod, ki omogoča snemanje spektrov med 190 in 800 nm. Slednje nam omogoča snemanje 3D spektrov, kjer nam x-os predstavlja čas, y-os valovno dolžino, z-os pa je absorbanca oz. absorpcija svetlobe. Za razliko od detektorja na električno prevodnost, ki omogoča detekcijo vseh ionskih zvrsti, so ostali bolj specifični in so zato (bolj) uporabni v posebnih primerih. Tako lahko UV detektor s pridom uporabimo npr. za detekcijo

spojine, ki je UV-aktivna in se na koloni ne loči od druge spojine, ki pa ne absorbira svetlobe v UV območju.

Poleg kolone, supresorja in obeh detektorjev so glavni sestavni deli ionskega kromatografa, ki ga boste uporabili na vaji, še gradientna črpalka, ki omogoča gradientno mešanje različnih topil, avtomatski vzorčevalnik (ang. autosampler) z injekcijskim 6-potnim ventilom ter 50  $\mu\text{L}$  zanko, on-line generator eluenta (EG, ang. Eluent Generator) ter prenosni računalnik, preko katerega kontroliramo celoten sistem in obdelujemo eksperimentalne podatke (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz sistema IC. EG ter PDA detektor nista prikazana (Vir: Dionex ICS-2100 Ion Chromatography System Operator's Manual, Thermo Scientific®).

### 3. Eksperimentalni del

#### 3.1. Naloga

Za pripravo in razredčevanje vseh raztopin uporabite mQ prečiščeno vodo.

- Iz osnovnih raztopin standardov organskih kislin s koncentracijami 100 mg/L pripravite po 10 mL multistandardnih raztopin s koncentracijami 1.0, 2.0, 4.0 ter 8.0 mg/L in z njimi napolnite vialo ter jih prenesite v avtomatski vzorčevalnik.
- Posnemite kromatogram standarda z najvišjo koncentracijo in predlagajte morebitno optimizacijo ločbe (začetna in končna koncentracija eluenta, čas in naklon gradienta, čas ločbe,...).
- Posnemite kromatogram slepe raztopine in ostalih standardov ter optimizirajte metodo za zaznavo in integracijo vrhov posameznih spojin.
- S pomočjo brizge odvezmite okoli 3 mL vzorca sadnega soka ter ga prefiltrirajte preko poliamidnega filter papirja (velikost por 0,45  $\mu\text{m}$ ). V 10 mL bučki pripravite razredčeno raztopino filtrata vzorca s faktorjem redčenja 10. Tako pripravljen vzorec injicirajte v ionski kromatograf ter določite, katere izmed organskih kislin so prisotne v vzorcu.
- Glede na ploščine integriranih vrhov izračunajte faktor redčenja, da bodo ploščine za vzorec znotraj umeritvene krivulje. Ustrezno razredčite vzorec ter ga ponovno injicirajte v kromatograf.
- S pomočjo tehtanja določite gostoto vzorca.
- Izvozite podatke umeritvenih krivulj in rezultate analiz vzorca.

#### 3.2. Eksperimentalni pogoji

- Instrument: ionski kromatograf Dionex ICS 2100, ki vključuje gradientno pumpo PG50, generator eluenta EGC III KOH, avtomatski vzorčevalnik TSP AS-3500 z 50  $\mu\text{L}$  zanko.
- Analitska kolona: Dionex IonPac® AS11-HC 4mm.
- Pretok: 1,0 mL/min, tlak: 2600-2800 psi, KOH generator
- Detekcija:
  - (i) detektor na merjenje električne prevodnosti ED40  $\nu = 2$  Hz, pri  $T = 23^\circ\text{C}$ , supresor ASRS® 300, el. tok 50 mA.
  - (ii) UV detektor z nizom fotodiod PDA 3000, merjenje med 190 in 800 nm,  $\nu = 5$  Hz.

- Koncentracijski program eluenta:

*Tabela 1.* Gradient koncentracije KOH na generatorju eluenta

Čas [min]	Koncentracija KOH [mM]
0.0	7.5
10.0	7.5
10.1	20.0
15.0	20.0
15.1	7.5
24.0	7.5

#### 4. Nekaj napotkov za izdelavo poročila

Kot skupina lahko napišete skupno poročilo, ki ga oddate v mapo (Analizne metode za karakterizacijo materialov in bioloških sistemov, Bioanalizna kemija) na polici omare nasproti vhodnih vrat.

Obvezni deli poročila so:

- Glava (naslov vaje, datum, študenti na vaji).
- Kratek opis dela.
- Eksperimentalni podatki (vzorec, volumni pipetiranja, faktorji redčenja, pogoji snemanja, koncentracijski program eluenta...).
- Umeritvene krivulje za vseh 5 spojin.
- Izračuni masnih koncentracij ter masnih deležev posameznih kislin v vzorcu.
- Rezultati analize.
- Diskusija:
  - (i) Komentirajte rezultate ter zaporedje izločanja analitov. (Pomagajte si s strukturami kislin)
  - (ii) Odgovorite, katera od preiskovanih spojin ima absorpcijski maksimum pri najdaljši valovni dolžini. Zakaj?
  - (iii) Ali bi to spojino lahko določili brez kromatografske ločbe?
  - (iv) Zakaj smo za elucijo citrata potrebovali bistveno višjo koncentracijo eluenta kot pri ostalih analitih?
  - (v) Kako bi izgledala ločba, če bi kot eluent uporabili raztopino HCl? (Pomagajte si s  $pK_a$  vrednostmi posameznih kislin)
- Literatura (navedite morebitno literaturo, ki ste jo uporabili).