

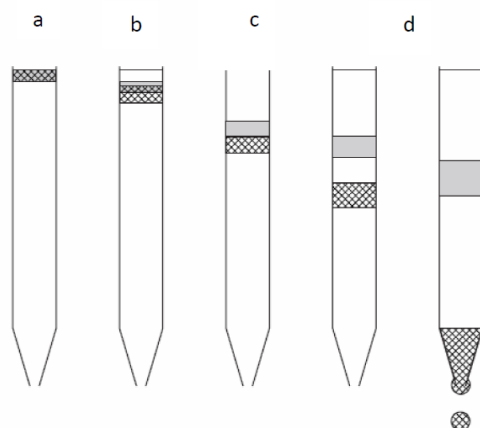
מבוא

ההיסטוריה של הכרומטוגרפיה המודרנית מתחילה עם הבוטניקאי הרוסי צוואט ( Tswett ), שבתחילת המאה ה-19 השתמש לראשונה בעמודה המלאה בפוטסיום קרבונט להפרדה של פיגמנטים צבעוניים מתמציות צמחים. צוואט קרא לשיטה זו כרומטוגרפיה (ביוונית: כרומו פירושו "צבע", גרפיה פירושה "כתיבה").

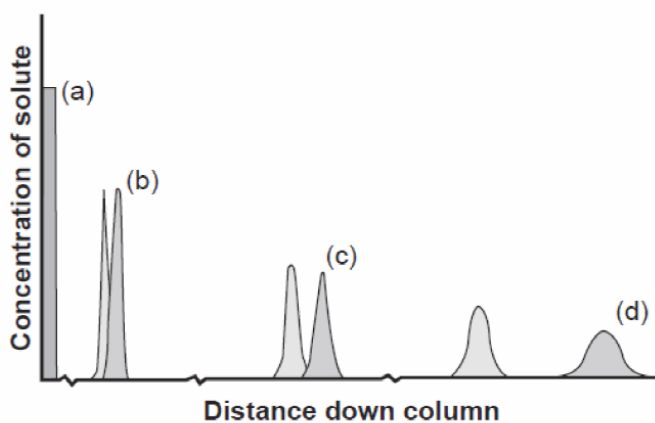
מאז, הכרומטוגרפיה הפכה (בכל צורותיה) לשיטת ההפרדה החשובה והנפוצה ביותר. ההפרדה הכרומטוגרפית היא תהליך דינמי שבו הפאזה הניידת ( **האלואנט** / תמיסת האלוציה) נושאת את הדוגמה דרך תווך המכיל את הפאזה הנייחת. **בכרומטוגרפית העמודה** הפאזה הנייחת נמצאת בתוך עמודה צרה שדרכה הפאזה הניידת עוברת הודות ללחץ חיצוני המופעל עליה או הודות לכוח הכבידה. בכרומטוגרפיית העמודה, על פי רוב, הפאזה הנייחת היא חומר מוצק הממלא את העמודה. לעיתים, הפאזה הנייחת עשויה מוצק הממלא את העמודה והמצופה בשכבה דקה של נוזל סמיך, או שהיא שכבה דקה של נוזל סמיך המצפה את קירות העמודה. התערובת הנבדקת עוברת דרך העמודה והפרדתה למרכיביה מתרחשת כתוצאה מהזיקה השונה של כל מרכיב לפאזה הנייחת ולפאזה הניידת. מרכיבים בעלי זיקה נמוכה יותר לפאזה הנייחת וזיקה גבוהה יותר לפאזה הניידת עוברים דרך העמודה מהר יותר לעומת מרכיבים שיוצרים אינטרקציה חזקה יותר עם הפאזה הנייחת ואינטרקציה חלשה יותר עם הפאזה הניידת. המרכיבים המופרדים יוצאים, כל אחד בתורו, מהעמודה עם תמיסת האלוציה ועוברים דרך גלאי אשר משנה את הסיגנל בהתאם למרכיבים המגיעים אליו. הכרומטוגרמה המתקבלת מתארת את שינוי הסיגנל כנגד הזמן.

להלן תיאור כללי של ניסוי בו מופרדים שני מומסים בעזרת כרומטוגרפיית עמודה. (במערכות שונות יכולים להיות צורות שונות של עמודה ומצב פיסיקלי שונה של הפאזה הנייחת והניידת).

הדוגמה מוכנסת לחלקה העליון של העמודה כפס צר. במצב אידיאלי, פרופיל הריכוז ההתחלתי של המומסים הוא מלבני (תמונות 1a, 2a). כשהדוגמה נעה לאורך הקולונה, המומסים מתחילים להיפרד והפיק האישי (או פרופיל הריכוז שלהם לאורך הקולונה) שלהם מתרח ויוצר פרופיל גאוסייני (תמונות 1b-c, 2b, c). אם הזיקה של כל אחד מהמומסים לפאזה הנייחת שונה במידה ניכרת הרי שאז המומסים יופרדו לשני "פסים" ובפרופיל הריכוז יתקבלו שני פיקים נפרדים (תמונות 1d, 2d).



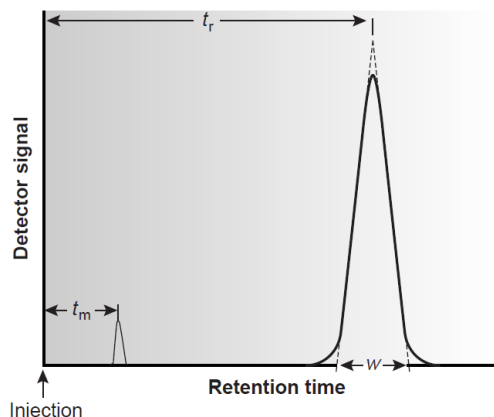
תמונה מספר 1: התקדמות ההפרדה של שני מומסים בכרומוטוגרפיית עמודה



תמונה מספר 2: מבט נוסף להתקדמות ההפרדה של שני מומסים בכרומוטוגרפיית עמודה.

קיימים מספר פרמטרים המאפיינים את השיא הכרומוטוגרפי (תמונה 3):

- זמן שהייה,  $t_r$  (retention time) של מרכיב מסוים הוא הזמן שעבר מרגע הזרקת התערובת לעמודה ועד לקבלת מקסימום השיא של אותו המרכיב.
- רוחב השיא,  $w$ , נמדד בקו הייחוס (baseline).
- $t_m$ , הזמן שלוקח לפאזה הנעה לעבור מאזור ההזרקה דרך הצנרת והעמודה מבלי להשתנות בה עד לגלאי.



### תמונה 3: הפרמטרים המאפיינים את השיא בכרומטוגרמה.

בשיטות הכרומטוגרפיה השונות קיימים שלושה מושגי יסוד: (1) קיבולת, (2) סלקטיביות ו- (3) יעילות. פיתוח שיטת הפרדה המתבססת על המושגים האלה מהווה מפתח לקבלת תוצאות הפרדה טובות תוך זמן אלוציה קצר.

#### (1) קיבולת:

$k'$ , פקטור הקיבולת (capacitor factor) הוא גודל הפרופורציוני לזמן שהייה של מרכיב כלשהו בעמודה ללא תלות בגאומטריה של העמודה או בקצב הזרימה של הפאזה הניידת.

פקטור הקיבולת מחושב על פי המשוואה:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad [1]$$

בנוסף,  $k'$  מבטא את היחס בין כמותו של מרכיב כלשהו בפאזה הנייחת לבין כמותו בפאזה הניידת ולכן הוא פרופורציונלי למקדם החלוקה,  $K$ . מקדם חלוקה גבוה פירושו שהמרכיב המומס בפאזה הניידת מעדיף את הפזה הנייחת (על פני הפאזה הניידת) ולכן זמן שהייה שלו בעמודה ארוך יחסית.

#### (2) סלקטיביות:

היכולת של מערכת כרומטוגרפית להפריד בין מרכיבים שונים הנמצאים יחד בדוגמא אנליטית. מידת הסלקטיביות תלויה בתכונות הכימיות והפיזיקליות של העמודה (המתבטאות בטיב האינטראקציות של מרכיבי העמודה עם המרכיבים המומסים) ובאלואנט הנבחר.

$\alpha$ , פקטור הסלקטיביות, שמשמעותו הסלקטיביות היחסית של העמודה הכרומטוגרפית עבור זוג מומסים (A,B), נתון ע"י:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{r,B} - t_m}{t_{r,A} - t_m} \quad [2]$$

כאשר  $t_{r,A}$  קטן יותר מ- $t_{r,B}$  או שווה לו.

### (3) יעילות:

ניתן לתאר את העמודה כאוסף של פלטות תאורטיות שעליהן מתרחשת החלוקה של המומס בין הפזה הניידת לפזה הנייחת. ככל שמספר הפלטות התאורטיות,  $N$ , גדול יותר המערכת הכרומטוגרפית עילה יותר. מדד נוסף ליעילות העמודה מתייחס לגובה התאורטי של הפלטה,  $H$ . ניתן לבטא את התלות בין שני המדדים הנ"ל בעזרת הנוסחה:

$$N = \frac{L}{H} \quad [3]$$

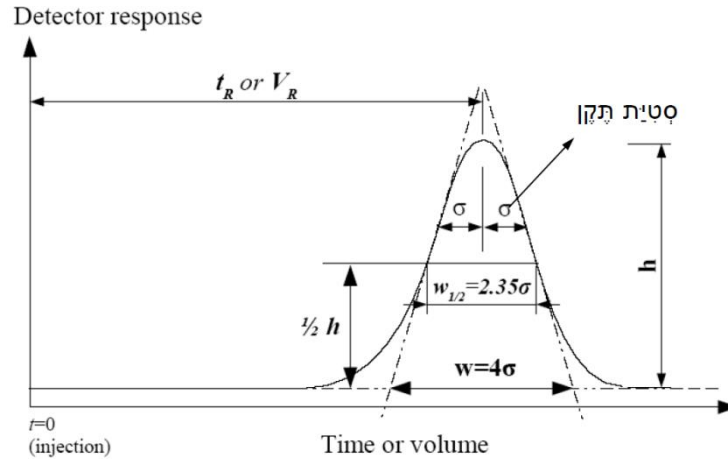
כאשר  $L$  מבטא את אורך העמודה.

את מספר הפלטות התאורטיות,  $N$ , ניתן לחשב באופן ניסיוני באמצעות מספר נוסחאות. אנחנו נתמקד בשלוש מהן.

הנוסחה הראשונה (4) מציגה מנה בין זמן השהייה לרוחב הפיק כאשר רוחב הפיק מתייחס למרחק בין נקודות החיתוך של שני המשיקים לפיק הכרומטוגרמה עם קו הבסיס (ראו תמונה 4).

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \quad [4]$$

נוסחה זו (4) פותחה מתמטית מתוך הנחה שלשיא הכרומטוגרפי יש צורה גאומטרית (סימטרית).



**תמונה 4 : הצגה סכמטית של שיא בעל צורה גאוסיאנית המתקבל בכרומטוגרמה.**

בתמונה 4 מוצג בצורה סכמטית שיא בעל צורה גאוסיאנית המתקבל בכרומטוגרמה אידיאלית. ציר ה- $x$  מתאר את נפח תמיסת האלוציה מרגע ההזרקה (או את הזמן שעבר מרגע ההזרקה). ערכו של  $\sigma$  מייצג את סטית התקן של התרחבות הפיק והוא פרופורציונלי למקדם הדיפוזיה של המומס.

את הגובה התאורטי של הפלטה,  $H$ , ניתן לחשב מתוך הנוסחה הבאה :

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad [5]$$

כאשר סטית התקן מבוטאת ביחידות זמן, מסומנת באות  $\tau$ , וניתנת ע"י המשוואה הבאה :

$$\tau = \frac{\sigma}{u} = \frac{\sigma t_r}{L} \quad [6]$$

כאשר  $u$  מייצג את המהירות הקווית הממוצעת של הפזה הנעה. רוחב השיא הגאוסיאני,  $w$ , במקרה זה ניתן ע"י :

$$w = 4\tau \quad [7]$$

מתוך משוואות [5]-[7] הגובה התאורטי של הפלטה,  $H$ , ניתן לחישוב בעזרת פרמטרי הכרומטוגרפיה

$$: w \text{ ו- } t_r$$

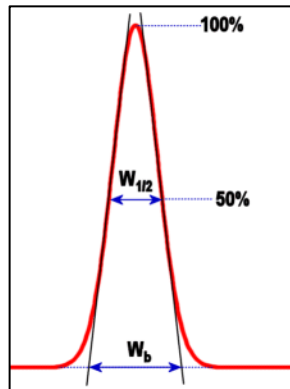
$$H = \frac{Lw^2}{16t_r^2} \quad [8]$$

אם כך הצבה של הפרמטר  $H$  (משוואה [8]) במשוואה [3] תיתן את משוואה [4] המאפשרת לחשב ניסויית את מספר הפלטות התיאורטיות,  $N$ .

נוסחה נוספת [9] (נפוצה מאוד) מאפשרת לחשב באופן ניסויי את מספר הפלטות התיאורטיות בעזרת רוחב פיק הנמדד בחצי גובה הפיק:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{w_{0.5}} \right)^2 \quad [9]$$

להלן תמונה הממחישה את רוחב הפיק המחושב:

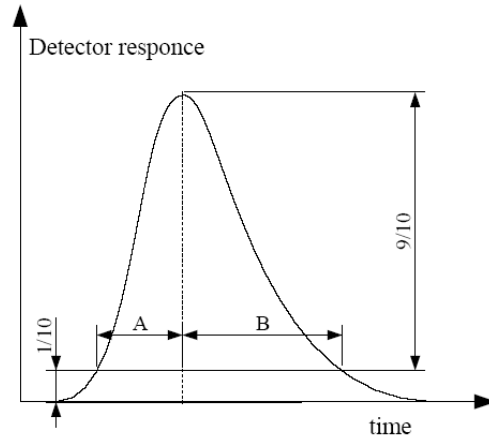


**תמונה 5: מדידת רוחב הפיק באמצע הגובה.**

פעמים רבות הפיק המתקבל בכרומטוגרמה אינו סימטרי (ראו תמונה 6).

במקרים כאלה חישוב מספר הפלטות התיאורטיות מתבצע ע"י הנוסחה הבאה [10]:

$$N = \frac{41.7}{\frac{B}{A} + 1.25} \left( \frac{t_r}{w_{0.1}} \right)^2 \quad [10]$$

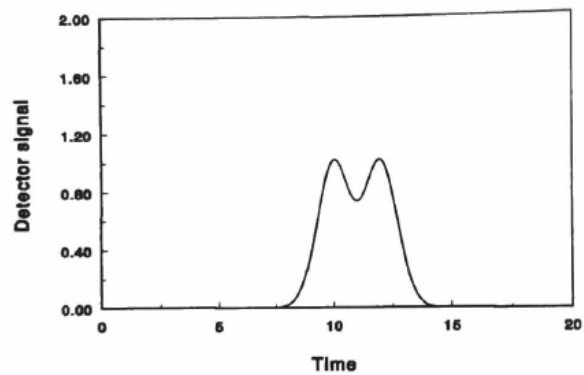
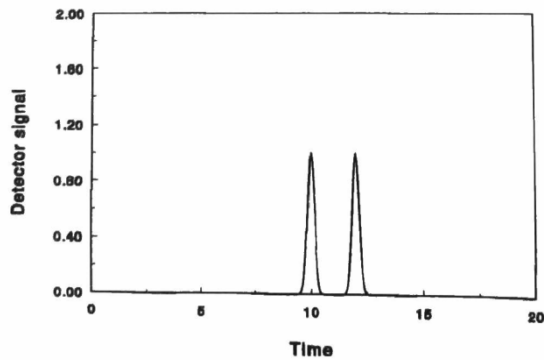


תמונה 6: פיק שאינו סימטרי

מערכת כרומטוגרפית יעילה מתבטאת בשיאים חדים וגבוהים. בתמונה 7 ניתן לראות כרומטוגרמה המתקבלת מעמודה לא יעילה: ישנה חפיפה גדולה בין שני המרכיבים אותם אנו רוצים להפריד. לעומת זאת, בתמונה 7 ב מוצגת כרומטוגרמה המתקבלת מעמודה יעילה: שני השיאים מופרדים לגמרי.

(ב)

(א)



תמונה 7: השפעת רוחב הפיק על טיב ההפרדה.

קיימות מספר סיבות הגורמות להתרחבות של השיאים:  
 (1) דיפוזיה מולקולרית של המומסים בפאזה הנעה.

2) חלוקת המומסים בין שתי הפאזות (תלויה בין השאר במקדם החלוקה,  $K$ , ובמהירות הזרימה של הפזה נעה).

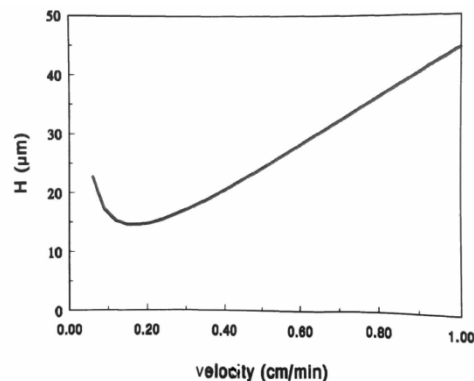
3) קווי זרימה שונים של הפאזה הנעה (בעמודה קיימים אזורים שונים בצפיפות אריזת החלקיקים דבר המוביל למהירויות זרימה שונות של הפאזה הנעה).

4) עקיפת חלקיקי אריזה הנמצאים בעמודה ע"י המולקולות של הפזה הנעה גורמת להאטה במהירות הזרימה של הפאזה הנעה. (מידת ההאטה תלויה בקוטר חלקיקי האריזה)

את כל ארבע הסיבות להתרחבות השיאים ניתן לחבר בנוסחה מתמטית אחת [11] המגדירה את גובהה התאורטי של פלטה,  $H$ , ומהווה מדד ליעילות העמודה.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad [11]$$

משוואה [11] נקראת משוואת ואן דימטר (van Deemter) והיא מציגה את ההשפעה של מהירות הזרימה של הפאזה הנעה,  $u$ , על הגובה של פלטה תאורטית (תמונה 8). האותיות  $A$ ,  $B$  ו- $C$  מבטאות את התרומות השונות להתרחבות הפיק.  $A$  מסמן את דיפוזיית אדי (Eddy Diffusion) התלויה באריזה של העמודה. לקבלת עמודה יעילה ו- $A$  מינימלי דרושים חלקיקים כמה שיותר קטנים.  $B$  הוא איבר הדיפוזיה המולקולרית לאורך העמודה (longitudinal molecular diffusion) והוא תלוי במקדם הדיפוזיה של המומס.  $C$  מבטא התנגדות למעבר מסות בפאזה הנייחת ובפאזה הניידת והוא תלוי בעובי הציפוי של הפזה הנייחת (ציפוי זה מכיל את הקבוצות הכימיות העוברות אינטראקציה עם המומס). השאיפה היא להגיע לערכים קטנים ככל הניתן כדי להקטין את הפרמטר  $H$ . כזכור, ככל ש- $H$  גבוה יותר המערכת הכרומוטוגרפית פחות יעילה.



תמונה 8: תלות של הגובה התאורטי של פלטה,  $H$ , במהירות הפזה הניידת



מטרת הכרומטוגרפיה היא להפריד את התערובת הנבדקת לקבוצה של שיאים כרומטוגרפיים כאשר כל שיא מייצג מרכיב בודד בתערובת. **רזולוציה**,  $R$ , היא מדד כמותי לדרגת ההפרדה בין שני שיאים כרומטוגרפיים נתונים (A ו-B) המוגדרת כ:

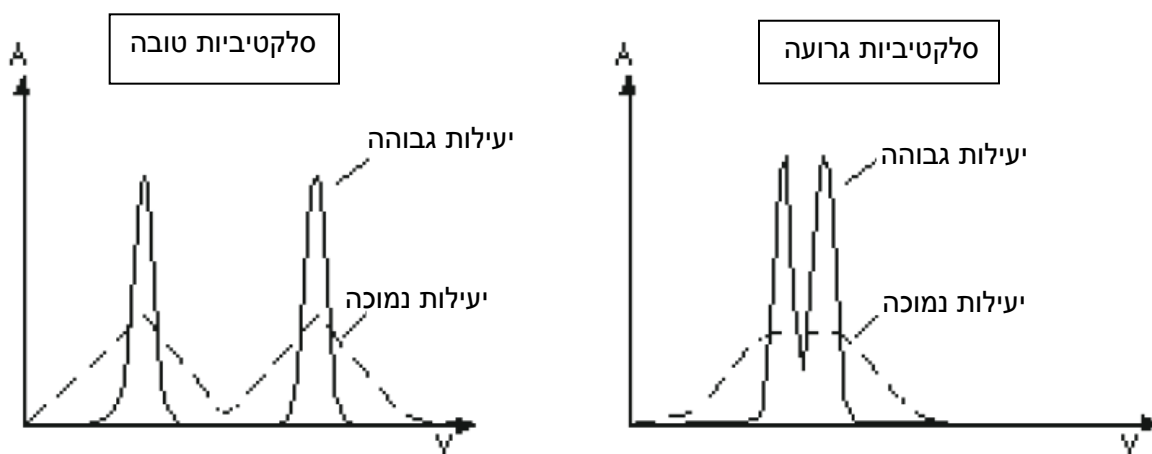
$$R = \frac{t_{r,B} - t_{r,A}}{0.5(w_B + w_A)} = \frac{2\Delta t_r}{w_B + w_A} \quad [12]$$

ככל ש- $R$  גדול יותר דרגת ההפרדה בין שני שיאים כרומטוגרפיים גדולה יותר. רזולוציה היא מדד כמותי ולכן היא מאפשרת לקבוע האם שינוי בתנאים הניסיוניים יוביל להפרדה טובה יותר. לפי נוסחה [12] ניתן לראות שאפשר לשפר את הרזולוציה ע"י הגדלת  $\Delta t_r$  או ע"י הקטנת  $w_A$  ו/או  $w_B$ . ניתן להגדיל את  $\Delta t_r$  ע"י הגדלת הסלקטיביות של העמודה. רוחב השיא הוא אפקט קינטי הנובע מתנועת המומס והאינטרקציות שלו עם הפאזה הנייחת ועם הפאזה הניידת וגודלו מושפע מיעילות העמודה. כאשר לשני שיאים יש זמן שהיה דומה ניתן להניח שרוחבם זהה ( $w_A \approx w_B$ ). במקרה זה ניתן להגדיר את הרזולוציה הכללית של המערכת הכרומטוגרפית,  $R_s$ . רזולוציה זו פרופורציונלית למכפלה בין הסלקטיביות, היעילות והקיבולת של המערכת- אשר הינם הפרמטרים החשובים ביותר לבקרה של כרומטוגרפית העמודה (משוואה [13]). במטרה לקבל רזולוציה טובה ניתן לשנות את הפרמטרים השונים ע"י שינוי בתנאי הניסוי.

$$R_s = 1/4 \underbrace{\frac{(\alpha - 1)}{\alpha}}_{\text{סלקטיביות}} \underbrace{(\sqrt{N})}_B \underbrace{\frac{k'_B}{(1 + k'_B)}}_{\text{יעילות}} \underbrace{\frac{k'_B}{(1 + k'_B)}}_{\text{קיבולת}} \quad [13]$$

לדוגמא, ניתן להגדיל את  $k'$  של רכיב ספציפי ע"י הגדלה בזמן השהייה שלו ואולם שינוי בזמן השהייה של רכיב אחד גורר הארכה בזמן השהייה של הרכיבים האחרים וכן מאריך את זמן המדידה. אחד הפתרונות לבעיה הוא כיוונון הדרגתי של פקטור הקיבולת לאורך הזמן. במילים אחרות, מתאימים את התנאים ההתחלתיים של הניסוי הכרומטוגרפי להגדלת הרזולוציה עבור מומסים עם זמן שהייה קצר. ככל שהפרדה מתקדמת התנאים בהם מתבצע הניסוי הכרומטוגרפי מוחלפים בצורה המקצרת את זמן השהייה של המומסים היוצאים אחרונים מהעמודה. ניסוי מעין זה ניתן לבצע בכרומטוגרפית GC בעזרת תכנון נכון של שינוי הדרגתי בטמפרטורת העמודה. בכרומטוגרפיה נוזלית ניתן להשיג את אותו אפקט בעזרת שינוי הדרגתי של קצב האלוציה או שינוי הדרגתי בהרכב האלואנט (המתבטא בעליה ביכולת האילוציה של האלואנט)- **אילוציה הדרגתית**.

לפי משוואה [13] ניתן לראות כי לסלקטיביות טובה ישנה השפעה גדולה יותר על הרזולוציה מאשר ליעילות גבוהה. תמונה 9 ממחישה את הטענה.



תמונה 9 : ההשפעה של הסלקטיביות ושל היעילות על הרזולוציה.

דרך אחרת לשפר את הרזולוציה היא ע"י שימוש בעמודות קפילריות שאינן מכילות חלקיקי אריזה אלא שדפנותיהן מצופות בשכבה דקה של פאזה נייחת. היעדרות של חלקיקי האריזה משמעותה שהפאזה הניידת יכולה לנוע דרך העמודה בליווי לחץ נמוך יחסית. כך ניתן לייצר עמודות ארוכות יותר בעלות מספר פלטות תאורטיות גבוה יותר מהעמודות המכילות חלקיקי אריזה בנוסף, שימוש בעמודות קפילריות שאינן מכילות חלקיקי אריזה מובילה לירידה בגובהן התאורטי של הפלטות,  $H$ , כתוצאה מהעלמות הפרמטר  $A$  התלוי באופי חלקיקי האריזה ומהקטנת ערכו של הפרמטר  $C$  (ראו משוואת ואן דימטר, 11). עמודות קפילריות משמשות בכרומטוגרפית GC ו-HPLC.

## כרומטוגרפיה יונית

היא שיטה אנליטית הכוללת שלוש תת-שיטות של כרומטוגרפיה נוזלית: החלפת יונים, הרחקת יונים וצימוד יונים. הניסוי שתבצעו במעבדה זו מתמקד בשיטת **החלפת יונים**, מכיוון שזו השיטה השימושית והנפוצה ביותר של כרומטוגרפיה יונית. החלפת יונים היא אחת השיטות הכרומטוגרפיות היעילות ביותר להפרדה וניקוי של חלבונים, פוליפפטידים, חומצות גרעין, פולינוקלאוטידים וביומולקולות טעונות אחרות. הסיבות להצלחה של שיטת החלפת יונים הן יכולת הפרדה טובה, קיבולת גבוהה ופשטות השימוש.

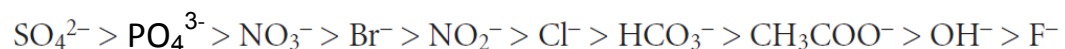
כמו בכל התהליכים הכרומטוגרפיים, החלפת יונים היא תהליך המערב תנועה מהירה של הדוגמא הנבדקת בין שתי פאזות – פאזה ניידת נוזלית (תמיסת האלוציה, האלואנט) ופאזה נייחת מוצקה. ככל שזמן השהיית היונים בפאזה הנייחת גדל, מהירות תנועתם דרך העמודה קטנה.

כרומטוגרפיית החלפת יונים משמשת להפרדת יונים וחומרים שיכולים לעבור יינון בקלות. סלקטיביות העמודה תלויה בעיקר בהבדלים בין המשיכה האלקטרוסטטית של היונים הנמצאים בפאזה הניידת (יוני המומס ויוני האלואנט) ליונים בעלי מטען נגדי הקשורים לפאזה הנייחת.

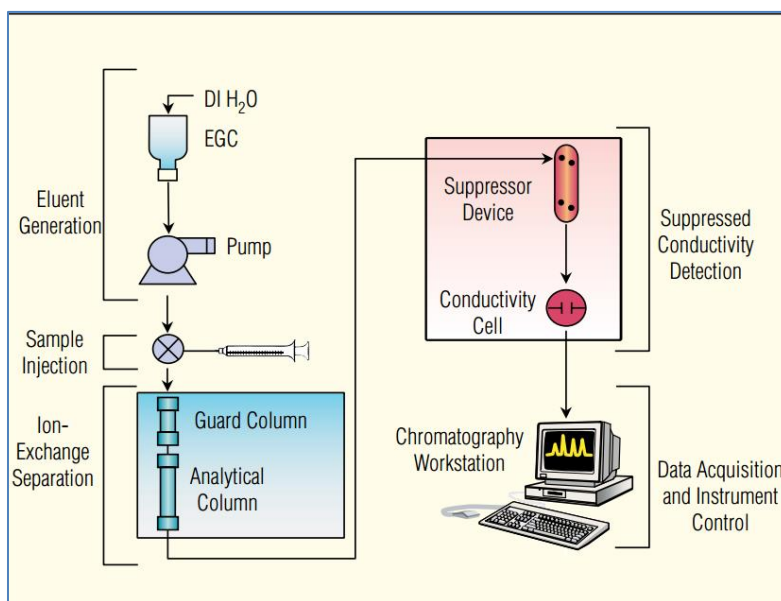
ישנם שני סוגים עיקריים של מחליפי יונים:

- כרומטוגרפיית החלפת קטיונים: יונים בעלי מטען חיובי נקשרים לשרף הטעון במטען שלילי.
- כרומטוגרפיית החלפת אניונים: יונים בעלי מטען שלילי נקשרים לשרף הטעון במטען חיובי.

הניסוי שתבצעו במעבדה הוא **כרומטוגרפיית החלפת אניונים** ולכן מכאן והלאה נתמקד בתיאור שיטה זו. שרף הוא פולימר בעל קשרים מצולבים המכיל קבוצות פונקציונליות טעונות. על פי רוב, בשיטת החלפת אניונים הקבוצות הטעונות הקשורות לפולימר הן נגזרות של הקטיון אמוניום רבעוני. הקבוצות הפונקציונליות האלו מקנות לשרף תכונות של מחליף אניונים חזק המסוגל לשמור על המטען החיובי שלו גם בתנאי בסיסיות גבוהה מאוד. ככל שמטען היונים (ובמקרה שלנו אניונים) גבוה יותר, כך הם נקשרים לשרף חזק יותר. בתוך קבוצה של יונים בעלי מטען זהה, היונים בעלי רדיוס ההידרטציה הקטן יותר נקשרים חזק יותר לקבוצות הפונקציונליות הטעונות שעל השרף. עבור מחליף אניונים חזק, סדר חוזק ההיקשרות הוא:



תיאור סכמתי של מערכת לכרומטוגרפיה יונית נתון בתמונה 10. תמיסת האלואנט נדחפת בלחץ גבוה לעמודה בעזרת המשאבה (Eluent Pump). לפני הגעתה לעמודה היא עוברת דרך שסתום ההזרקה (Injector). צריך להקפיד להזריק דוגמאות בעלות נפח זהה. היונים השונים עוברים בעמודה בקצב שונה וכל אחד מהם מגיע בנפרד ל- "סופרסור" (suppressor). תפקיד הסופרסור הוא כפול: דיכוי מבוקר של הסיגנל השייך ליונים של הפאזה הניידת ובמקביל הגברת הרגישות ליונים השייכים לדוגמה הנבדקת. הגלאי במכשיר שבו תשתמשו בניסוי (זהו הגלאי מהסוג הנפוץ ביותר) מודד את המוליכות של התמיסה שיוצאת מעמודת " הסופרסור".



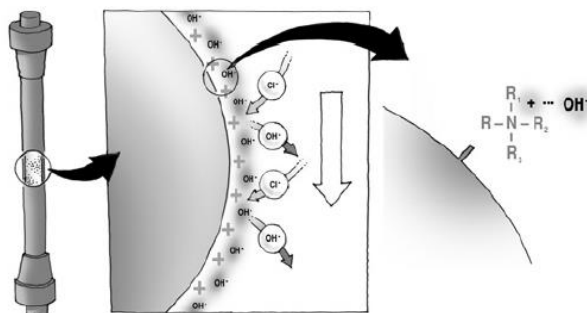
תמונה 10: תיאור סכמתי של מערכת כרומטוגרפיה יונית

**אלואנט** - האלואנט הוא תמיסה מימית של מלח או מספר מלחים שפועלת כבופר ומעבירה את הדוגמא דרך המערכת הכרומטוגרפית. כאשר אלואנט זורם דרך העמודה, האניונים מהאלואנט משמשים כיונים נגדיים לקטיון האמוניום הרבועוני שבשרף. כאשר עוברת דרך העמודה תמיסת אלואנט המכילה אניונים נוספים (השייכים לדוגמה הנבדקת), הם מתחרים על הקישור לקבוצות החיוביות שעל השרף. מהירות התקדמותם דרך העמודה תלויה בטיב התחרות הזאת. המאפיינים השונים של האלואנט משפיעים על טיב הביצוע של המערכת לכרומטוגרפיה יונית כמפורט בטבלה 1.

| השפעה על המערכת הכרומטוגרפית                                                                                                                                                      | מאפיין האלואנט                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| יכולת האלוציה (יכולת החלפת היונים) עולה עם העלייה בחוזק היוני של האלואנט                                                                                                          | חוזק יוני                                        |
| בד"כ הבחירה היא שה- pH של האלואנט יהיה גבוה יותר מאשר ה- $pK_a$ של המומסים. שינוי הדרגתי ב-pH יכול להשפיע לטובה על יכולת ההפרדה בגלל השפעתו על דרגת היוניזציה של היונים המופרדים. | pH                                               |
| שינוי בטמפ' משפיע על מקדם החלוקה ולכן משפיע על כושר ההפרדה.                                                                                                                       | טמפרטורה                                         |
| ככל שמהירות הזרימה גבוהה יותר כך גובה הפלטה התאורטית גדל (משוואת ואן דימטר). ולכן, אלוציה מהירה יותר מורידה את כושר ההפרדה (הרזולוציה).                                           | מהירות הזרימה                                    |
| ערך ה- $pK_a$ של האלואנט משפיע על כוח האלוציה שלו. קיבול הבופר צריך להיות גבוה מאחר ודרגת היוניזציה של יוני המומס ושל מרכיבי האלואנט מושפעת מה-pH.                                | $pK_a$ וקיבול של הבופר (המהווה את תמיסת האלוציה) |

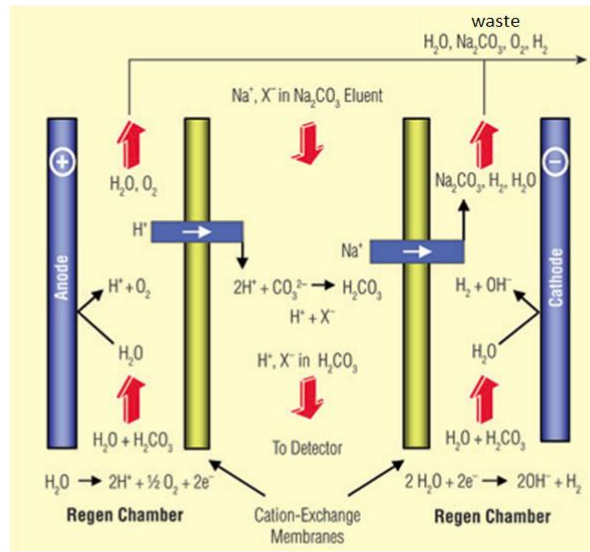
### טבלה 1: השפעה של מאפייני האלואנט השונים על הביצוע של מערכת לכרומטוגרפיה יונית

סוג האלואנט שנבחר לאנליזה ספציפית תלוי בסוג היונים שנרצה להפריד – אניונים או קטיונים. הבופר קרבונט/ביקרבונט ( $Na_2CO_3/NaHCO_3$ ) בריכוז נמוך (בסקלה של mM) נבחר כאלואנט סטנדרטי עבור אנליזת אניונים. יתרונו של בופר זה הינו הגמישות מבחינת חוזק יוני ו-pH.



תמונה 11: הצגה סכמתית של תהליך החלפה המתרחש בעמודה כרומטוגרפית כאשר תמיסה של יוני הידרוקסיד משמשת כאלואנט

שינויים בפרמטרים אלה מאפשרים לשפר את זמן השהיה ואת מידת הסלקטיביות של היונים השונים. לחילופין, ניתן להשתמש בתמיסת סודיום או פוטסיום הידרוקסיד כאלואנט (תמונה 11). האלואנטים האלה הם תמיסות מוליכות ולכן גורמים להופעה של סיגנל רקע בעת הגעתם לגלאי המוליכות. על מנת להקטין את מוליכות האלואנט מעבירים את האלואנט אל הסופרסור. בניסוי שלנו אנו משתמשים בסופרסור אלקטרוליטי אשר מסלק יונים חיוביים כדוגמת יוני אשלגן ויוני נתרן מהאלואנט העובר דרכו, ומחליף אותם ביוני הידרוניום הנוצרים ע"י אלקטרוליזה של מים. יוני ההידרוניום נקשרים ליוני הקרבונט (והביקרבונט) שבאלואנט ליצירת חומצה קרבונית.



### תמונה 12: עיקרון הפעולה של הסופרסור במערכת שלנו.

כתוצאה מכך, עקב הפיכתו של האלקטרוליט החזק (המכיל  $\text{NaHCO}_3, \text{Na}_2\text{CO}_3$ ) לאלקטרוליט החלש ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), מוליכות האלואנט המגיע אל הדטקטור נובעת בעיקר מהיונים הנבדקים. באופן זה רגישות המדידה ליוני המומס עולה וניתן לזהות יונים שונים בריכוזים נמוכים מאוד כמו 100ppb.

האלוציה הנפוצה ביותר היא **האלוציה האיזוקרטית**. בסוג זה של אלוציה האלואנט מתקדם דרך המערכת הכרומטוגרפית עם ריכוז והרכב קבועים. בניסוי שלנו אנו עובדים עם אלוציה איזוקרטית. סוג אחר של אלוציה היא אלוציה הדרגתית כאשר ריכוז של האלואנט משתנה תוך כדי הרצה בצורה הדרגתית. השימוש באלוציה הדרגתית יכול לשפר את יעילות ההפרדה ובו זמנית לקצר את זמן ההרצה במקרים בהם ליונים המופרדים יש הפרש גדול בזמני השהיה.

**מערכת הדטקציה** הקיימת ברוב המכשירים (גם במכשיר שלנו) לכרומטוגרפיה יונית מורכבת מתא מוליכות הבנוי משתי אלקטרודות שביניהן פוטנציאל קבוע. תוך כדי מעבר האלואנט (שהינו אלקטרוליט מוליך) דרך תא המוליכות, נמדדת מוליכותו. מוליכות התמיסה נקבעת לפי מספר גורמים

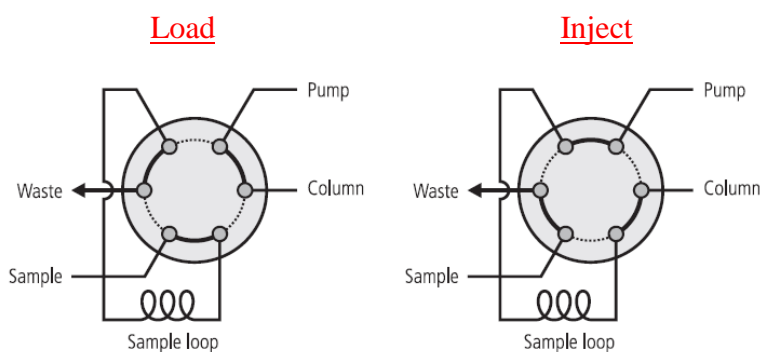
כמו החוזק היוני, סוג הצורונים הטעונים והטמפרטורה והיא כמובן פרופורציונלית לריכוז האלקטרוליט. גלאי מוליכות קלים להרכבה ולתפעול ועל פי רוב אוניברסליים לשימוש.

סוג אחר של גלאי הוא גלאי אלקטרוכימי המכיל תא אמפרומטרי. במקרה זה פוטנציאל מסוים קיים בין אלקטרודה עובדת (שהינה אינרטי) הממוקמת בתא המדידה לאלקטרודת יחוס. כאשר אלואט עובר דרך התא מתרחשת תגובת חמצון-חיזור על פני האלקטרודה העובדת והזרם הנוצר נמדד כתלות בזמן. גלאי זה רגיש מאוד אבל בין חסרונותיו הוא מודיפיקציה של האלואט (אין אופציה לרגרציה של המומסים) ודרישותיו לניקיון גבוה מאוד של האלואנט (ללא שאריות של מתכות, חמצן וכו').

גלאי בליעה מסוג UV/VIS הוא פחות נפוץ עבור מערכות של כרומטוגרפיה יונית אבל יכול להיות שימושי אם המומסים בולעים בתחום זה.

לפני **הזרקה** כל הדוגמאות צריכות לעבור סינון דרך מסנן עדין בעל גודל נקבוביות של 0.45 מיקרון (הקרוי סביבון).

הכנסת נפח הדוגמה בצורה מדויקת לעמודת הפרדה נעשית בעזרת שסתום ההזרקה (injection valve). לשסתום ההזרקה שני מצבים (ראה תמונה 13) : העמסה (load) והזרקה (inject). במצב העמסה, הדוגמה ממלאת את "לולאת הדוגמה" ואילו האלואנט עובר לקולונה דרך מעקף כך שהוא אינו פוגש בדוגמה. כאשר המערכת מועברת למצב הזרקה, האלואנט יעבור דרך "לולאת הדוגמה" ויעביר את הדוגמה לקולונה. ע"י שינוי נפח "לולאת הדוגמה" ניתן לשנות את נפח הדוגמה המוכנסת לקולונה. במערכות כרומטוגרפיה יונית סטנדרטיות נפח "לולאת הדוגמה" נע בין 20-100 $\mu$ L.



**תמונה 13: תיאור סכמתי של שסתום ההזרקה (injection valve)**

כמו בכל שיטה כרומטוגרפית, מילות המפתח עבור קבלת הפרדה טובה תוך זמן מדידה קצר הן יעילות, קיבולת וסלקטיביות.

**יעילות**- מערכת כרומטוגרפית יעילה מתבטאת בשיאים גבוהים וחדים. היעילות תלויה בעיקר בעמודה שנבחרה לניסוי.

**קיבולת**- היכולת של מערכת כרומטוגרפית לקלוט דוגמאות של תערובות יונים בעלות טווח רחב של ריכוזים. קיבולת השרף מוגדרת כמספר הקבוצות הפונקציונליות ליחידת מסה של הפאזה הנייחת (meq/g).

**סלקטיביות העמודה**- הסלקטיביות מתייחסת ליכולת להפריד בין יונים שונים. היא תלויה בטיב האינטרקציות בין היונים ביניהם יש להפריד לבין הקבוצות הפונקציונליות שעל השרף. אינטרקציות אלו מושפעות ממטען היונים, רדיוס ההידרטציה שלהם, הרכב האלואנט ה pH, הטמפרטורה והחוזק היוני. במערכת כרומטוגרפיה יונית ניתן לשנות תנאים אלה בקלות כדי לקבל רזולוציה גבוהה.



**מטרות הניסוי**

1. ללמוד את העקרונות, התפעול והיישומים של טכניקת הכרומטוגרפיה היונית (IC).
2. בניית עקומת כיוול.
3. מציאת ריכוז וזהות אניונים בתמיסת נעלם.
4. מציאת ריכוזי אניונים במים מינרלים מסחריים.
5. בדיקת השפעת מהירות הזרימה של תמיסת האלוציה על טיב ההפרדה.

**מהלך הניסוי**

**כל התמיסות חייבות לעבור סינון דרך סביבון לפני הזרקתן לתוך העמודה. עיבדו לפי הרשום בקובץ הוראות העבודה המצורף.**

**1. יצירת עקומת כיוול**

קבלו מהטכנאית 15 מ"ל של תמיסה המכילה שבעה אניונים בריכוז ידוע (ראו טבלה 2) (תמיסה זו תקרא להלן dilutionx1). בבקבוקי מדידה של 5 מ"ל בצעו מהילות של התמיסה הנ"ל במים מזוקקים בעלי התנגדות של 18 מגה אוהם, לקבלת שלוש תמיסות מהולות בהם הריכוזים יהיו פי 0.4, 0.6, 0.8 מהריכוזים ההתחלתיים המופיעים בטבלה 2.

| ריכוז<br>ppm | האניון הנבדק                  |
|--------------|-------------------------------|
| 2.0          | F <sup>-</sup>                |
| 10.0         | Cl <sup>-</sup>               |
| 10.0         | Br <sup>-</sup>               |
| 10.0         | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  |
| 10.0         | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  |
| 20.0         | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |
| 10.0         | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> |

**טבלה 2: ריכוזי היונים השונים בתמיסה המרוכזת**

**קעת עליכם לעבוד במכשיר היום כרומטוגרף לפי ההוראות המצורפות.**

**2. גילוי זהות וריכוז יונים בתמיסת נעלם**

תבצעו הזרקה של תמיסת נעלם שתקבלו מהטכנאית (תערובת של 3 אניונים בריכוזים לא ידועים). על סמך התוצאות הניסיוניות תקבעו את זהותם ואת ריכוזם של האניונים בנעלם.

**3. קביעת ריכוז אניונים במים מינרלים מסחריים.**

בצעו הזרקה של מים מינרלים לשתייה. בעזרת עקומת הכיול שהכנתם בחלק 1, חשבו את ריכוזי היונים במים והשוו אותם לריכוזים המופיעים במפרט שעל הבקבוק.

**4. בדיקת ההשפעה של מהירות הזרימה.**

עליכם להכין 100 מ"ל תמיסה המכילה כ- 2ppm נתרן ברומט  $\text{NaBrO}_3$  וכ- 25ppm נתרן כלוריד  $\text{NaCl}$ . לרשותכם שני בקבוקי מדידה של 100 מ"ל.

הערה: אין לשקול פחות מ 20 mg של כל אחד מהמלחים.

עליכם להיכנס לקובץ הנקרא flow rate הנמצא בתיקייה students. בקובץ זה קיימות שלוש תכניות הרצה שונות. בכל אחת מהתכניות קיימת מהירות הרצה שונה. עליכם להזריק את התמיסה שלוש פעמים, כל פעם בתכנית אחרת.

**עיבוד התוצאות**

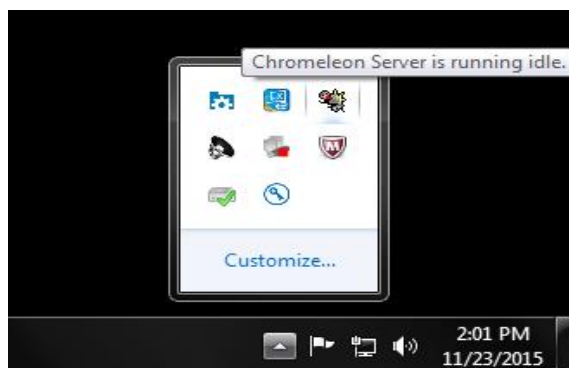
בסוף הניסוי תשמרו את כל קבצי התוצאות שלכם בפורמט ASCII. כל קובץ מכיל מידע עבור הרצה אחת. מתוך התוצאות תוכלו למצוא את השטחים שמתחת לפיקים השונים ולפיהם תוכלו לשרטט עקומת כיול לכל אניון וכן לחשב את ריכוזי היונים בתמיסות השונות. את הקבצים תשלחו לעצמכם במייל.

**מה צריך להופיע בדו"ח?**

- 1) עקומות הכיול של כל אחד מהיונים עם טבלת הנתונים המתאימה לכל אחד מהם.
- 2) כרומטוגרמות של תמיסת האם ( $\text{dilution} \times 1$ ), תמיסת הנעלם והמים המינרלים.
- 3) חישוב ריכוזי היונים השונים בתמיסת הנעלם ובמים המינרלים. השוואה למפרט הקיים על הבקבוק.
- 4) כרומטוגרמות של התמיסה המכילה יוני ברומט ויוני כלוריד בשלוש מהירויות זרימה והסבר להבדל ביניהן.

## הוראות עבודה במכשיר ICS-1600 Thermo

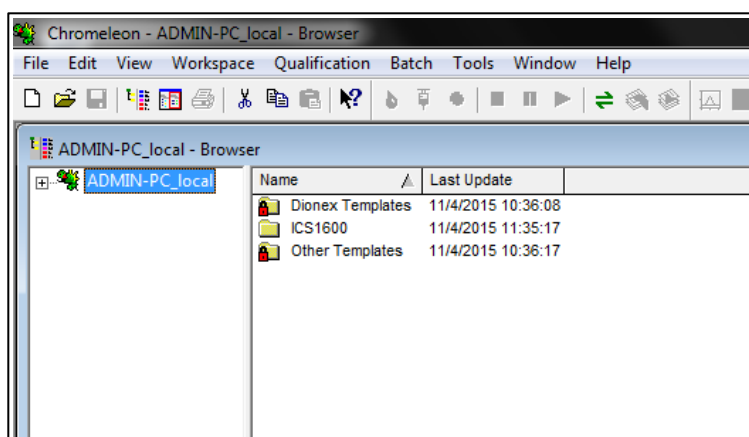
1. לאחר הדלקת המחשב יש לבדוק מצד ימין למטה האם רשום Chromeleon Server is Running idle כפי שניתן לראות בחלון הבא:



### חלון מס 1א.

והיה ולא, הרי שיופיע איקס אדום על סמליל התוכנה יש ללחוץ בעכבר על מקש ימני ולבחור .start server

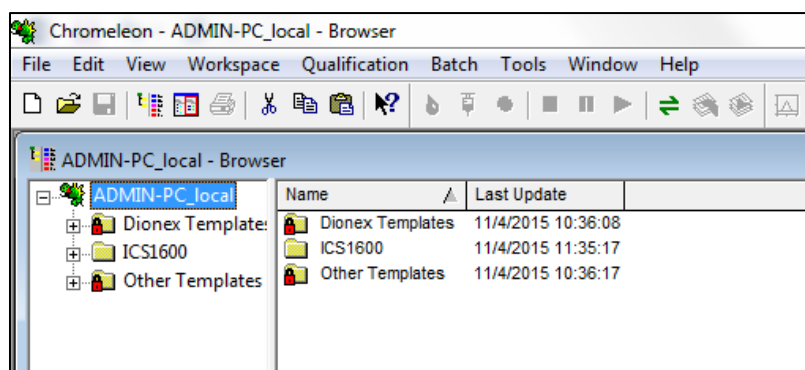
2. פותחים את התוכנה ע"י לחיצה על הסמליל Chromeleon . נפתח חלון מס 1ב .



### חלון מספר 1ב

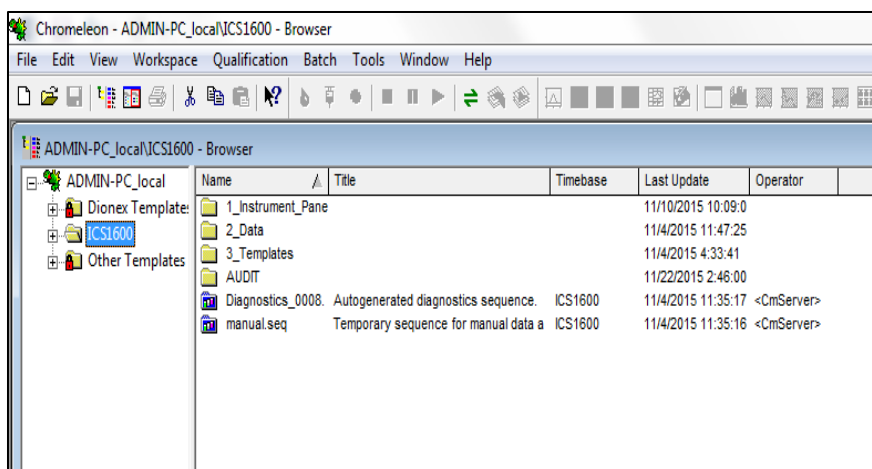
חלון 1 ב הינו חלון הדפדפן (browser). זהו אזור בתוכנה המטפל בכל הקבצים, כמו קבצי עבודה, קבצי שיטות וכו'.  
הספרייה בה אנו נעבוד נקראת ics1600.

לוחצים על ה-"+" שמשמאל לספרייה ADMIN PC LOCAL לפתיחת תתי הספריות הנמצאים בה. נפתח חלון מס 2.



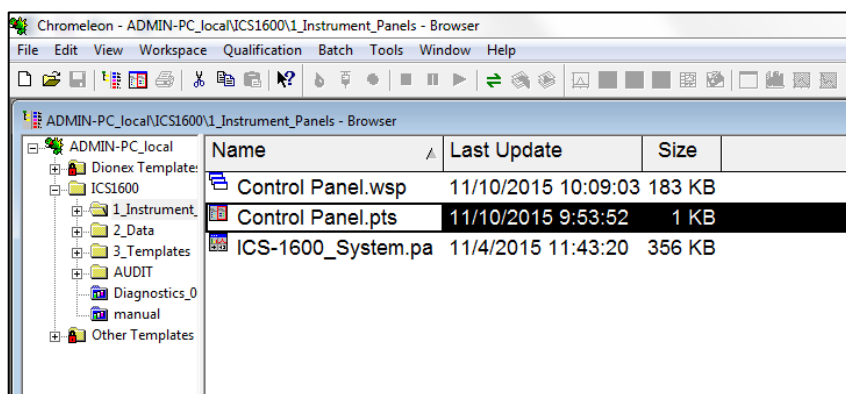
## חלון 2

נכנסים לתוך התיקיה ics 1600 (להלן חלון 3)  
בתוך התיקיה ics1600 נמצאות 3 תתי ספריות.  
הראשונה נקראת instrument panels כאן נשמרים קבצים המתייחסים לבקרה על המכשיר.  
השנייה נקראת data כאן נשמרות תוצאות המדידה.  
השלישית נקראת templates כאן נשמרות תבניות (שבלונות) המתייחסות לצורת הצגת הדו"ח, לתנאי הניסוי ולעיבוד הנתונים (שיטת האינטגרציה).



### חלון 3

לאחר פתיחה ע"י דבל קליק של תת הספרייה instrument panels מתקבל חלון 4. בוחרים את Control panel.pts. ואז נפתח חלון 5.



### חלון 4

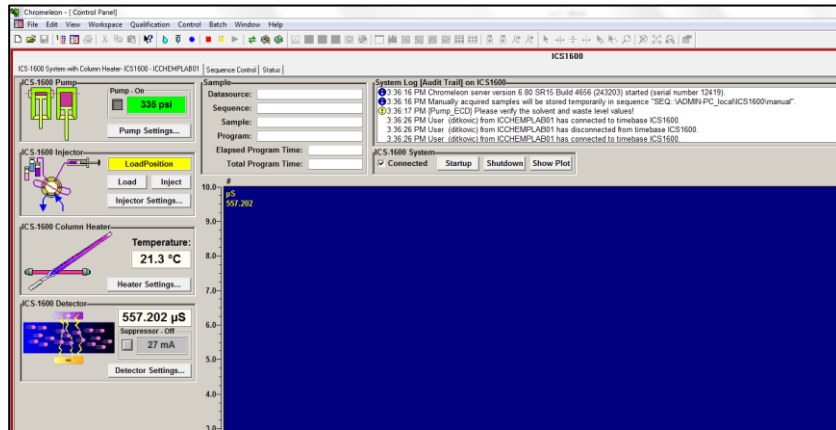
3. בחלון של Control panel.pts (חלון 5) ניתן לשלוט על החלקים של המכשיר ולהפעיל ידנית הרצה.

בחלון 5 בו ניתן לראות את החלקים הבאים:

מצד שמאל מלמעלה למטה

שליטה על המשאבה, שליטה על ההזרקה, שליטה על הקולונה ושליטה על הגלאי.

בחלון הכחול נראית המוליכות הנמדדת בגלאי כתלות בזמן

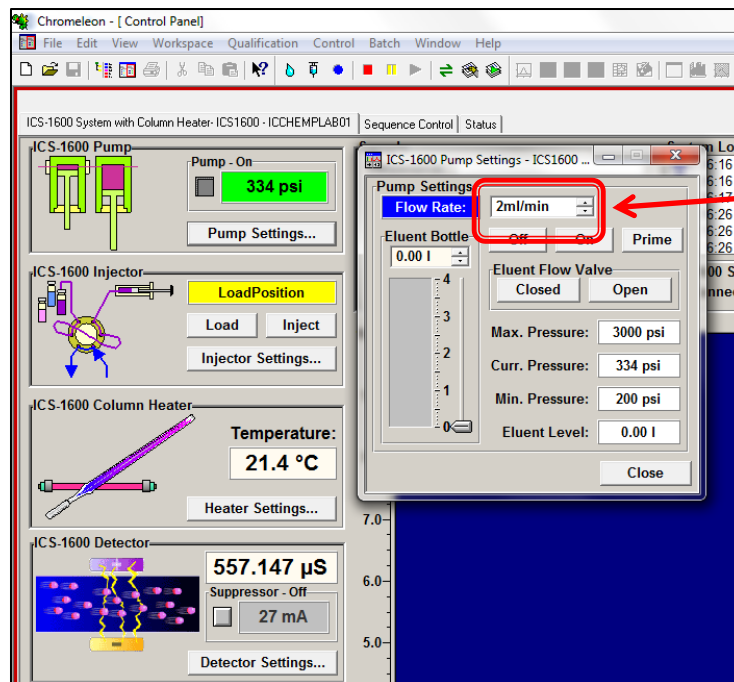


### חלון 5

בחלון 5 מתחילים בהכנסת הפרמטרים לפי הסדר הבא:

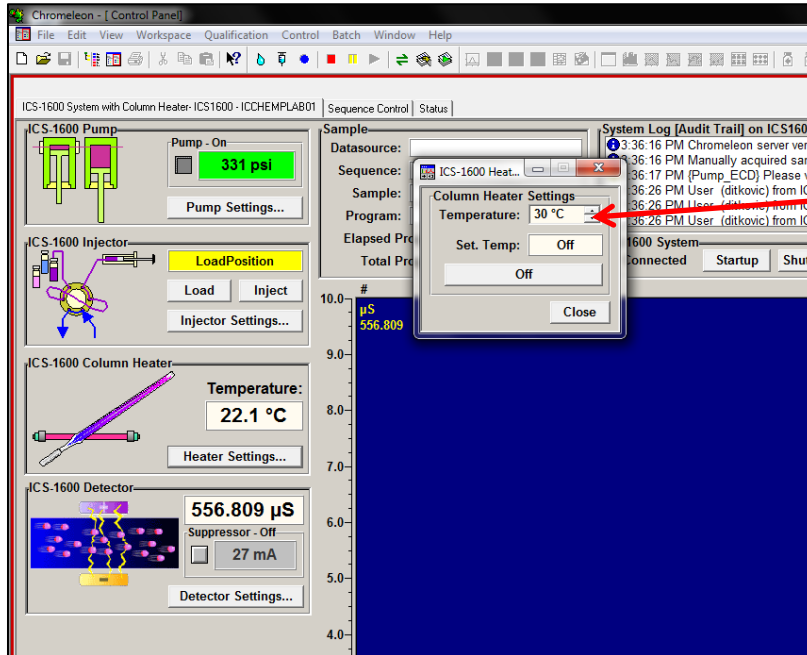
לוחצים על pump settings ובו משנים את ה-flow rate ל- 2 מל לדקה (ע"י הקלדה). ראו

חלון 6



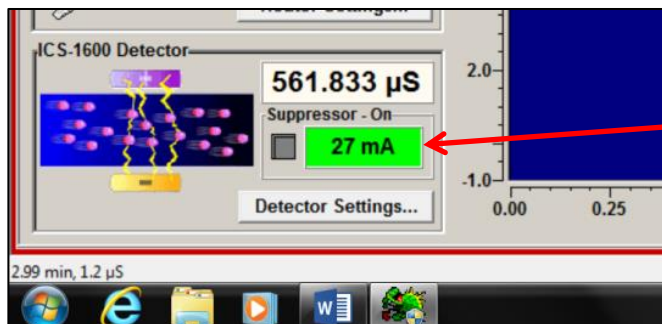
### חלון 6

ממשיכים בשליטה על חימום הקולונה. נכנסים ל-Heater Settings מקלידים  $30^{\circ}\text{C}$  ו-enter (ראה חלון 7)



## חלון 7

הגלאי דלוק כל זמן שהמכשיר עובד. כדי להפעיל את הסופרסור יש ללחוץ על הריבוע האפור שנמצא משמאל לערך הזרם. בלחיצה, רקע המלבן עליו רשום ערך הזרם העובר בסופרסור, נצבע בירוק. והכתובת suppressor on מופיעה. ראו חלון מספר 8.



## חלון 8

כרומטוגרפיה יונית

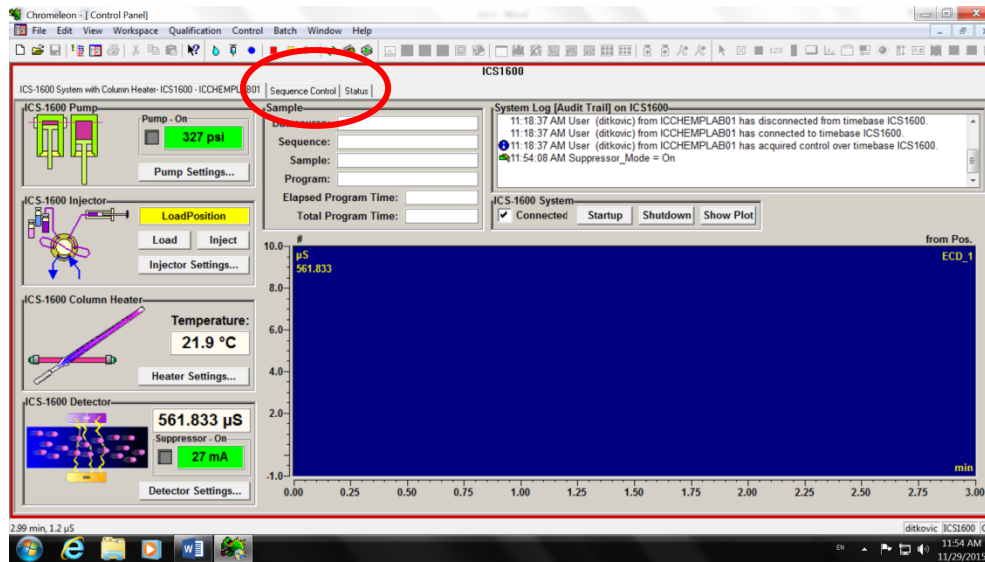
ניתן להכנס אל Detector settings ולשנות את הזרם בסופרסור . כמו כן כאשר מתייצבת קריאת המוליכות של תמיסת האלואנט (בלנק ) ניתן ללחוץ על Auto zero על מנת להעביר את הגרף אל סביב ה-0 (ראה חלון 9).

The screenshot shows the ICS-1600 software interface. On the left, there are three main sections: ICS-1600 Injector (with LoadPosition, Load, Inject, and Injector Settings... buttons), ICS-1600 Column Heater (with Temperature: 23.4 °C and Heater Settings... button), and ICS-1600 Detector (with 557.039 µS, Suppressor - Off, 27 mA, and Detector Settings... button). On the right, there is a graph showing a signal value of 557.039 µS. A settings dialog box titled 'ICS-1600 Detector Settings - ICS1600 - ICCHEMPLAB01' is open, displaying various parameters: Autozero (Acq. Ready), Total Cond: 571.55005 µS, Signal: 557.03876 µS, Data Rate: 5.0 Hz, Cell Temp: 35.0 °C, Supp. Type: ASRS\_4mm, Supp. Current: 0 mA, and Supp. Mode: Off. Two red arrows point from the text below to the 'Autozero' and 'Supp. Current' fields in the settings dialog.

חלון 9

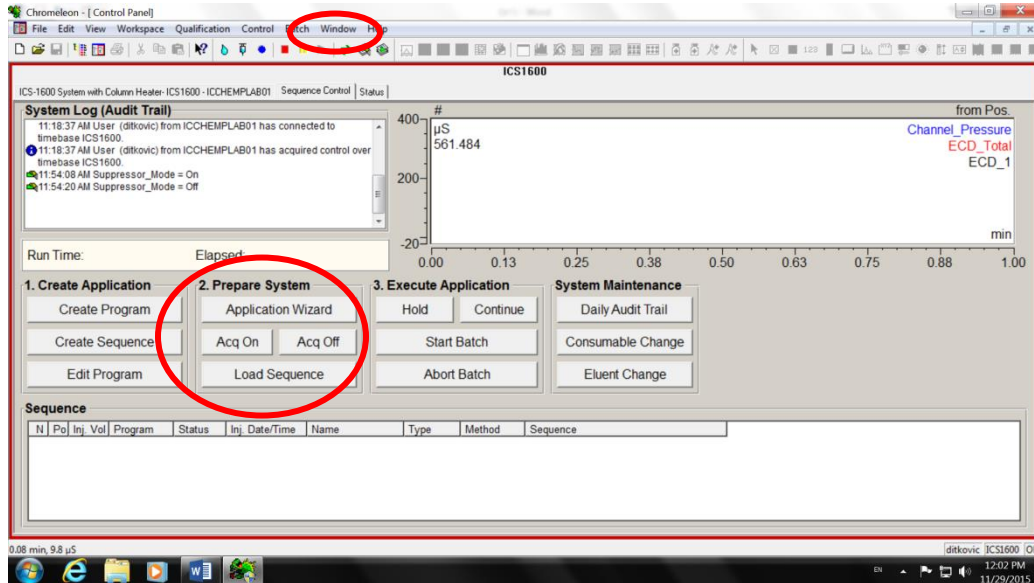
לאחר קביעת כל הפרמטרים הנ"ל נכנסים אל השונית sequence control הנמצאת בחלק העליון של המסך (ראה חלון 10).





חלון 10

נפתח חלון הבא :

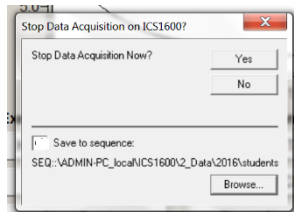


חלון 11

בחלון 11 ממוספרים כל השלבים לביצוע מדידה. מומלץ להתחיל בשלב 2 (Prepare system) וללחוץ על הלחצן **Acq on** (ובחלון שמופיע אחר כך יש ללחוץ o.k) זאת על מנת שנוכל לצפות במוליכות הבלנק. בד"כ לוקח כ-30 דקות עד אשר מוליכות הבלנק מתייצבת סביב ה-0. תוך כדי מדידת מוליכות הבלנק הולכים ללשונית window הנמצאת בסרגל הכלים למעלה ובה בוחרים ב-Browser... 1. בדרך זו חוזרים לחלון הדפדפן במטרה לראות מה מכיל רצף ההזרקות בו תשתמשו בהמשך.

בחלון הדפדפן נכנסים לתיקיות מצד שמאל לפי הסדר הבא: Data ואז 2016 ואז students. בתיקיית students בוחרים את group... ואז את sequence for students. נפתח חלון המתאר את ה sequence הרצוי המכיל 4 הזרקות רצופות. בודקים שבעמודת ה- Status מופיעה המילה **single** (משמעותה הזרקה חדשה) אם לא, הרי שניתן לבחור את ה Status המתאים ע"י לחיצה על הכפתור השמאלי בעכבר כשהוא מכוון למשבצת המתאימה. לאחר מכן לוחצים על כפתור save (דיסקט) לשמירת השינויים.

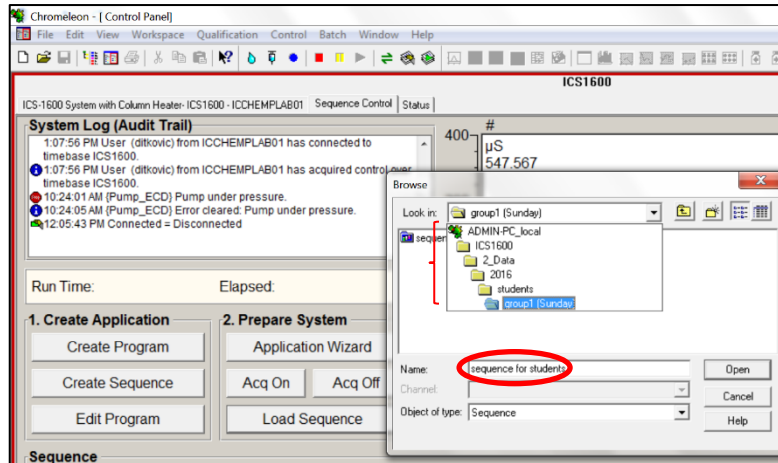
לאחר שהמוליכות של הבלנק מתייצבת סביב האפס, עוצרים את הרצת הבלנק ע"י לחיצה על Acq off. כעת יפתח חלון בו תבחרו את הרצף שעבורו ישמר הבלנק ותלחצו yes. ראו חלון 12.



## חלון 12

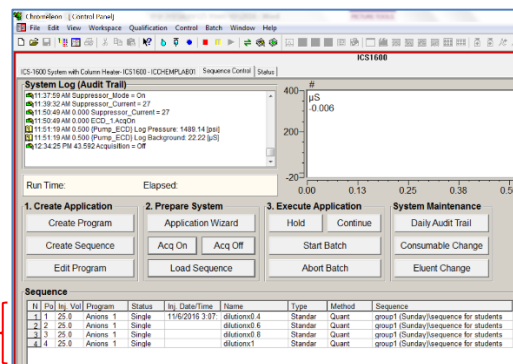
4. לאחר מכן לוחצים על הלחצן Load sequence (חלון 11). בחלון שנפתח בוחרים את התיקייה בה נמצא קובץ המכיל את רצף הדוגמאות הדרוש. ראו חלון מספר 13

ניתן לבנות קובץ חדש עם שיטה חדשה, ואולם אתם תשתמשו בקובץ שהוכן עבורכם מראש, אשר נקרא sequence for students ומכיל רצף הזרקות לבניית עקומת כיוול.



### חלון 13

לאחר שתפתחו את הקובץ המתאים, בחלקו התחתון של חלון 11 תופיע רשימה של רצף הדוגמאות שעליכם להזריק. ראו חלון 14



### חלון 14

#### 5. הזרקת הדוגמא

בשלב זה מתכוננים להזרקה. ממלאים מזרק של 1ml מחברים אליו סביבון ומכניסים אותו לתוך פתח ההזרקה. לאחר מכן עוברים לשלב 3- execute application (ראו חלון 11) ולוחצים על **Start Batch**. מיד מופיע חלון המודיע על כך שצריך להזריק דוגמא. בזריזות, מזריקים כ-0.4ml תמיסה (יש להשאיר מעט תמיסה במזרק) ולוחצים ok. ברגע זה השורה של הדוגמא הנבדקת נצבעת בצבע ירוק. את המזרק יש להשאיר נעוץ בפתח ההזרקה עד להזרקה הבאה.

כרומטוגרפיה יונית

בסיום ההרצה של הדוגמא הראשונה מתקבלת כתובת עם בקשה להזריק את הדוגמא הבאה.  
**חשוב! בכל פעם שמתקבלת כתובת עם בקשה להזריק את הדוגמא הבאה יש לכם 30 שניות**  
**(ולא יותר) בהן ה loop פתוח לקבלת הדוגמא הבאה, לכן צריך להיות מוכנים להזרקה**  
**הבאה כבר לקראת סיום ההרצה של הדוגמא הרצה.**

- לאחר שסיימתם להזריק את כל הדוגמאות לעקומת הכיול יש לשטוף את לולאת ההזרקה ע"י הכנסת 1 מ"ל של מים מזוקקים בעלי התנגדות גבוהה (18מגה אוהם).

6. כעת עליכם להוסיף הזרקות בודדות לקובץ ההזרקות הקיים שנקרא

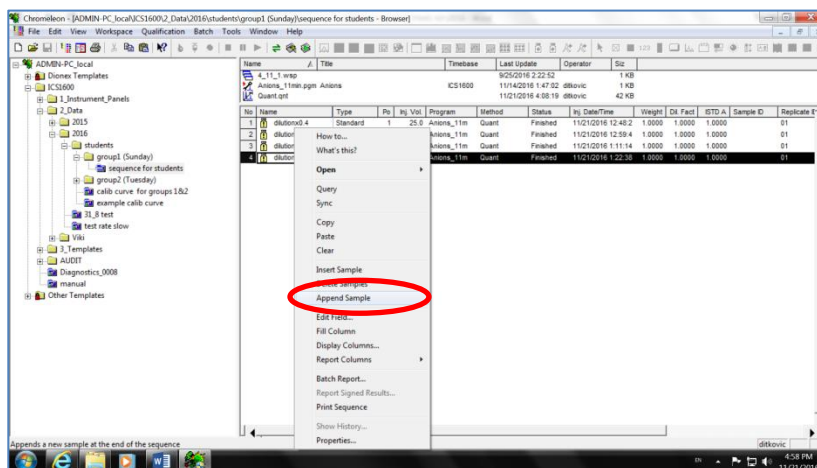
. Sequence for students

כדי להוסיף הזרקות בודדות לרצף הקיים יש לנקוט בצעדים הבאים:

(א) מתחת ל window יש לבחור את חלון הדפדפן (browser) ושם להיכנס לקובץ Sequence for students

- במקרה ולא מופיעה האופציה לבחור את חלון הדפדפן עליכם ללכת אל file ושם לבחור open ובחלון שנפתח לבחור את המסלול המתאים עד שתגיעו אל Sequence for students כפי שניתן לראות בחלון 13 – שימו לב לבחור את הקבוצה שמתאימה לכם.

(ב) משחירים את השורה האחרונה ברצף הקיים, לוחצים על המקש הימני בעכבר ובחרים append sample. כפי שניתן לראות בחלון הבא (חלון 15):



## חלון 15

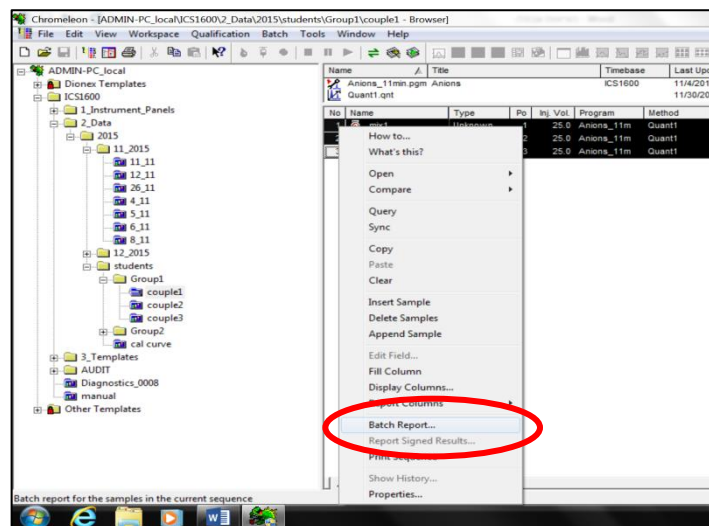
השורה האחרונה מוכפלת ובה יש לשנות את השם ( Name ) ואת הסוג ( Type ). את השם משנים לפי בחירה , למשל neelam1 ואת הסוג משנים ל-Unknown . לאחר מכן יש לעשות save . כעת חוזרים לחלון ה-Control panel ושם לוחצים על Load sequence . נפתח החלון בו יש לבחור את הרצף המתאים. לאחר הבחירה מופיע בחלון Control panel הרצף הנבחר ובו נמצאת השורה האחרונה שהוספנו. תוכלו לראות שרק שורה זו מופיעה עם הסטטוס single . על מנת לבצע הזרקה יש לעקוב אחר ההוראות הרשומות בסעיף 5 . שימו לב, כאשר נלחץ על Start batch רק השורה הזו תצבע בירוק ולכן תוצאות ההזרקה ישמרו עבורה.

#### 7. השפעת מהירות זרימת האלואנט על טיב ההפרדה של הפיקים בכרומטוגרמה.

על מנת לבדוק את השפעת שינוי מהירות הזרימה על טיב ההפרדה עליכם להשתמש בקובץ FLOW RATE הנמצא בתיקיית students . בקובץ זה ישנו רצף של שלוש הזרקות במהירויות זרימה שונות. עליכם להזריק את התמיסה שהכנתם (המכילה יוני ברומט ויוני כלוריד) בהתאם להוראות המופיעות בסעיף 5 ( הזרקת הדוגמא).

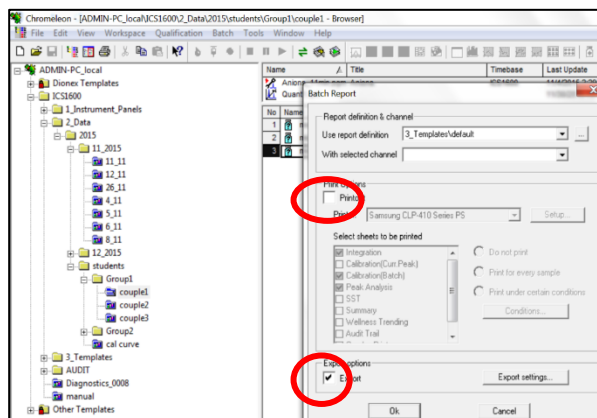
#### 8. שמירת התוצאות

בסיום רצף ההזרקות בוחרים את שורות הרצף ( sequence ) שאותן רוצים לשמור (לאחר הבחירה השורה מושחרת). לוחצים על הכפתור הימני בעכבר ובחלון שמופיע בוחרים את Batch report (ראה חלון 16)



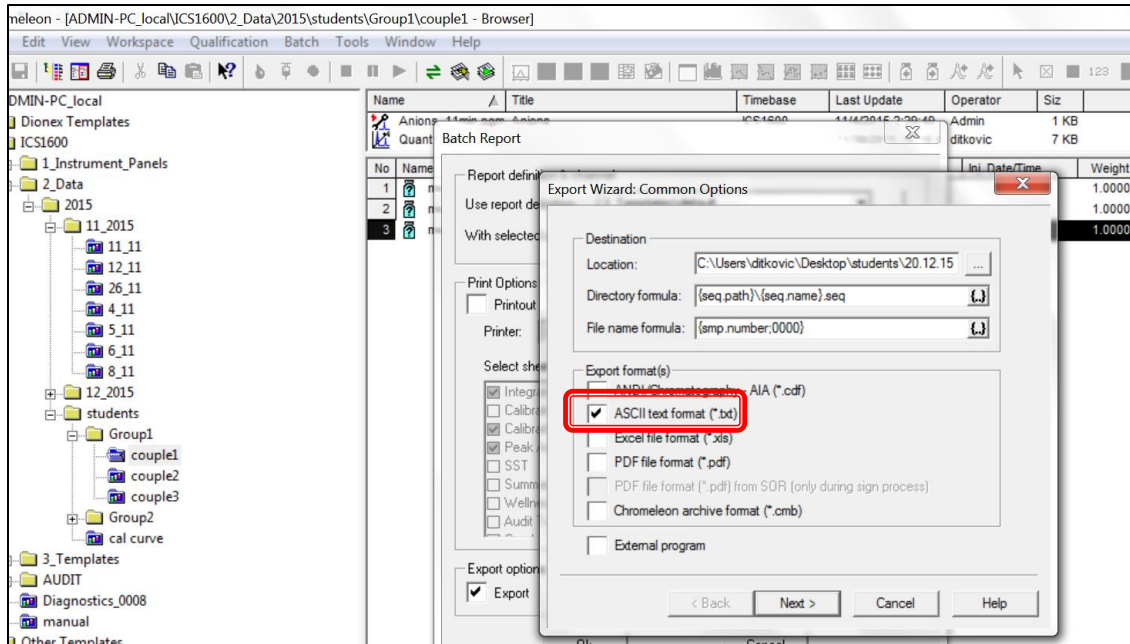
חלון 16

נפתח חלון בשם Batch report (ראה חלון 17) בו יש להוריד את הסימון  
 מ-Print out ולסמן את Export.



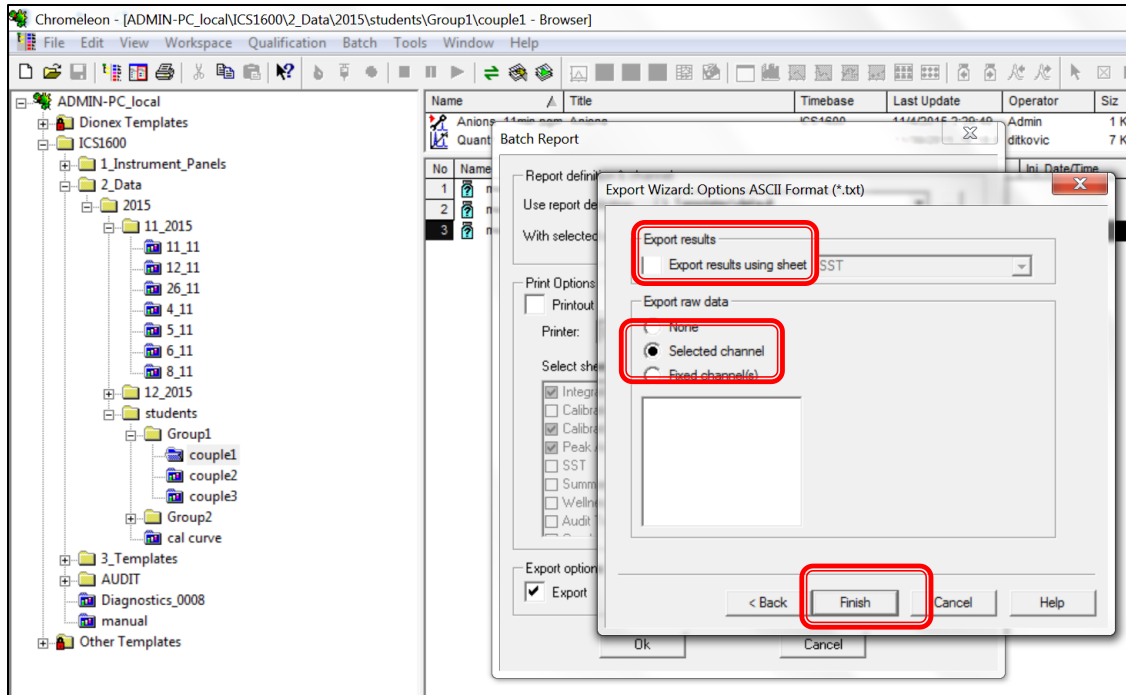
## חלון 17

מיד נפתח חלון נוסף Export Wizard: Common Options (ראה חלון 18)  
 בחלון זה צריך לוודא שהקובץ ישמר בכתובת  
 C:\Users\Public\Public Desktop\students data 2016\Sunday or Tuesday\  
 calibration curve or mineral water or unknown or flow rate  
 יש לסמן פורמט של הקובץ (\*txt) ASCII text format ואז ללחוץ Next



## חלון 18

כעת נפתח החלון האחרון : Export Wizard: Option ASCII format (ראה חלון 19) בו יש להוריד את הסימון מ-Export results, לסמן ב Export raw data את Selected channel וללחוץ על Finish. כעת לוחצים על OK בחלון Batch report ושוב OK בחלון הבא. את תוצאות המדידה ששמרתם על שולחן העבודה עליכם לשלוח לעצמכם במייל.



## חלון 19

### 9. בסיום יום העבודה

- יש לשטוף את לולאת ההזרקה ע"י הכנסת מים מזוקקים בעלי התנגדות גבוהה (18 מגה אוהם).
- בחלון ה Control panel (חלון 10) יש:
  - לכבות את הסופרסור
  - ללחוץ off על חימום הקולונה
  - לשנות את קצב הזרימה ל-0.4 מ"ל/דקה
  - להוריד סימון Connected
- לסגור את התוכנה