

## ITP stanovení aminopolykarboxylových kyselin

### 1. Princip

Izotachoforéza (ITP) je elektromigrační separační metoda, která umožňuje dělení aniontů (popř. kationtů) na základě jejich rozdílné **efektivní pohyblivosti**  $u_{ef}$  ve stejnosměrném elektrickém poli o vysokém napětí. Pracuje se při konstantním proudu, řádově se jedná o několik desítek  $\mu\text{A}$ .

Efektivní pohyblivost je rychlost pohybu nabitých částic v jednotkovém elektrickém poli odpovídající jejímu stupni disociace  $\alpha$ . Je ovlivněna hodnotou pH prostředí.

Hlavní rozdíl mezi izotachoforézou a jinými elektroforetickými metodami je, že izotachoforéza pracuje se dvěma elektrolyty – **vedoucím LE** (jeho hodnota efektivní vodivosti je nejvyšší) a **koncovým TE** (jeho ionty mají nejnižší efektivní pohyblivost). Vzorek analytu se dává na rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Pro aniony A, B, C přítomné v analytu platí:

$$u_{TE} \leq u_A \leq u_B \leq u_C \leq u_{LE} \quad (1)$$

Správná volba elektrolytů a jejich pH rozhoduje o rozdělení iontů do zón a proto je velmi důležitá pro správné provedení analýzy [1].

Během jednoho stanovení lze separovat buď pouze anionty nebo pouze kationty, nikdy obojí dohromady.

Výsledný záznam izotachoforézy se nazývá **izotachoforegram** a tvoří jej jednotlivé **zóny**, které obsahují vždy jeden druh iontů. Tyto zóny procházejí kapilárou stejnou rychlostí až do místa detekce. Jejich délka odpovídá koncentraci samostatných iontů a je důležitou složkou, jak pro kvalitativní analýzu (určení pomocí její výšky), tak pro kvantitativní analýzu (určení pomocí její délky – čím delší zóna, tím koncentrovanější roztok).

Ostré oddělení jednotlivých zón lze vysvětlit pomocí tzv. samozaostřujícího efektu: opustí-li ion analytu A svoji zónu v důsledku difúze a přejde do zóny

vedoucího elektrolytu LE, dostane se do oblasti menší intenzity pole. V poli se sníží jeho rychlost a ion se vrátí zpět do své vrstvy. Stejně tomu je i v případě přechodu iontu analytu do zóny koncového elektrolytu TE. Zde dojde k urychlení iontu A, protože v zóně TE je vyšší intenzita elektrického pole – tím vznikají ostrá rozhraní mezi zónami [2,3].

V každé zóně je intenzita elektrického pole i koncentrace každého iontu konstantní a je určena složením koncentrací vedoucího elektrolytu. Proto platí Kohlrauschova rozdělovací funkce [1]:

$$\frac{c_A}{c_{LE}} = \frac{u_A(u_{LE} + u_K)z_A}{u_{LE}(u_A + u_K)z_{LE}} \quad (2)$$

kde

- $u_{LE}$  ... pohyblivost aniontu vedoucího elektrolytu
- $u_K$  ... pohyblivost kationtu
- $u_A$  ... pohyblivost anionu tvořícího zónu
- $z_A, z_{LE}$  ... nábojová čísla anionů v zóně a ve vedoucím elektrolytu
- $c_A, c_{LE}$  ... jejich koncentrace, pro které platí  $c_A = c_{LE} \cdot \text{konst}$

Správnou volbou koncentrace vedoucího elektrolytu lze prodloužit nebo zkrátit zóny určovaných iontů, protože koncentrace látky v její zóně  $c_A$  je přímo úměrná koncentraci vedoucího elektrolytu [1].

## 2. Chemikálie

Vedoucí elektrolyt: 20 mM HCl + Glycin (pH 3,1)

Koncový elektrolyt: 20 mM octan amonný (pH 4,8)

EDTA

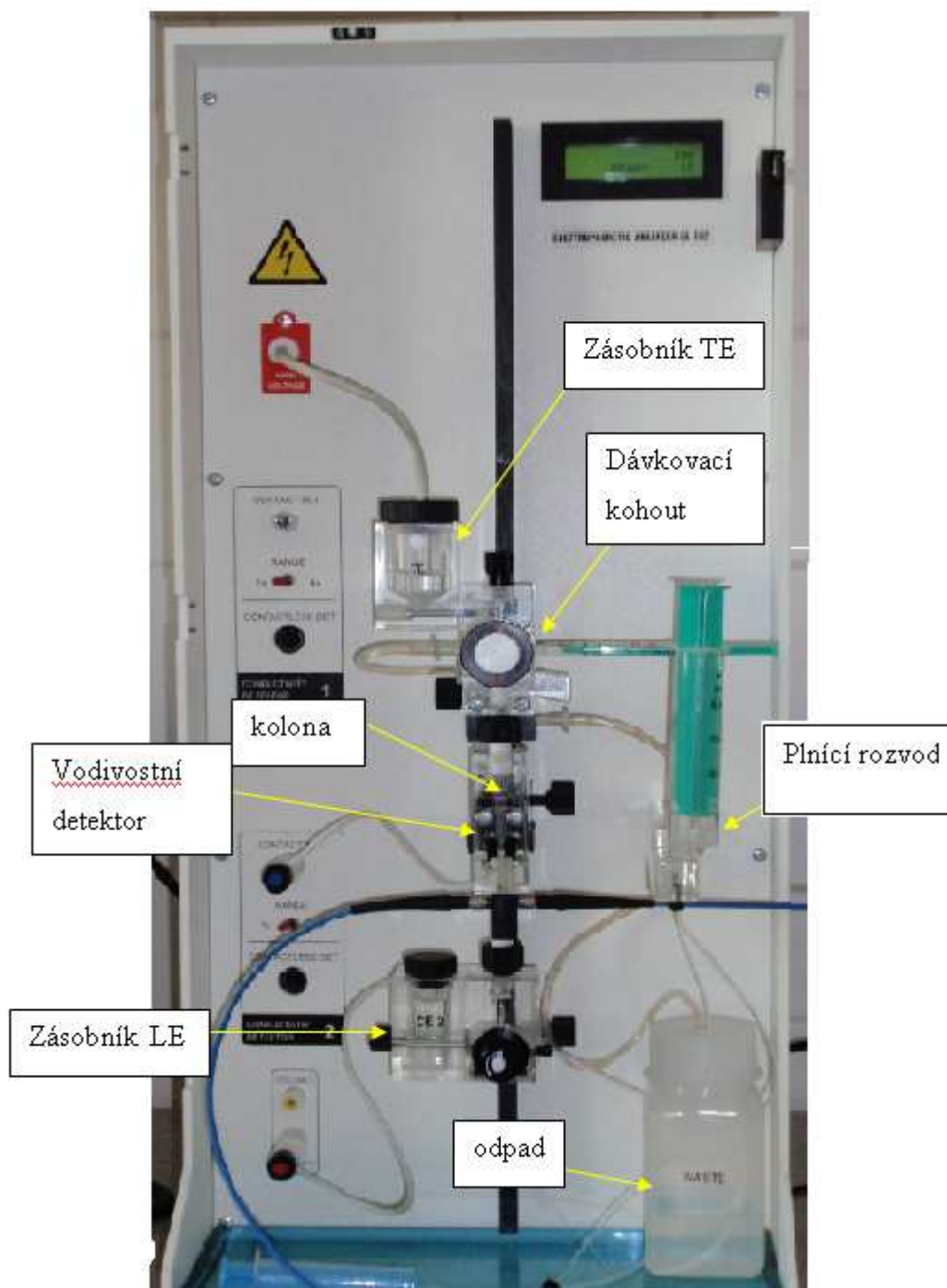
NTA

Kyselina hydroxyoctová

Vzorek Syntronu B - pevný

### 3. Práce s přístrojem

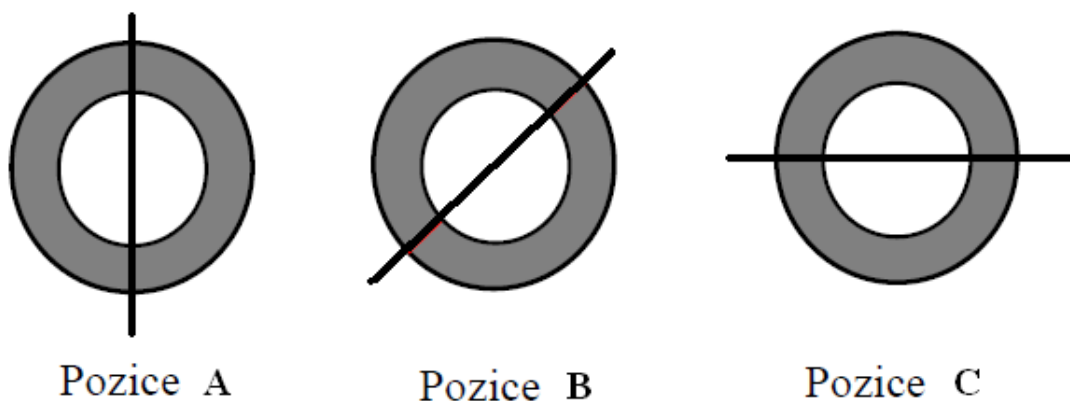
Pracuje se s jednokolonovou technikou přístroje EA 102 Villa Labeco.



Obr.1 Jednokolonové uspořádání elektroforetického analyzátoru EA, Villa Labeco

Než začneme měřit, je potřeba promýt zásobníky vedoucího a koncového elektrolytu destilovanou vodou. Dávkovací kohout dáme do polohy C a promyjeme jej destilovanou vodou. Do injekční stříkačky plnicího rozvodu si natáhneme

destilovanou vodu, otevřeme kohout IN column a propláchneme analytickou kolonu. Promytou kolonu poznáme podle toho, že voda proudí pomocí hadičky do odpadu. Na injekční stříkačku příliš netlačíme, abychom nepoškodili membránu, spíše se snažíme kolonu pulzně plnit. Injekční stříkačku není třeba vyndávat a jakmile je kolona promytá, pomalu uzavřeme kohout.



Obr.2 Pozice dávkovacího kohoutu

Promývání dávkovacího kohoutu provádíme při pozici C, následně jej otočíme do polohy B (musíme mít naplněný zásobník TE) a pozorujeme odtok vody do odpadu. V případě, že voda neodtéká, vezmeme si prázdnou injekční stříkačku, kterou vložíme do uzávěru zásobníku TE a vytvoříme přetlak.

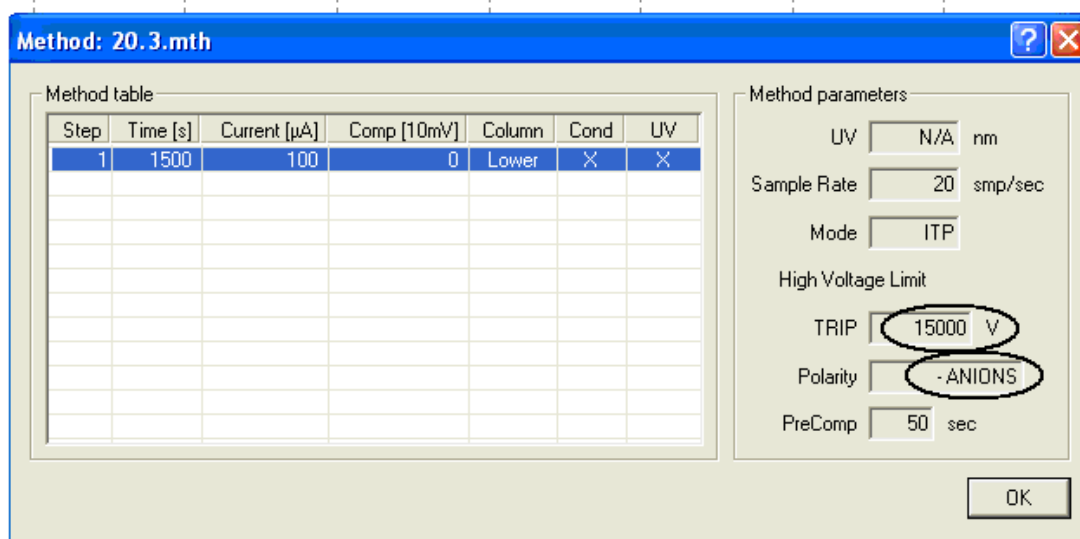
Pomocí prázdných injekčních stříkaček odsajeme destilovanou vodu ze zásobníků a kolony. Zásobníky naplníme příslušnými elektrolyty (postupujeme obdobně jako při jejich promývání) a do injekční stříkačky plnicího rozvodu nasajeme vedoucí elektrolyt, kterým plníme kolonu. Injekční stříkačku vedoucí do dávkovacího kohoutu naplníme vzorkem. Dbáme na to, aby v koloně nebyly žádné vzduchové bublinky, protože ty ruší stanovení a způsobují jejich nepřesnosti.

#### 4. Postup

- a) Promyjeme přístroj – viz kapitola práce s přístrojem.
- b) Připravíme si elektrolyty a nadávkuje je do zásobníků podle obrázku 1.
- c) Nachystáme si zásobní roztoky (10 mM) EDTA, NTA a kyseliny hydroxyoctové.

- d) Zásobní roztoky zředíme a proměříme je při různých koncentracích (0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2 mM). Pro urychlení analýzy lze stanovovat dané kyseliny vedle sebe.

Zapneme řídicí počítač a spustíme program ITP Pro. Zvolíme ikonu METHOD a nastavíme parametry analýzy (nejvyšší napěťový limit 15000 V, měření anionů, jednokroková analýza dlouhá 1500 s, proud 100  $\mu$ A, měření na spodní koloně a zapneme vodivostní i UV detektor) podle obrázku:



Obr.3 Nastavení metody analýzy

Vzorek nasajeme do injekční stříkačky a dávkujeme do kolony, když je dávkovací kohout v poloze C. Kolona má objem 30  $\mu$ l a že je neplněná poznáme podle toho, že přebytek odtéká do odpadu. Poté dávkovací kohout pootočíme do polohy B a jakmile vidíme, že koncový elektrolyt odtéká do kanálu (pokud se tak neděje, použijeme prázdnou injekční stříkačku a vytvoříme přetlak), otočíme dávkovací kohout do polohy A. Takto je systém připraven k analýze, kterou spustíme ikonou RUN.

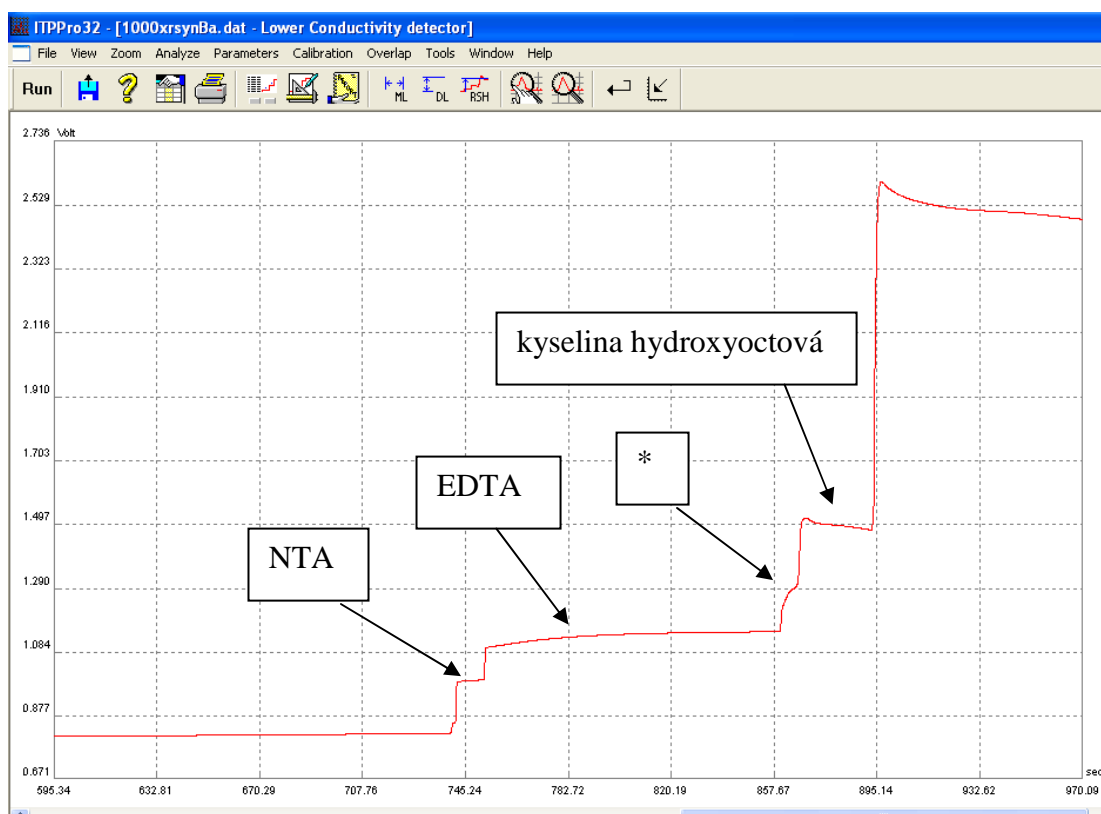
Během analýzy svítí na přístroji červená kontrolka HIGH VOLTAGE. Analýza je nastavená na 1500 sekund, ale jakmile se objeví zóny, můžeme ji vypnout tlačítkem STOP. Konec analýzy poznáme podle klesajícího napětí (zóna koncového elektrolytu se ubírá pozvolna dolů). Před každým dávkováním injekční stříkačku propláchneme vodou a kolonu promyjeme vedoucím elektrolytem. Dávkovací kohout máme v poloze C. Nastříkneme další vzorek a spustíme analýzu.

Takto proměříme všechny roztoky kyselin a sestrojíme kalibrační přímky (závislost délky zóny na koncentraci).

- e) Proměříme vzorek Syntronu B. Připravíme si 1 mM roztok vzorku (hlavní složkou v Syntronu B je  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , takže za molární hmotnost dosadíme při výpočtu molární hmotnost  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , tj. 380,2) a postupujeme jako při měření roztoků kyselin.
- f) Po skončení analýzy vypneme počítač a přístroj promyjeme destilovanou vodou (viz kapitola práce s přístrojem). Odpad z nádoby WASTE vylejeme.

## 5. Vyhodnocení

Po skončení analýzy otevřeme okno LOWER detector a vybereme naměřený soubor. V nabídce ANALYZE zvolíme *Zone Table*, kde se nám zobrazí délky zón vzorků, které vynesene do kalibračních grafů.



Obr.4 ITP záznam analýzy Syntronu B (\* neznámá látka, pravděpodobně ze syntézy)

Při vyhodnocení vzorku Syntronu, zjišťuje která zóna patří které kyselině podle odkazu OVERLAP, kde zvolíme *Add*, pomocí kterého přidáme do

izotachoforegramu jednotlivé kyseliny.

## 6. Výpočet obsahu kyselin ve vzorku Syntronu B

Výpočet provedeme metodou kalibrační přímky (závislost délky zóny na koncentraci kyseliny), z jejich rovnic regrese. Tím zjistíme koncentraci kyseliny ve vzorku a z takto vypočítané koncentrace lze určit hmotnostní procento dané látky podle vztahu [4]:

$$w_{\%} = \frac{c \times V \times M \times f_{zř} \times 100}{m} \quad (3)$$

## 7. Závěr

Do závěru uvedeme obsahy kyselin v Syntronu a porovnáme s bezpečnostním listem (EDTA 70 – 80 %, NTA max. 6,5 %).

## Použitá literatura

- [1] Pěňčíková H. (2003). Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení, SPŠCH, Brno
- [2] Čůta, K. a kol.(1986). Instrumentální analýza. SNTL, Praha.
- [3] Brodová M. (2007). *Možnosti zkoncentrování a frakcionace amfolytů na přístroji EA 102 (Villa Labeco, SR) s off-line detekcí*, Diplomová práce, Masarykova univerzita v Brně, Brno
- [4] Pěňčíková H. (1997). *Chemické výpočty*, Cerm, Akademické nakladatelství Brno