

3. STANOVENÍ SÍRY POMOCÍ ANALYZÁTORU ITP

3.1. IZOTACHOFORÉZA

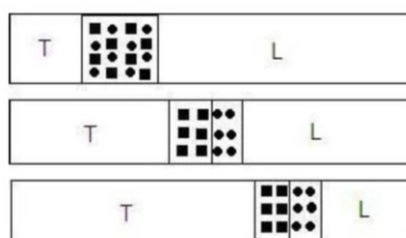
Kapilární izotachoforéza patří mezi elektromigrační metody, tato metoda využívá různou pohyblivost iontů v elektrickém poli. Pomocí ITP se stanovují kationty i anionty. Nelze je však stanovovat současně.

Vzorek se dává mezi dva elektrolyty, vedoucí elektrolyt (LE) a koncový elektrolyt (TE). Po připojení stejnosměrného napětí k systému se udržuje konstantní proud a dochází k separaci jednotlivých částic na základě jejich odlišné pohyblivosti. Po připojení stejnosměrného napětí dochází k pohybu iontů, přičemž platí podmínka:

$$\mu_{LE} > \mu_X > \mu_{TE}$$

kde μ_{LE} je elektroforetická pohyblivost vedoucího elektrolytu, μ_X je elektroforetická pohyblivost stanovovaného iontu, μ_{TE} je elektroforetická pohyblivost koncového elektrolytu

Vlastní analýza je rozdělena na dvě části. Po připojení stejnosměrného elektrického pole se ionty začnou pohybovat k opačně nabitým elektrodám různou rychlostí. Dochází k vytvoření tzv. izotachoforetických zón. Každá zóna obsahuje ionty pouze jedné látky. Po ustavení rovnováhy se začnou všechny zóny pohybovat stejnou rychlostí. Sousední zóny jsou odděleny ostrým rozhraním. To je způsobeno tzv. samozaostřovacím efektem. Na tomto rozhraní se skokem mění intenzita elektrického pole a koncentrace iontů.



Obr. 3.1. Separace směsi složek A a B (a – v čase nástřiku, b a c – proces migrace)

Rychlejší částice se dostanou na začátek dělicí směsné zóny, kdežto méně pohyblivé částice se zadržují. Po chvíli dojde k ustavení rovnovážného stavu, v němž jsou již částice odděleny a pohybují se všechny stejnou rychlostí. Tento proces znázorňuje obrázek 7.1. V rovnováze mají jednotlivé zóny v důsledku samozaostřovacího efektu velmi ostrá rozhraní a koncentrace jednotlivých iontů uvnitř zóny je konstantní. Tato koncentrace závisí na pohyblivosti iontu, ale také na koncentraci a typu vedoucího elektrolytu.

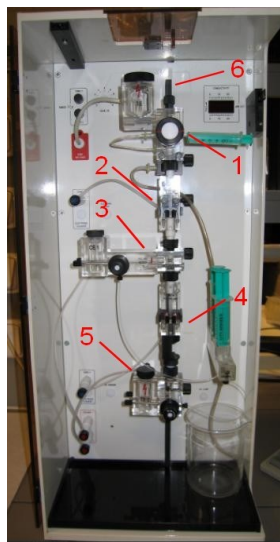
Výsledkem izotachoforézy je časový záznam nazvaný izotachoforegram, který udává závislost signálu detektoru na čase.

POPIS ELEKTROFORETICKÉHO ANALYZÁTORU:

Separáční jednotka se skládá z 6 částí, které jsou zobrazeny na obrázku 3.2.

- 1 – dávkovací ventil
- 2 – první kolona (předseparační) s vodivostním detektorem
- 3 – spojení kolon tvořené blokem spojení kolon, plnicím blokem a elektrodovou nádobou pro první kolonu

- 4 – druhá kolona (analytická) s vodivostním detektorem a UV detekční celou připojenou optickými vlákny k detektoru
- 5 – elektrodový systém tvořený plnicím blokem a elektrodovou nádobkou pro analytickou kolonu
- 6 – upevňující lišta



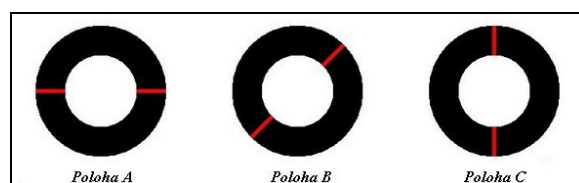
Obr. 3.2. Separální jednotka EA 102

3.2. STANOVENÍ POMOCÍ ITP

Před samotnou analýzou je třeba promýt celý systém analyzátoru destilovanou vodou. Poté se rezervoár TE naplní koncovým elektrolytem a rezervoáry CE 1 a CE 2 elektrolytem vedoucím. Spodní kolonu propláchneme vedoucím elektrolytem pomocí dvou injekčních stříkaček.

Dávkování vzorku, ale také promývání horní kolony, se provádí dávkovacím kohoutem, který má tři polohy (obrázek č. 7.3). Je-li kohout v poloze A, je horní kolona uzavřena, v poloze B dochází k průtoku koncového elektrolytu kolonou a nadávkování vzorku, v poloze C je systém připraven k analýze. Vzorek je dávkován injekční stříkačkou, zatímco je kohout v poloze A, posunutím do polohy B se vzorek nadávkuje a současně se nechá odtéct malé množství koncového elektrolytu (kontrola průchodnosti). Pootočení kohoutu do polohy C je zahájena analýza.

Přístroj EA 102 je připojen k počítači s příslušným softwarem – ITPPro32, který zachycuje a zpracovává daný signál.



Obr. 3.3. Polohy dávkovacího kohoutu

3.3. PŘÍPRAVA ELEKTROLYTŮ

Jako vedoucí elektrolyt použijeme 10 mM HCl + 10 mM β -alanin + 3 mM BTP + 0,1% HPMC. Do 100 ml odměrné baňky vneseme tolik kyseliny chlorovodíkové, aby její koncentrace byla 10 mM. Přidáme takové množství β -alaninu, aby jeho koncentrace byla 10 mM a tolik BTP (bis-tris

propan), aby jeho koncentrace byla 3 mM. Poté k roztoku přidáme 20 ml 0,1% HPMC (hydroxypropyl-methyl-celulosa).

Jako koncový elektrolyt použijeme 10 mM citronan sodný. Do 100 ml odměrné baňky navážíme tolik citronanu sodného, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 mM.

3.4. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Navážením si připravíme 10mM standard SO_4^{2-} (např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). *Dále postupujeme v ředění dle pokynů vyučujícího.* Stanovované vzorky je potřeba před analýzou zbavit oxidu uhličitého pomocí ultrazvukové lázně.

Z připraveného roztoku vzorku odpipetujeme do tří 25ml baněk 5 ml tohoto roztoku. První baňku doplníme po rysku destilovanou vodou. Do druhé baňky napipetujeme 1 ml roztoku standardu a do třetí baňky napipetujeme 2 ml roztoku standardu. Poté obě baňky doplníme destilovanou vodou po rysku. Každý roztok proměříme 3×.

3.5. METODY VYHODNOCENÍ

3.5.1. KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Zóny vzniklé po separaci na izotachofogramu porovnáme se zónami standardu. K tomu se využívá tzv. RSH faktor, což je relativní výška vlny udávaná v procentech. Tento faktor je definován vztahem:

$$RSH = \frac{h_x - h_L}{h_T - h_L}$$

kde: h_x je výška vlny látky, h_L je výška vlny vedoucího elektrolytu, h_T je výška vlny koncového elektrolytu

3.5.2. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

K vyhodnocení analýzy se využívá metoda přidavku standardu (příp. metoda kalibrační přímky). Metoda přidavku standardu eliminuje vliv matrice. Koncentrace analytu odpovídá délce naměřené zóny. Z izotachofogramu. Délka zóny s příslušnou hodnotou RSH faktoru se srovnává s délkou zóny po přidavku standardu.

K výpočtu koncentrace iontů analytu ve vzorku při využití metody přidavku jednoho standardu s doplněním baňky po rysku se používá následující vztah:

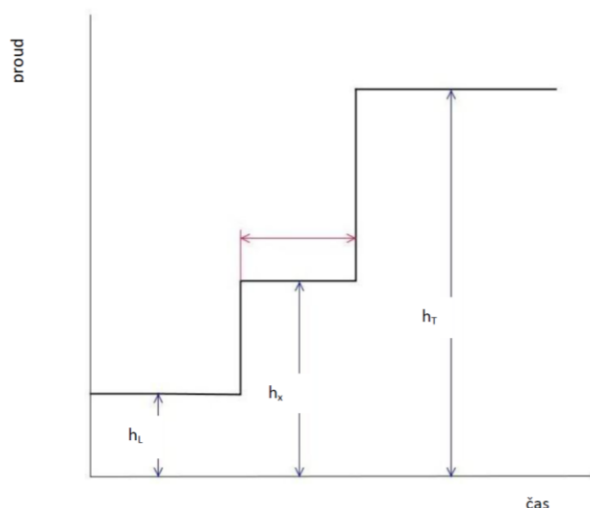
$$c_{vz} = \frac{l_{vz} \cdot c_{st} \cdot V_{st}}{(l_{vz+st} \cdot l_{vz}) \cdot V_{vz}}$$

kde: c_{vz} je výsledná koncentrace vzorku [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]; c_{st} je koncentrace roztoku standardu [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]; V_{st} je objem přidavku standardu [l]; l_{vz} je délka zóny vzorku [s]; V_{vz} je objem vzorku [l]; l_{vz+st} je délka zóny po přidavku standardu [s]

V případě více přidavků se koncentrace iontů vypočítáme z regresní přímky dle vztahu:

$$c_{vz} = \frac{c_{st} \cdot a}{V_{vz} \cdot b}$$

kde: c_{vz} je koncentrace vzorku; c_{st} je koncentrace standardu; V_{vz} je objem vzorku; a je úsek; b je směrnice přímky.



Obr. 7.4. Příklad izotachoforegramu

3.6. OPTIMALIZACE METODY

Při optimalizaci metody se mění parametry analýzy a zjišťují se ideální podmínky pro měření. Při jedнокrokové analýze je třeba zjistit optimální proud, při kterém se jednotlivé zóny objeví v přijatelném čase a v přijatelném rozlišení → tj zjišťujeme optimální retenční čas. U dvoukrokové analýzy se dosahuje lepšího rozlišení a často i nižších limitů detekce, v prvním kroku bývá proud vyšší a ve druhém se snižuje → určení optimálního rozlišení. Podmínky pro dvoukrokovou analýzu nastavené výrobcem pro elektrolytický systém: počáteční $80 \mu\text{A}$, koncový $30 \mu\text{A}$

Jednotlivé parametry mohou být měněny podle pokynů vyučujícího.

3.7. VYHODNOCENÍ ANALÝZY

- 1) Popis a graf izotachoforegramu, popis průběhu analýzy.
- 2) Vyhodnocení stanovení aniontů SO_4^{2-} izotachoforeticky, porovnání s dalšími metodami (*pokud bylo provedeno kvantitativní stanovení*).