FOCUSING OF METALS IN LIGAND FIELD STEP GRADIENT

Šišperová E., Glovinová E., Pospíchal J.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: el.siska@seznam.cz

ABSTRACT

The capillary electrophoretic method for the focusing and selective pre-concentration of metal chelates with subsequent on-line ITP analysis was developed and verified.

The ions of alkali earth metals /Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}/ were pre-concentrated from the mixture and analyzed. Focusing of metals was carried out in ligand field step gradient, which was realized by an addition of a convenient ligand agent to the regular stationary pH step gradient.

During the first step, the metal ions were continuously dosed into the column, where they were selectively trapped on the stationary ligand field step gradient in the form of non moving zones of chelate complexes with effective zero charge. After accumulation of detectable amount of analyte, the dosing was stopped and accumulated zones were mobilized to the analytical column, where they were analyzed e. g. by ITP method with conductivity or photometric detection.

The proper electrolyte system for the dosing /mode IEF/, mobilizing /mode MBE/and analytical step /mode ITP/ were developed and realized.

The selectivity of the trapping can be regulated by a choice of the pH and convenient complexing agents. As a sample analytes served model real mixtures of alkali earth metals. The proposed method enable increase of detection limit is 5-29x in comparison to classical methods - e. g. ITP.

Key words: ITP, metal chelates, focusing

ÚVOD

CAF IEF je elektromigrační metoda, která využívá k separaci a předkoncentraci amfolytů jejich fokusaci v ostrém skoku pH, které je vytvořeno v separační koloně.

Pro stanovení kovů metodou CAF-IEF byla vyvinuta metoda pro fokusace v ligandovém poli, která umožňuje fokusovat kovy ve formě jejich komplexů s vhodným chelatačním činidle. Pro tento účel byl vyvinut vhodný elektrolytový systém obsahující komplexační činidlo, který je tvořen dvěma částmi, alkalickou a kyselou, tyto částí odděluje stojící neutralizační rozhraní. Každá část má i jinou komplexační sílu, jíž je dosaženo zvoleným pH a koncentrací vhodného ligandu – protiionu. V kyselé části elektrolytu se vybrané kovy vyskytují převážně ve formě kationtů Me^{n+}, v alkalické části ve formě aniontové MeY^{n-}.

Jsou-li analyzované kovy přítomny v části elektrolytového systému, pak jsou průchodem elektrického proudu kontinuálně elektromigračně dávkovány do rozhraní, kde se selektivně fokusují -akumulují do stojících zón, jejichž efektivní náboj je nulový. Po naakumulování dostatečného množství analytu jsou zóny mobilizovány a analyzovány. Selektivita fokusace je dána zvoleným pH, povahou a koncentrací komplexačního činidla. Komplexy s nízkou (Na^+) nebo s vysokou stabilitou (Pb^{2+}) rozhraním procházejí, nebo se do něj nedomigrují. Jako příklad je uvedena analýza roztoku $BaSO_4$, která by byla neproveditelná v běžném ITP módu.

MATERIÁL A METODA

Elektrolyty - Elektrolyty byly vyvinuty a pufrovány protiionty tak, aby mobilita H^+ a OH^- iontů v kyselém a alkalickém prostředí byla menší než u ostatních iontů stejného náboje. To umožnilo korektní.migrace iontů a také následné použití H^+ a OH^- iontů jako terminátoru při mobilisaci. Zvolené pH bylo nastaveno s ohledem na nejlepší pufrovací schopnost na hodnotu pK protiionu. Jako základní elektrolyt byl zvolen octan amonný, octanový aniont pufruje v kyselé oblasti, pH kyselého elektrolytu bylo 4,75, v alkalickém elektrolytu pufruje amonný kation, jeho pH bylo nastaveno na 9,25. Jako mobilisační elektrolyt pak může sloužit pro kationtovou mobilisaci H^+ iont, tedy kyselina octova, pro aniontovou mobilisaci OH^- iont, tedy hydroxid amonný. V našem případě jsme používali pouze kationtovou mobilisaci. Hodnota pH vedoucího elektrolytu pro vlastní analýzu je zvoleno tak, aby rozdíl absorpce vedoucího elektrolytu a zón komplexů kovů byl maximální, což optimalizuje fotometrickou detekci.

Systém byl přizpůsoben tak, aby se v terminačním elektrolytu, o pH 3-4, aniontový komplex kovů rozložil a reagoval s metalochromním indikátorem kresolftalexonem za vzniku barevných kationtových komplexů, což umožňuje mobilisaci a identifikaci jednotlivých iontů ve vytvořených barevných zónách analyzovaných v detektoru.

Povrchově aktivní látka, polyethylenglykol (PEG) - Umožňují zvýšit viskozitu, což omezí elektroosmózu roztoku a dosažení ostřejších zón, tedy i ostrých rozhraní mezi nimi.

Vzorek - Vybrané soli jednotlivých kovů alkalických zemin, chemicky čisté a dobře rozpustné ve vodě.

Indikátor - Kresolftalexon (KFX) chelalatometrický indikátor, v alkalickém prostředí vytvářel růžovo-fialové zóny různé intenzity, což by mohlo být využito při fotometrické detekci. Tento indikátor umožňoval akumulaci zón v alkalické oblasti a jejich následné rozložení v oblasti kyselé.

Přístroj - Izotachoforetický analyzátor Spišská Nová Ves, byl použit ve dvoukolonovém uspořádání. V horní tzv. separační kapiláře proběhla fokusace a předkoncentrování, ve spodní analytické kapiláře byl vzorek analyzován.

Konce každé kapiláry jsou připojeny k elektrodovým komůrkám, které obsahují vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt (v horní části přístroje). Vzorek se dávkuje injekční stříkačkou (v horní části přístroje). Zóna prochází přes detektor, který vyhodnotí údaje a pošle elektrický signál do zapisovače. V jednotlivých kolonách jsme měli procházející proud 300 μA a 100 μA.

Postup analýzy –Do spodní analytické kapiláry nalijeme vedoucí elektrolyt, do vrchní separační kapiláry alkalický fokusační elektrolyt a do vrchní terminační komůrky dávkovací kyselý elektrolyt s velmi zředěným roztokem vzorku. pH dávkovacího elytu upravíme tak, aby spolu s fokusačním elektrolytem vytvořil v koloně stojící rozhraní. Po zapnutí proudu jsou pak, v prvním kroku jednotlivé ionty vzorku selektivně dávkovány průchodem elektrického proudu do vytvořeného stojícího rozhraní, kde se mezi elektrolyty fokusují ve formě komplexů s nulovým efektivní nábojem. Po naakumulování dostatečného množství vzorku, což je viditelné opticky, je ve druhém kroku analýzy vyměněn elektrolyt v horní elektrodové komůrce přístroje za mobilizační, konkrétně za kyselinu octovou. Působením kyseliny dojde ke změně nulového efektivního náboje komplexu v zónách na pozitivní, čímž vzniknou kationové komplexy, které působením elektrického proudu zvolna putují ve formě ostrých zón do separační kapiláry. Ve třetím kroku se stává v separační kapiláře mobilizační elektrolyt terminačním a zóny podstupují v ITP módu běžnou izatachforetickou analýzu.

Cíl – Ověřili jsme možnost předkoncentrace a fokusace kovů ve formě komplexů, dosáhli jsme dokonalé separace zón, a pomocí barevného metalochromního indikátoru jejich viditelnosti v kapiláře, což umožňuje fotometrickou detekci.

VÝSLEDKY A DISKUZE

ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY NA KONCENTRACI STANOVOVANÝCH IONTŮ

Funkčnost elektrolytů byla ověřena sestrojením klasické kalibrační závislosti nadávkovaného množství na délce zóny pro jednotlivé ionty, při použití fokusačních elektrolytů, ale bez kontinuálního dávkování, přičemž byl vzorek dávkován do kolony pomocí dávkovacího kohoutu. Kalibrační závislost jednotlivých iontů je pak přímka procházející počátkem. Toto je důkazem, že veškeré kovy jsou při mobilizačním kroku dokonale rozloženy a nedochází k jejich úbytku tvorbou vysoce stabilních – nerozložitelných komplexů, které mohou vznikat v přítomnosti nečistot v používaných indikátorech.

Tím jsme ověřili funkčnost zvoleného elektrolytového systému.

Složení elektrolytů:

Vedoucí elektrolyt: 0,02M NH_4OH + 0,005M kresolftalexon + 1 % PEG + 400ppm povrchově aktivní látky

Zakončující elektrolyt: 0,03M HAc

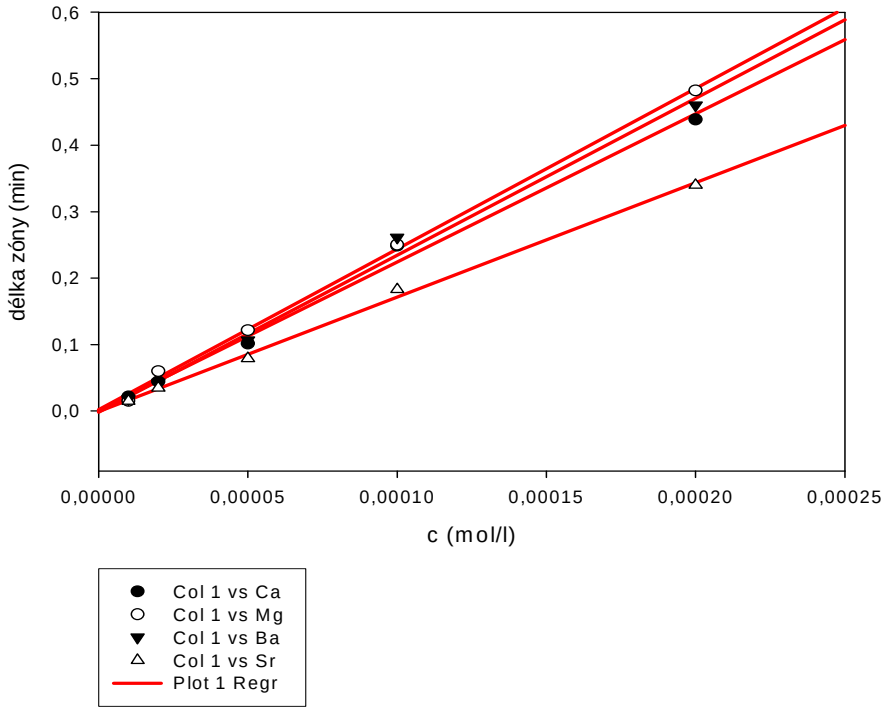
Vzorek: c = 1.10-5 mol/l, 2.10-5 mol/l, 5.10-5 mol/l, 1.10-4 mol/l, 2.10-4 mol/l, roztok $MgCl_2 . 6H_2O$ +$CaCO_3$ + 0,4M HAc + $Ba(NO_3)_2$ + $Sr(CH_3COOH)_2$

Tab 1 Závislost délky zóny na koncentraci stanovovaných iontů

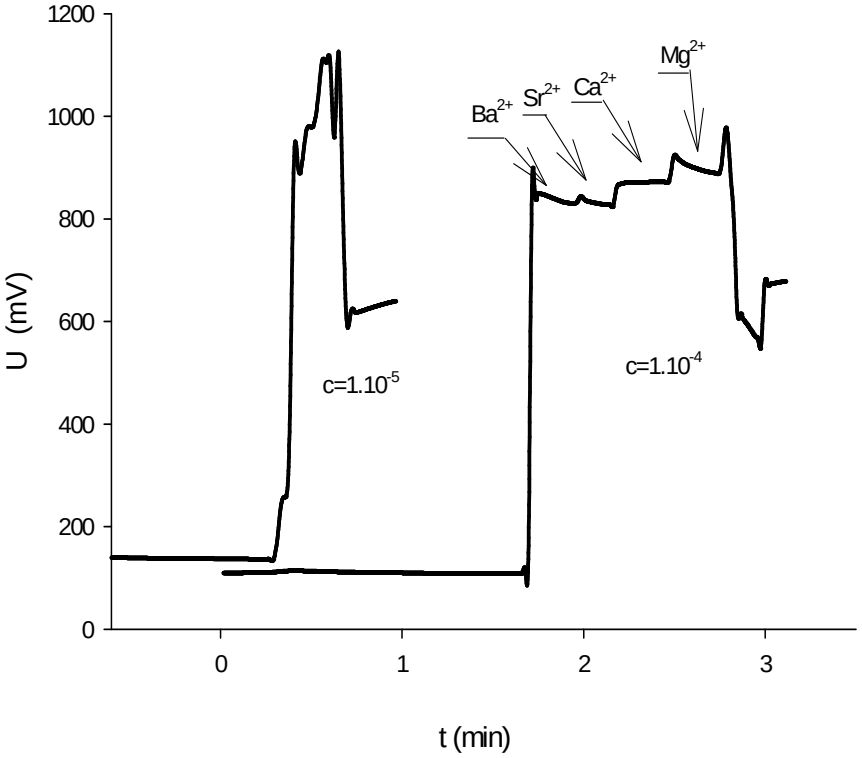
c (mol/l)	Délka zón (min)			
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Sr^{2+}
0,00001	0,021733	0,015267	0,018333	0,015267
0,00002	0,0443	0,059967	0,043333	0,034667
0,00005	0,101633	0,121633	0,106667	0,079
0,0001	0,248633	0,2503	0,261333	0,183
0,0002	0,438633	0,4823	0,460333	0,34

r^2 = 0,993

Obr. 1 Závislost délky zóny na koncentraci stanovovaných iontů



Obr. 2 Koncentrace iontů 1.10^{-5} a 1.10^{-4}



ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY NA DÁVKOVACÍM ČASE

Funkčnost metody byla ověřena sestrojením klasické kalibrační závislosti délky zóny na dávkovacím čase, která je rovněž lineární. Grafy prokazují, že v zónách dochází ke 100% zadržení nadávkovaných kovů. Směrnice přímek pro jednotlivé kovy odpovídají konstantám stability kovů, jsou vyjádřením skutečnosti, že délka zóny na dávkovacím čase závisí přímo úměrně.

Složení elektrolytů:

Vedoucí elektrolyt: 0,02M NH_4OH + 0,005M kresolftalexon + 1 % PEG + 400ppm povrchově aktivní látky

Zakončující elektrolyt: 0,03M HAc

Vzorek: 1.10-5 roztok $MgCl_2$. $6H_2O$ +$CaCO_3$ + 0,4M HAc + $Ba(NO_3)_2$ + $Sr(CH_3COOH)_2$

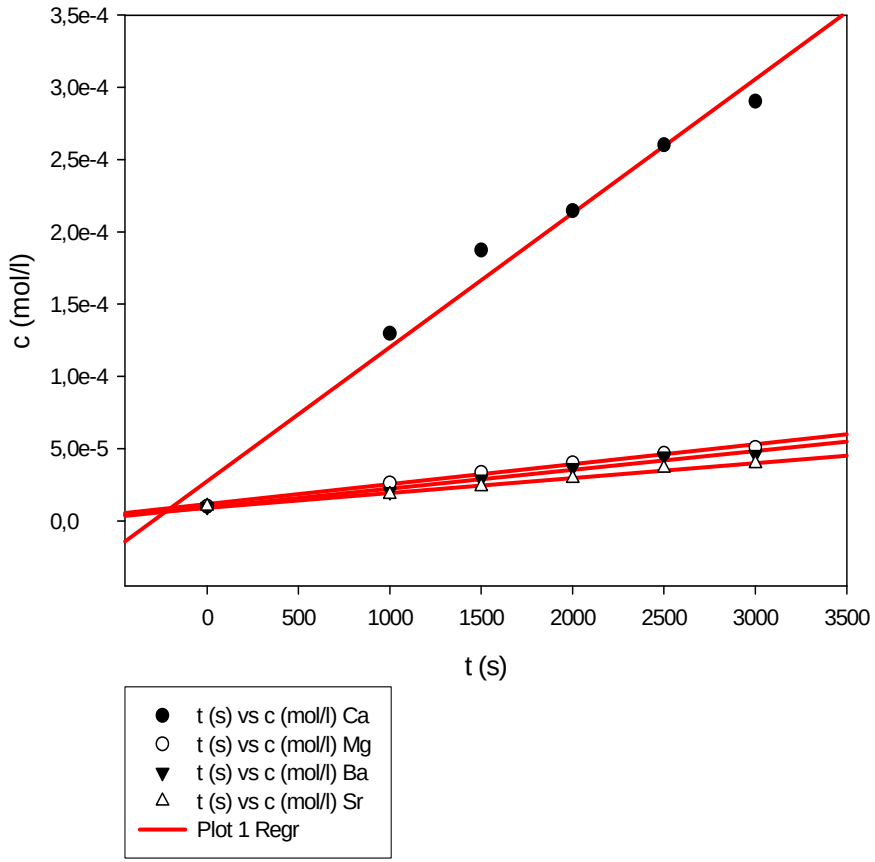
Fokusovali jsme roztokem: 4 : 1, 0,01M HAc : 0,01M NH_4OH + vzorek pH = 3,83

Tab. 2 Závislost koncentrace na dávkovacím čase

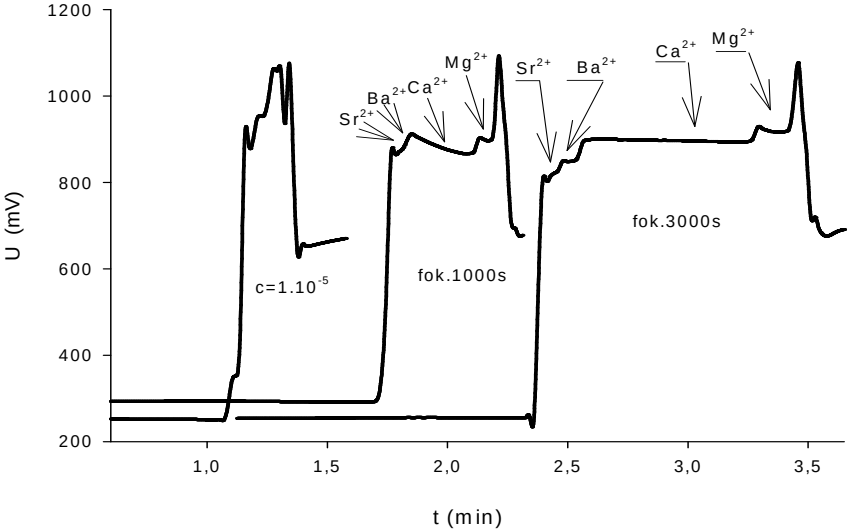
t (s)	c (mol/l)			
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Sr^{2+}
0	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
1000	0,0001298	0,00002624	0,00002018	0,00001827
1500	0,0001874	0,00003349	0,00002878	0,0000257
2000	0,0002147	0,00004007	0,00003681	0,00002936
2500	0,0002602	0,00004674	0,0000448	0,00003642
3000	0,0002904	0,00005085	0,00004587	0,00003965

$r^2 = 0,987$

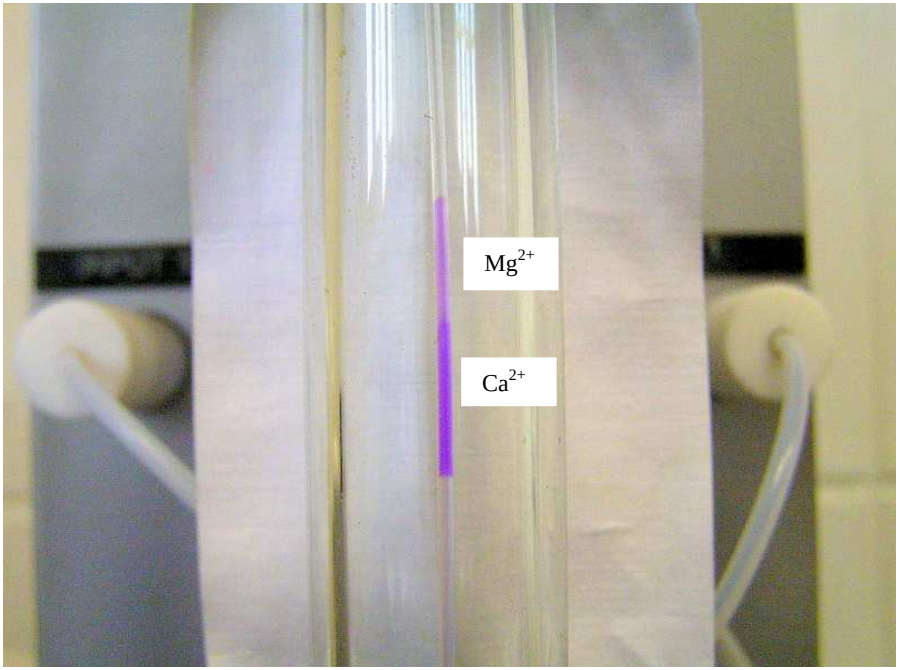
Obr. 3 Závislost koncentrace na dávkovacím čase



Obr. 4 Nástřik koncentrace 1.10-5 , fokusace 1000s a 3000s



Obr. 5 Zafokusovaná zóna vápníku a hořčíku



Viditelné rozhraní mezi ionty hořčíku a vápníku, vzniklé zóny jsou dokonale oddělené a čisté.

NALÝZA SUPERNATANTU NAD $BaSO_4$

Reálným vzorek je roztok $BaSO_4$, který se běžně ve zdravotnictví využívá v diagnostice pro RTG zobrazovací techniky. Pomocí modelového roztoku vzorku byla ověřena použitá metoda i funkčnost zvoleného elektrolytového systému, kde byl vzorek selektivně zafokusován i detekován.

Složení elektrolytů:

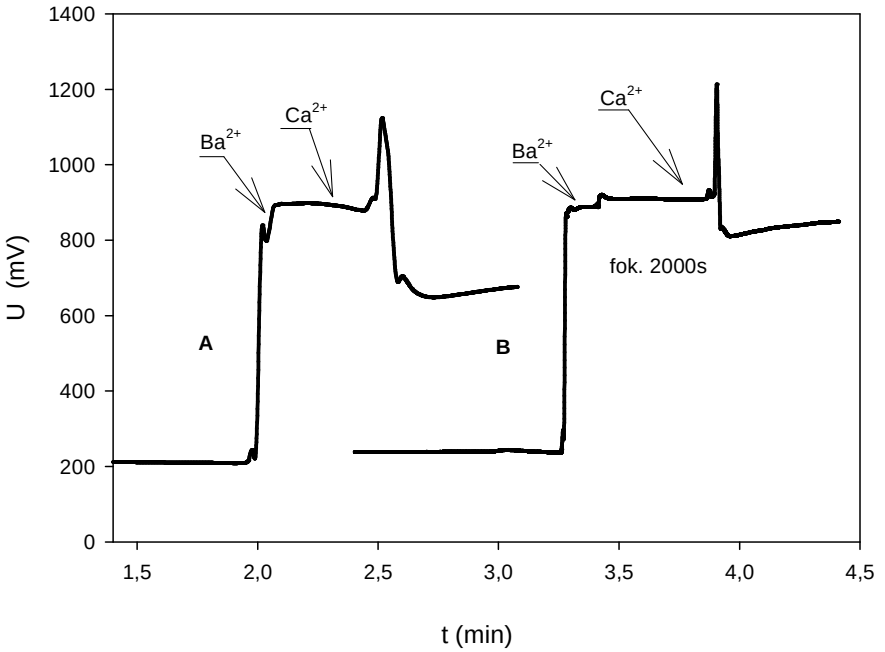
Vedoucí elektrolyt: 0,02M NH_4OH + 0,005M kresolftalexon + 1% PEG + 400ppm povrchově aktivní látka

Zakončující elektrolyt: 0,03M HAc

Vzorek: Supernatant $BaSO_4$ (5g do 100ml, doba sedimentace 20 min)

Doba fokusace $BaSO_4$ 2000s

Obr. 6 Porovnání běžné ITP analýzy supernatantu $BaSO_4$ (A) s metodou CAF-IEF s předkoncentrací (B)



ZÁVĚR

Byl vytvořen elektrolytový systém a metoda fokusace v ligandovém poli pro zakoncentrování kovů alkalických zemin ve formě barevných komplexů s chelatometrickým indikátorem. Dosažený stupeň zakoncentrování závisí na převodovém čísle kovu a době fokusace, za dobu 2000-3000sec. se pohyboval v rozmezí 5-29x. Analyzovaný reálný vzorek supernatantu $BaSO_4$ se zakoncentroval 9x, při běžné ITP analýze je tento vzorek neanalyzovatelný.

LITERATURA

Schmidhalter B. and Schumacher E. (1982): Enrichment of potassium isotopes with macrocyclyc polyether potassium complexes , Helvetica Chimica Acta, 65(6): 1687-1693.

Schumacher E. and Friedli W. (1960): Über elektrophoretische Ionenfokussierung X. Die Analyse von Seltenen Erdgemischen, Helvetica Chimica Acta, 44(7): 1829 – 1856.

Pospíchal J., Glovinová E. (2001): Analytical Aspects of Carrier Free Isoelectric Focusing, Journal of Chromatography, 918(1): 195-203.

Zhao SS., Zeng YN., Wagner H. (1984): Continuous free focusing electrophoresis of metal-ions in a stepwise gradient system of complexing agent, Journal of Chromatography, 291(5): 43-50.

Zelensky I., Kaniansky D., Havasi P. (1989): Photometric detection of metal-cations in capillary isotachophoresis based on complex equilibria, Journal of Chromatography, 470(1): 155-169.