

УДК 543.545 : 544.353.2

Использование внутреннего стандарта при определении анионов методом капиллярного электрофореза с косвенным спектрофотометрическим детектированием

**В.В. Сурсякова^{а*}, С.Н. Калякин^а,
Г.В. Бурмакина^а, А.И. Рубайло^{а,б}**

^а *Институт химии и химической технологии СО РАН,
660049 Красноярск, ул. К. Маркса, 42*

^б *Сибирский федеральный университет,
660041 Красноярск, пр. Свободный, 79¹*

Received 02.03.2009, received in revised form 10.03.2009, accepted 25.03.2009

Предложен способ коррекции площадей пиков ионов относительно пика иона внутреннего стандарта при определении анионов методом капиллярного электрофореза с косвенным спектрофотометрическим детектированием. На примере анализа ионного состава модельных растворов и реального объекта – воды реки Енисей – показано, что предложенный способ коррекции площадей пиков повышает точность измерения концентраций анионов.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, внутренний стандарт, определение анионов.

В настоящее время для определения ионного состава многокомпонентных растворов наиболее широко используют два высокоэффективных метода – капиллярный электрофорез (КЭ) и ионную хроматографию (ИХ). Эти методы в большей степени дополняют друг друга, чем конкурируют [1, 2]. Преимущества ионной хроматографии в лучшей воспроизводимости, точности, более низких пределах обнаружения, в то время как для капиллярного электрофореза характерна более высокая эффективность разделения, низкая стоимость расходных материалов и большая толерантность к матрице образца при анализе биологических объектов. Одним из недостатков капиллярного электрофореза является

меньшая точность определения концентраций ионов [3]. В данной работе для решения этой проблемы предлагается способ коррекции площадей пиков относительно пика иона внутреннего стандарта. Данный подход не был развит ранее, поскольку для анализа анионов чаще всего используются многокомпонентные фоновые электролиты, содержащие различные добавки, а корректное теоретическое описание связи аналитического сигнала с концентрацией и электрофоретической подвижностью разделяемого аниона возможно только для простых систем. Нами предложено использовать сравнительно простой по составу хроматный фоновый электролит, одновременно выполняющий буферирую-

* Corresponding author E-mail address: viktoria_vs@list.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

щую функцию и обеспечивающий возможность косвенного спектрофотометрического детектирования. Преимущества использования такого фонового электролита еще и в том, что он достаточно устойчив, дает меньше системных пиков на электрофореграммах и имеет большую чувствительность в варианте косвенного спектрофотометрического детектирования.

Методика эксперимента

В работе использовали систему капиллярного электрофореза с диодно-матричным детектором Agilent ^{3D}CE G1600A (Agilent Technologies, USA), кварцевые капилляры с внутренним диаметром 50 мкм, общей длиной 64,5 и 48,5 см и эффективной длиной 56 и 40 см соответственно. Детектирование проводили в УФ-области при 375 нм с опорной длиной волны 450 нм. Сигнал детектора обрабатывали при помощи программного обеспечения HP ChemStation Rev.A.10.02. Термостатирование капилляра проводили при температуре 25 °С. Ввод пробы гидродинамический при давлении 50 мБар в течение 4 – 20 с. Для измерения ЭОП маркер ЭОП вводили в капилляр со стороны детектора гидродинамическим способом, при давлении 50 мБар в течение 2 с. Для кондиционирования капилляр ежедневно перед работой последовательно промывали таким образом: 10 мин 0,1 М NaOH, дважды по 10 мин бидистиллированной водой, 10 мин раствором фонового электролита, затем 20 мин выдерживали при рабочем напряжении. Перед каждым анализом капилляр промывали раствором фонового электролита в течение 10 мин.

Для приготовления растворов применяли бидистиллированную воду с электропроводностью менее $1 \cdot 10^{-6}$ Ом⁻¹см⁻¹. Фоновым электролитом служил хромат – дихроматный буферный раствор, наиболее часто исполь-

зуемый в практике КЭ с косвенным спектрофотометрическим детектированием при определении неорганических анионов с высокой электрофоретической подвижностью [4, 5]. Рабочий раствор фонового буферного электролита содержал 2,5 мМ K₂Cr₂O₇, до pH 7,25 раствор доводили 0,1 М раствором KOH. Для подавления ЭОП использовали гидродинамическое давление. В качестве маркера ЭОП использовали 0,1 мМ водный раствор бензилового спирта.

Растворы готовили из реактивов марки ч.д.а. или х.ч. Все растворы и пробы предварительно фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и дегазировали под вакуумом $\approx 10^4$ Па в течение 2 мин.

Вывод уравнения для коррекции площади пика иона относительно внутреннего стандарта при косвенном детектировании

Наиболее распространенным способом детектирования в КЭ является спектрофотометрическое детектирование, а поскольку не все анионы имеют достаточное поглощение в УФ и видимой области, чаще используется косвенное спектрофотометрическое детектирование. Косвенное детектирование в методе капиллярного электрофореза основано на уменьшении концентрации аниона фонового электролита в зоне определяемых анионов, которое измеряется спектрофотометрическим методом [3-5].

Изменение оптической плотности при косвенном спектрофотометрическом детектировании в том случае, если разделяемый анион X⁻ не поглощает в области детектирования, можно описать следующим уравнением [6]:

$$\Delta A = \varepsilon \cdot d \cdot \Delta [An^-] = \varepsilon \cdot d \cdot [X^-] \cdot TR, \quad (1)$$

$$TR = \frac{1 + \mu_{M^+} / \mu_{X^-} \cdot \frac{z_{X^-}}{z_{An^-}}}{1 + \mu_{M^+} / \mu_{An^-} \cdot \frac{z_{X^-}}{z_{An^-}}}, \quad (2)$$

где ε – коэффициент молярного поглощения аниона фонового электролита, d – внутренний диаметр капилляра, $\Delta[An^-]$ – изменение равновесной концентрации аниона фонового электролита, $[X^-]$ – равновесная концентрация разделяемого иона, TR – пересчетный коэффициент (transfer ratio), $\mu_{\text{к}^+}$, $\mu_{\text{М}^+}$ и $\mu_{\text{Ан}^-}$ – электрофоретические подвижности определяемого иона, катиона и аниона фонового электролита соответственно, z – заряды ионов.

Так как площадь пика на электрофореграмме равна определенному интегралу отклика детектора по времени в пределах от начального времени пика $t_{\text{нач}}$ до конечного времени пика $t_{\text{кон}}$ $\int_{t_{\text{нач}}}^{t_{\text{кон}}} \Delta A(t) dt$, то площадь пика пропорциональна пересчетному коэффициенту TR и концентрации определяемого иона в образце C :

$$S = \varepsilon \cdot d \cdot TR \int_{t_{\text{нач}}}^{t_{\text{кон}}} [X^-] dt = \text{const} \cdot TR \cdot C. \quad (3)$$

В отличие от высокоэффективной хроматографии, где разделенные компоненты достигают детектора в потоке элюента, движущегося с помощью насоса с постоянной скоростью, в капиллярном электрофорезе ионы сами движутся к детектору. Однако это приводит к тому, что чем медленнее движется зона иона, тем более широкий пик будет давать ион. Поскольку ЭОП иногда меняет свое значение от анализа к анализу, что приводит к изменению времени миграции, то для устранения этого эффекта обычно используют пересчет площадей по формуле [7]:

$$S' = \frac{S}{t} \quad (4)$$

Комбинируя уравнения (1) – (4), мы предложили следующее выражение для отношения площадей электрофоретических пиков

для двух анионов при косвенном спектрофотометрическом детектировании:

$$\frac{S_2}{S_1} = \left(\frac{1 + \mu_{\text{М}^+} / \mu_2 \cdot z_2}{1 + \mu_{\text{М}^+} / \mu_1 \cdot z_1} \right) \cdot \frac{C_2 \cdot t_2}{C_1 \cdot t_1}, \quad (5)$$

где t – время миграции иона.

Электрофоретическая подвижность анионов $\mu_{\text{эл}}$ рассчитывается по уравнению

$$\begin{aligned} \mu_{\text{эл},i} &= \mu_{\text{сумм},i} + \mu_{\text{ЭОП}} - \mu_p = \\ &= \frac{l}{U} \left(\frac{l_{\text{эфф}}}{t_i} + \frac{l - l_{\text{эфф}}}{t_{\text{мет}}} \right), \end{aligned} \quad (6)$$

где $\mu_{\text{сумм},i}$ – суммарная подвижность иона, $\mu_{\text{ЭОП}}$ и μ_p – вклад в подвижность электроосмотического и гидродинамического потоков соответственно, l и $l_{\text{эфф}}$ – общая и эффективная длина капилляра (расстояние от входного конца капилляра до детектора), U – напряжение, $t_{\text{мет}}$ – время миграции нейтрального соединения.

Уравнение (5) содержит только один неизвестный параметр ($\mu_{\text{М}}$), который при неизменном составе раствора фонового электролита должен иметь постоянное значение. Усредненное значение $\mu_{\text{М}}$ можно рассчитать, решая методом последовательных приближений уравнение (5), на основании значений t_i и S_i для электрофореграмм стандартных растворов.

На основе уравнения (5) нами предложено уравнение для пересчета площадей пиков относительно пика иона внутреннего стандарта:

$$S_i'' = \left(\frac{1 + \mu_{\text{М}} / \mu_{\text{см}} \cdot z_{\text{см}}}{1 + \mu_{\text{М}} / \mu_i \cdot z_i} \right) \cdot \frac{S_i'}{S_{\text{см}}'}, \quad (7)$$

где $\mu_{\text{М}}$, $\mu_{\text{см}}$ и μ_i – электрофоретические подвижности катиона фонового электролита, иона внутреннего стандарта и определяемого иона; z – заряды ионов.

Связь концентрации определяемого иона C_i и иона внутреннего стандарта $C_{\text{см}}$ определяется следующим уравнением:

$$C_i = k_i \cdot S_i'' \cdot C_{cm} \quad (8)$$

Если ион не поглощает в области косвенного спектрофотометрического детектирования и не образует ассоциатов с компонентами фонового электролита, поправочный коэффициент k_i должен быть равен 1.

Результаты и их обсуждение

Исследовано разделение Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , SCN^- , H_2PO_4^- , CH_3COO^- – ионов в водах р. Енисей и в модельных растворах. Установлено, что КЭ с косвенным спектрофотометрическим детектированием и гидродинамическим подавлением ЭОП позволяет разделить указанные анионы, однако положение максимума пика на электрофореграмме может меняться (см. рис.), что приводит к ухудшению воспроизводимости площадей пиков ионов.

В таблице приведены относительные стандартные отклонения для исходных (S) и пересчитанных (S' , S'') по уравнениям (4, 7) площадей электрофоретических пиков, полученных в результате разделения модельной смеси ионов и анализа образцов воды р. Енисей. В качестве внутреннего стандарта в принципе может быть использован любой ион. При определении неорганических анио-

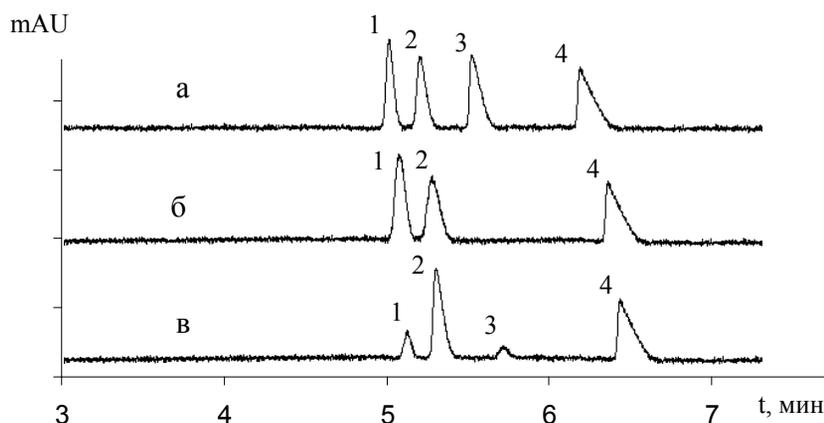
нов в большинстве объектов для этой цели удобно использовать SCN^- , так как это анион сильной кислоты ($pK_a \approx -1$) и его пик не перекрывается с наиболее часто обнаруживаемыми анионами.

Приведенные результаты показывают, что воспроизводимость скорректированных площадей S'' в серии измерений лучше, чем исходных площадей пиков S . Подход, заключающийся в нахождении значения S/t (уравнение 4), заметно не улучшает воспроизводимость.

В таблице также приведены поправочные коэффициенты k_i (см. уравнение (8)) для диапазона концентраций $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ моль-экв/л. Относительное стандартное отклонение k_i , рассчитанных по площадям пиков для различных концентраций модельных смесей ионов, не превышало 0,02, кроме H_2PO_4^- и CH_3COO^- , для которых воспроизводимость k_i составила около 0,07. Отклонение поправочного коэффициента от 1 и его плохая воспроизводимость могут быть связаны с процессами ассоциации и существованием нескольких ионных форм одного компонента, например, при pH 7,25 в растворе присутствуют в заметных количествах H_2PO_4^- и HPO_4^{2-} .

Таблица. Относительные стандартные отклонения исходных (S) и пересчитанных (S' , S'') по уравнениям (4, 7) площадей электрофоретических пиков. Внутренний стандарт – SCN^- ион. $n = 5$

Объект анализа	Диапазон С, моль-экв/л	Анионы	S_r			k_i
			S	S'	S''	
Модельный раствор	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	Br^-	0,056	0,057	0,012	1,08
		Cl^-	0,058	0,058	0,015	1,01
		SO_4^{2-}	0,053	0,054	0,018	1,05
		NO_3^-	0,050	0,051	0,009	0,99
		SCN^-	0,052	0,054	-	-
		H_2PO_4^-	0,114	0,075	0,029	1,73
		CH_3COO^-	0,124	0,130	0,016	1,34
Речная вода	$1 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-4}$	Cl^-	0,052	0,041	0,014	-
	$4 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$	SO_4^{2-}	0,042	0,045	0,018	
	$3 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$	NO_3^-	0,081	0,056	0,028	



Электрофореграммы модельной смеси ионов (а) и образцов воды р. Енисей с внутренним стандартом (б, в). Фоновый электролит 2,5 мМ $K_2Cr_2O_7$, pH 7,25, напряжение -12 кВ, гидродинамическое давление 30 мбар. Пики: 1 – Cl^- ; 2 – SO_4^{2-} ; 3 – NO_3^- ; 4 – SCN^-

Таким образом, применение нового подхода, заключающегося в коррекции площадей пиков ионов относительно площади пика иона внутреннего стандарта позволяет по-

высить точность определения концентраций методом капиллярного электрофореза с косвенным спектрофотометрическим детектированием до 2-3 %.

Список литературы

1. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е. Высокоэффективный капиллярный электрофорез в экологическом мониторинге // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. № 8. С. 817-834.
2. Haddad P.R. Comparison of ion chromatography and capillary electrophoresis for the determination of inorganic anions. J.Chromatogr.A. 1997. V. 770. P. 281-290.
3. Руководство по капиллярному электрофорезу / Под ред. А.М. Волощука; Научный совет РАН по хроматографии. М., 1996.
4. Doble P., Haddad P.R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1999. V. 834. P. 189-212.
5. Beckers J.L., Boček P. The preparation of background electrolytes in capillary electrophoresis: Golden rules and pitfalls. Electrophoresis. 2003. V. 24. P. 518-535.
6. Xiong X., Li S.F.Y. Design of background electrolytes for indirect photometric detections based on a model of sample zone absorption in capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1999. V. 835. P. 169-185.
7. Faller T., Engelhardt H. How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1999. V. 853. P. 83-94.

The Using of Internal Standard in Determination of Anions by Capillary Electrophoresis Technique with Indirect Spectrophotometric Detection

**Viktoriya V. Sursyakova^a, Sergey N. Kalyakin^a,
Galina V. Burmakina^a and Anatoliy I. Rubaylo^{a, b}**

^a *Institute of Chemistry and Chemical Technology, SB RAS,
42 K. Marx st., Krasnoyarsk, 660049 Russia*

^b *Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

The equations for correction of electrophoretic peak areas relative to electrophoretic peak area of internal standard were suggested in determination of anions by capillary electrophoresis technique with indirect spectrophotometric detection. It is shown on analysis of model mixture of ions and real object – water of river Yenisei that suggested method of peak area correction raises the accuracy of anions concentration measurement.

Keywords: capillary electrophoresis, internal standard, anion determination.
