

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Iryna Listakhava

## VÝVOJ ELEKTROFORETICKÉ METODY STANOVENÍ FOSFÁTŮ A BORÁTŮ V NEMRZNOUCÍCH SMĚSÍCH

Development of the electrophoretic method for determination of  
phosphates and borates in cooling mixtures

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. srpna 2021

Podpis

## Abstrakt

V této diplomové práci byla vyvinuta metoda rutinní analýzy komerčních chladicích kapalin, zaměřená na současné stanovení anorganických aniontů – fosfátů a borátů – jako inhibitorů koroze v čerstvých směsích a ukazatelů kvality recyklace. Metoda byla vypracována pro instrumentální techniku kapilární zónovou elektroforézu se spektrometrickou nepřímou detekcí při 254 nm. Byly optimalizovány: základní elektrolyt (jeho složení, koncentrace, pH), měřené vzorky (ředění chladicí kapaliny, vhodný vnitřní standard) a podmínky měření (délka kapiláry, dávkování vzorku). Byl otestován vliv matrice vzorku na výsledky měření, robustnost kalibrační přímky (resp. souhlas odezvy se skutečnou koncentrací analytů) a také opakovatelnost metody. Výsledkem optimalizací a testů byla metoda založená na standardním přidavku o následujících parametrech: základní elektrolyt o pH = 11,50 obsahující chroman sodný o koncentraci 10 mmol l<sup>-1</sup> a CTAB o koncentraci 1 mmol l<sup>-1</sup>; ředění vzorku chladicí kapaliny 20-50×, přidavek vnitřního standardu MES 0,1 mmol l<sup>-1</sup>, elektrokinetické dávkování napětím -5 kV po dobu 10 s, kapilára délky 50,0 cm a vnitřního průměru 75 μm. Opakovatelnost metody vyjádřená ve formě relativní směrodatné odchylky pro migrační časy analytů se pohybovala v rozmezí 1,8-2,6 %, pro plochy píků 1,9-11,3 % a pro relativní plochy píků 4,0-8,5 %. Výtěžnost metody činila 93-120 %.

## Klíčová slova

Chladicí kapaliny, anorganické anionty, fosfáty, boráty, inhibitory koroze, kapilární zónová elektroforéza

## **Abstract**

In this diploma thesis, a method of routine analysis of commercial coolants was developed, focused on the simultaneous determination of inorganic anions – phosphates and borates – as corrosion inhibitors in fresh mixtures and the markers of recycling quality. The method was developed for the instrumental technique of capillary zone electrophoresis with indirect detection at 254 nm. The following were optimized: background electrolyte (its composition, concentration, pH), measured samples (coolant dilution, suitable internal standard) and measurement conditions (capillary length, sample dosing). The influence of the sample matrix on the measurement results, the robustness of the calibration line (or the agreement of the response with the actual analyte concentration) and also the repeatability of the method were tested. Optimizations and tests resulted in a method based on a standard addition with the following parameters: background electrolyte of pH = 11.50 containing sodium chromate at 10 mmol l<sup>-1</sup> concentration and CTAB at 1 mmol l<sup>-1</sup> concentration; dilution of the coolant sample 20-50×, addition of internal standard MES at 0,1 mmol l<sup>-1</sup> concentration, electrokinetic sample injection at -5 kV for 10 s, capillary length 50.0 cm, inner diameter 75 μm. The repeatability of the method expressed as a relative standard deviation of migration times of analytes ranged between 1,8-2,6 %, for area of the peaks 1,9-11,3 % and for the relative peak area 4,0-8,5 %. The recovery of the method was 93-120 %.

## **Keywords**

Engine coolants, inorganic ions, phosphate, borate, corrosion inhibitors, capillary zone electrophoresis

## Seznam zkratek a symbolů

$\mu$	elektroforetická mobilita [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{eff}$	efektivní mobilita [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{eof}$	mobilita elektroosmotického toku [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{poz}$	pozorovaná mobilita [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
$\tilde{A}_{rel}$	střední relativní plocha píku
$A_s$	faktor asymetrie
$b$	úsek kalibrační závislosti
B	boráty [ $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ]
BGE	základní elektrolyt
$C_{přid}$	koncentrace přídavku standardu [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]
CHES	kyselina <i>N</i> -cyclohexyl-2-aminoethansulfonová
ClAc	kyselina chloroctová
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DETA	diethylentriamin
DTAB	dodecyltrimethylamonium bromid
$E$	intenzita elektrického pole [ $\text{V m}^{-1}$ ]
EG	ethylenglykol
EOF	elektroosmotický tok
HEPES	kyselina <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová
HOAT	hybridní aditivní technologie
IAT	anorganické aditivní technologie
IEC	iontově-výměnná chromatografie
$k$	směrnice kalibrační závislosti [ $\text{mg}^{-1} \text{ml}$ ]
$l_c$	celková délka kapiláry [m]
$l_d$	délka kapiláry do detektoru [m]
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
MES (M)	kyselina 2-( <i>N</i> -morfolino)-ethansulfonová
MOPS	kyselina 3-( <i>N</i> -morfolino)-propansulfonová

OAT	organické aditivní technologie
P	fosfáty $\text{HPO}_4^{2-}$
PDC	pyridindikarboxylát sodný
$R^2$	koefficient determinace
$R_e$	procento stanovené látky ze skutečného množství, výtěžnost
TAPS	kyselina <i>N</i> -tris(hydroxymethyl)methyl-3-amino-propansulfonová
$T_f$	tailing faktor
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
$t_{\text{mig}}$	migrační čas [min]
$U$	elektrické napětí [V]
$v$	rychlost [ $\text{m s}^{-1}$ ]
VS	vnitřní standard
z.r.	zásobní roztok

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za možnost vypracovat toto téma, za odborné vedení, trpělivost, konzultace a cenné rady v průběhu práce.

Také chci poděkovat své mamince a kamarádům za podporu po dobu studia.

Práce vznikla za podpory Technologické agentury České republiky (projekt TJ04000540).

# Obsah

1	Úvod.....	- 10 -
2	Teoretická část .....	- 11 -
2.1	Chladicí kapaliny .....	- 11 -
2.1.1	Definice, použití.....	- 11 -
2.1.2	Komponenty chladicích směsí .....	- 12 -
2.2	Fosfáty a boráty .....	- 14 -
2.2.1	Význam .....	- 14 -
2.2.2	Metody stanovení .....	- 15 -
2.3	Kapilární zónová elektroforéza.....	- 17 -
2.3.1	Teoretický princip a provedení .....	- 17 -
2.3.2	Modifikace elektroosmotického toku.....	- 18 -
2.3.3	Nepřímá detekce.....	- 18 -
2.3.4	Dávkování .....	- 19 -
3	Cíl práce .....	- 20 -
4	Experimentální část.....	- 21 -
4.1	Chemikálie .....	- 21 -
4.2	Instrumentace .....	- 21 -
4.3	Pracovní podmínky .....	- 22 -
4.4	Příprava pracovních roztoků .....	- 22 -
4.4.1	Příprava základního elektrolytu .....	- 22 -
4.4.2	Příprava standardů, roztoků vzorků, matrice .....	- 23 -
4.5	Pokusy s modelovým roztokem .....	- 24 -
4.5.1	Migrační pořadí .....	- 24 -
4.5.2	Optimalizace pH BGE.....	- 24 -
4.5.3	Optimalizace složení BGE .....	- 25 -
4.5.4	Optimalizace koncentrace CTAB v BGE.....	- 25 -
4.5.5	Optimalizace koncentrace chromanu v BGE .....	- 26 -
4.6	Optimalizační pokusy s reálnými vzorky .....	- 26 -
4.6.1	Ředění chladicích kapalin .....	- 26 -
4.6.2	Délka kapiláry .....	- 26 -
4.6.3	Výběr vnitřního standardu.....	- 27 -

4.7	Testování metody.....	- 27 -
4.7.1	Kalibrační závislost.....	- 27 -
4.7.2	Analýza reálného vzorku.....	- 28 -
4.8	Dodatečná optimalizace.....	- 29 -
4.8.1	Zkoumání vlivu matrice.....	- 29 -
4.8.2	Výběr typu dávkování.....	- 29 -
4.9	Stanovení analytů ve vzorcích.....	- 29 -
4.10	Statistické zpracování.....	- 30 -
4.10.1	Asymetrický, tailing faktory.....	- 30 -
4.10.2	Zkouška kalibrační přímky.....	- 30 -
4.10.3	Mez detekce, mez stanovitelnosti.....	- 31 -
4.10.4	Opakovatelnost.....	- 31 -
5	Výsledky a diskuze.....	- 33 -
5.1	Určování migračního pořadí.....	- 33 -
5.2	Optimalizace BGE na modelovém roztoku.....	- 34 -
5.2.1	pH základního elektrolytu.....	- 34 -
5.2.2	Složení a koncentrace základního elektrolytu.....	- 36 -
5.3	Optimalizace metody na reálném vzorku.....	- 41 -
5.3.1	Ředění vzorků chladicích kapalin.....	- 41 -
5.3.2	Délka kapiláry.....	- 43 -
5.3.3	Vnitřní standard.....	- 45 -
5.4	První testování metody.....	- 46 -
5.5	Dodatečné optimalizace.....	- 50 -
5.5.1	Matrice.....	- 50 -
5.5.2	Dávkování.....	- 50 -
5.6	Druhé testování.....	- 53 -
5.7	Aplikace metody na vzorky.....	- 58 -
5.8	Zkouška opakovatelnosti.....	- 60 -
6	Závěr.....	- 62 -
7	Seznam použité literatury.....	- 63 -

# 1 Úvod

Každý rok celosvětově roste počet vyprodukovaných, resp. používaných motorových vozidel jako komerční a soukromé automobily, autobusy, motocykly atd. Například za posledních 20 let se jejich roční produkce zvětšila více než 1,5krát, z 56 miliónů v roce 1999 na 92 miliónů za rok 2019<sup>[1]</sup>. Spolu s tím roste i používané množství chemických výrobků souvisejících s provozem a údržbou motorových vozidel. Chladicí kapaliny jsou značnou a důležitou částí tohoto průmyslu a na jejich složení je kladen velký důraz, protože správně vybraná a kvalitní směs pozitivně ovlivňuje efektivitu a životnost motoru, zejména při jeho využití v neoptimálních podmínkách okolního prostředí.

Při výrobě chladicích kapalin se v potaz bere nejenom optimalizace složení pro maximální výkon, ale i šetrnost k člověku a přírodě. Minimalizace chemických odpadů jako jeden z principů ekologičnosti je realizován v recyklaci chladicích kapalin. Ve všech etapách života kapaliny a v procesu její recyklace je nutná její chemická analýza pro zajištění požadovaných technických vlastností a bezpečnosti. Jako jeden z nástrojů kontroly obsahu chladicích směsí lze navrhnout kapilární zónovou elektroforézu (CZE). Je to jednoduchá, rychlá, relativně levná a dostatečně přesná i citlivá metoda umožňující stanovení většiny komponentů chladicích směsí, resp. kontrolu kvality jejich recyklace.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Chladicí kapaliny

#### 2.1.1 Definice, použití

Primární funkcí kapalných chladicích směsí je zajišťování přenosu tepla jak produkovaného uvnitř motorů, tak i působícího z vnějšího okolí, udržování teploty komponentů v přijatelném pracovním rozsahu zabraňuje jejich přehřívání a poškození<sup>[2]</sup>. Díky různým přísadám současně přidávaným do chladicích směsí lze jejich funkcionalitu rozšířit. Vzhledem k metalické povaze konstrukce motorů, patří mezi nejdůležitější aditiva inhibitory koroze. Druhým důležitým komponentem jsou látky snižující bod tuhnutí; jejich přidání umožňuje snížit hranici rozsahu pracovních teplot, tzn. zabránit zamrznutí systému, což je užitečné zejména při využívání motorů v zimě a/nebo v severních regionech.

Chladicí kapaliny mají široké použití. Nejtypičtějším příkladem jsou spalovací motory, v jejichž principu práce je zahrnuta produkce tepelné energie, jejíž přebytek je nutné odvádět<sup>[3]</sup>. Dále se využívají v klimatizačních zařízeních budov a k chlazení výkonné počítačové techniky.

Použité chladicí kapaliny obsahují pevné produkty koroze a rozpuštěné těžké kovy (kadmium, tantal), minoritně také produkty degradace nemrznoucích přísad, což jsou škodlivé látky a vzhledem k bezpečnosti okolního prostředí nesmí být volně vylévané do odpadů. Nicméně základ směsí zůstává stabilní a je znovu použitelný po recyklaci, o čemž vypovídají studie provedené experty v této oblasti (American Society for Testing and Materials, Society of Automotive Engineers<sup>[4-6]</sup>). Recyklace se provádí více způsoby, které lze v principu rozdělit na destilační procesy (většinou dvoustupňové, vakuové destilace) a filtrační procesy (reverzní osmóza, elektrodialýza)<sup>[3,7,8]</sup>.

### 2.1.2 Komponenty chladicích směsí

Jak již bylo zmíněno, do chladicích směsí se přidávají různá aditiva a jejich konkrétní složení pak záleží na výrobcí a účelech, ke kterým je dané médium určeno. Ideální chladicí kapalina by však měla mít vysokou tepelnou kapacitu, být chemicky inertní, netoxická a pro některé případy také nevodivá; neposlední roli hraje i cena komponentů.

Voda je známá svojí tepelnou kapacitou, a tak může efektivně přenášet teplo, ačkoliv její použití jako samotné látky (destilované, deionizované) je nežádoucí. Prvním důvodem je poněkud ohraničený teplotní rozsah 0-100 °C, jehož spodní hranice je často příliš vysoko vzhledem k možným teplotám okolního prostředí, a horní hranice je často příliš nízko vzhledem k pracovní teplotě výkonného motoru. K překonání tohoto problému se k vodě přidávají další kapaliny, mezi něž patří glykoly a alkoholy. Alkoholy jako methanol a ethanol jsou dostupné a účinně snižují bod tuhnutí, ačkoliv jejich využití je téměř nulové z důvodů sníženého bodu varu, hořlavosti a toxicity. Glykoly jsou celkově méně efektivní ve snížení bodu tání vody, který také záleží na hmotnostním podílu glykolu ve směsi, ale jsou nehořlavé a neodpařují se, což vede k prakticky neomezené životnosti směsi a je předpokladem pro recyklaci. Hlavními používanými glykoly jsou glykoly na bázi ethylenu (primárně monoethylenglykol, který je někdy doplněn o malé množství di- a triethylenglykolu), méně často jsou používány glykoly na bázi propylenu<sup>[2,9,10]</sup>.

Druhým důvodem pro modifikaci vodného roztoku je povaha prostředí, v němž chladicí kapalina má cirkulovat. Při výrobě chladicích systémů se používá více druhů kovů a jejich slitin, jak například mosaz, ocel, litina, měď. Tyto kovy vlivem vody, teplotních a tlakových faktorů v pracujícím motoru korodují, proto je potřeba přidávat do chladicích směsí látky inhibující tento proces. Současně existuje trend odlehčování vozidel, což vede k rozšíření použití hliníku, hořčíku a jejich slitin v různých částech automobilů, a také do jisté míry komplikuje ochranu před korozi a rozšiřuje arzenál používaných inhibitorů.

Podle přidaných inhibitorů koroze lze chladicí kapaliny rozdělit na 3 základní skupiny: IAT – anorganické aditivní technologie, OAT – organické aditivní technologie a HOAT – hybridní aditivní technologie<sup>[11]</sup>. IAT je starší technologií a zaměřuje se především na ochranu před korozi „tradičních“ materiálů jako litina a mosaz, používá takových anorganických látek jako křemičitany, boráty a fosfáty a bude podrobněji popsána v další kapitole, protože se vztahuje k cílům této diplomové práce<sup>[12,13]</sup>. OAT chladicí kapaliny

jsou novější, typicky obsahují kyseliny karboxylové (např. kyselina 2-ethylhexanová, 2EHA, nebo kyselina sebaková) a/nebo azolové (benzo-, tolyltriazol) a jejich deriváty<sup>[14]</sup>; chladicí kapaliny vyrobené podle této technologie jsou účinnější pro materiály na bázi železa, mědi a také pro hliník. Nejmodernější kapaliny HOAT používají kombinaci organických kyselin s anorganickou složkou, většinou křemičitany nebo fosfáty (ačkoliv existuje také verze bez nich)<sup>[15]</sup>; jejich výhodou je vysoká kompatibilita s různými typy motorů a chladicích systémů<sup>[16,17]</sup>.

Konečně, chladicí kapaliny mohou obsahovat další minoritní složky jako pH pufrы (pH chladicích kapalin je doporučeno udržovat v rozmezí hodnot 7,5-11,5 a změna pH na kyselé/silně bazické může způsobit nežádoucí jevy v chladicím systému), barviva (na základě některých konvencí lze pak rozlišovat určení/typ kapaliny podle její barvy), protipěnové přísady (ačkoliv samotná směs není náchylná k pění, vlivem mechanických sil tento nežádoucí jev může nastat, proto se přidávají silikony, polyglykoly), stabilizátory inhibující tvorbu vodního kamene, zhořčovadla (jako prevence proti konzumaci)<sup>[9,12,18]</sup>.

Výsledné základní schéma složení komerčně prodávané koncentrované chladicí kapaliny vypadá takto: cca 90 % nemrznoucí složky, 5-7 % přísad a 3-5 % vody. Pro vlastní použití se pak tato kapalina ředí na optimálních 33-50 % v/v s destilovanou vodou<sup>[15]</sup>.

## 2.2 Fosfáty a boráty

### 2.2.1 Význam

Korozivní efekt vody ve směsi s nemrznoucí složkou je větší než u samotné vody, jelikož se jejich korozivní efekty sčítají. Ve vodě jsou obsaženy ionty způsobující korozi, např. chloridy a sírany, a také molekuly kyslíku. Minerální ionty zvyšují elektrickou vodivost vody, a tím usnadňují tok korozních proudů, snižují účinnost přírodních ochranných fólií; navíc sírany hrají zvláštní roli v bakteriální korozi<sup>[19]</sup>. Ze strany glykolové složky vlivem vysoké teploty a rozpuštěného kyslíku dochází v kapalině k postupné přeměně ethylen- a propylenglykolů na odpovídající kyseliny, které jsou vůči materiálům chladicích systémů agresivní a způsobují takzvanou kyselou korozi. Kromě toho existují i další typy koroze, například erozivní koroze (způsobená pevnými částicemi oxidovaných kovů), galvanická neboli elektrochemická koroze (vyvolaná dočasnými rozdíly napětí mezi dvěma různorodými kovy) a lokalizovaná koroze (objeví se v místě vystaveném korozivnímu faktoru)<sup>[3,20]</sup>.

Správný a účinný přidaný inhibitor musí eliminovat vlivy označených faktorů a potlačovat veškeré druhy koroze. Podle více studií provedených v minulosti<sup>[21]</sup> jsou anorganické kyslíkaté anionty velice účinnými inhibitory koroze. Mezi takové anionty, jež pochází z odpovídajících kyselin nebo solí nebo dokonce organických derivátů, patří například chromany, molybdenany, vanadičnany, a také fosfáty a boráty. V praxi se často mísí více inhibitorů pro lepší antikoroziční efekt, jelikož různé anionty mají různý účinek na kovy; toto je také důvodem, proč neexistuje jedna univerzální chladicí kapalina<sup>[22]</sup>.

Mechanismus působení fosfátů a borátů v chladicích kapalinách je dvojitý. Na jednu stranu tyto anionty (a některé další, např. nejvíce zastoupené a současně používané křemičitany) vytvářejí na povrchu komponentů chladicího systému tenkou vrstvu oxidovaných kovů, která zabraňuje korozi pokračovat dál (tj. probíhá pasivace). Nejvíce pozitivně to působí na železo a jeho slitiny, a také na hliník. Tento jev může být současně i nevýhodou, jelikož může hrozit ucpávání trubic, zejména pro kontinuálně pracující motory, jež neobsahují hliník (tzn. těžké vozy a průmyslové motory). Na druhou stranu fosfáty a boráty hrají roli pufrů, regulují pH neutralizací kyselin vznikajících z nemrznoucích přísad a tím zabraňují kyselé korozi<sup>[3,9]</sup>.

V roli antikoročních přísad se boráty v kombinaci s dusitany začaly přidávat do chladicích směsí již od 60tých let minulého století a fosfáty, doplněné o dusitany a později i o molybdáty, od 80tých let<sup>[23]</sup>. V dnešní době ale podíl IAT-kapalin na trhu klesá, jelikož mají některé nevýhody pro materiály používané v současném „odlehčeném“ automobilovém průmyslu a malou životnost (kvůli chemickým a fyzikálním příčinám), resp. potřebují častější výměnu; pro těžká vozidla je však tento typ chladicích kapalin stále rozšířen<sup>[3,23]</sup>. Nicméně, i tato oblast začíná postupně přecházet na nové formulace OAT nebo hybridní, kde se fosfáty zatím ještě mohou vyskytovat a boráty jsou většinou zakázány<sup>[13,24,25]</sup>.

### 2.2.2 Metody stanovení

Jelikož fosfáty a boráty slouží v chladicích kapalinách jako pufrы, existují testy jejich pufrací kapacity, které lze provádět přímo v provozu. Testovací sady byly komerčně dodávány již v 90tých letech a fungují na principu titrace kapky vzorku kyselinou sírovou za indikace bodu ekvivalence acidobazickým indikátorem. Je to takzvaný test rezervní alkality, který je ale pouze orientační a neposkytuje přesná data vhodná pro analytické chemiky a laboratoře<sup>[23]</sup>.

Primárními metodami pro kvantitativní stanovení fosfátů a borátů (a to jak v chladicích kapalinách, tak i v jiných médiích, například kosmetických přípravcích) jsou iontově-výměnná chromatografie (IEC) a v menší míře kapilární zónová elektroforéza.

**Iontově-výměnná chromatografie** je účinnou metodou pro stanovení anorganických aniontů zastoupených ve vzorcích jak ve stopových, tak i ve větších množstvích, ačkoliv jedním z omezení této metody je nutnost pracovat v čistých zakoncentrovaných roztocích<sup>[26]</sup>. Principem IEC je zadržování analytu ze vzorku na stacionární fázi ukotvené na speciálním pevném nosiči a jeho následné uvolňování pomocí látky mající k této stacionární fázi větší afinitu. Na výstupu ze separační kolony tak dostáváme zónu čistého analytu, jehož průchod, resp. množství lze měřit různými detektory. Nejpopulárnější kombinací pro měření „standardních“ aniontů ( $\text{PO}_4^{3-}$  a dalších, např.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) je však spojení IEC s konduktometrickým detektorem. Větší problém představuje stanovení kyseliny borité, resp. jejích aniontů, jelikož přímé stanovení iontovou chromatografií není

možné vzhledem k její hodnotě  $pK_a = 9,24$ . Tím pádem, boráty musí být předem konvertovány na stabilní komplexy s polyoly, jejichž přesné složení záleží na pH. Mezi používané polyoly patří sorbitol, mannitol nebo glycerol. Na variantě komplexu pak záleží i eluce analytu. Obecně se pro optimální eluci doporučuje, aby eluent měl pH v bazické oblasti a obsahoval supresory a příslušný volný polyol; stacionární fázi jsou většinou kvarterní amoniové soli. Současné stanovení borátů s fosfáty, resp. jinými anionty, metodou IEC pak vyžaduje ještě další složitější operace se vzorkem, které vedou v podstatě k větším ztrátám analytů a falešně nízkým výsledkům<sup>[10,26-31]</sup>.

**Kapilární zónová elektroforéza** je novější a výhodnější metodou na stanovení anorganických aniontů<sup>[32]</sup>. CZE je založena na principu seskupení aniontů jednoho druhu podle jejich mobilit při průchodu kapilárou naplněnou základním elektrolytem (BGE) do zón a následném měření množství analytu v jeho zóně detektorem (podrobněji bude CZE popsáno v následující kapitole). Základní zobecněné podmínky pro stanovení borátových a fosfátových aniontů vedle sebe pak lze shrnout takto: obrácení elektroosmotického toku modifikátorem (nejčastěji se v praktických aplikacích používal cetyltrimethylamonium bromid, CTAB, méně často tetradecyltrimethylammonium bromid, TTAB), zásadité pH v intervalu 9-11 jednotek (limitujícím faktorem hodnoty pH je disociace kyseliny borité), nepřímá detekce pomocí chromanu. Před analýzou není potřeba, na rozdíl od IEC, zbavovat vzorek nemrznoucí složky. Výhodou stanovení těchto analytů metodou CZE je tím pádem jednoduchost potřebných chemikálií, možnost pracovat přímo se vzorky v matrici bez jejich předcházející zdlouhavé úpravy a dostatečná přesnost výsledků<sup>[32-35]</sup>.

Z „exotičtějších“ způsobů (tzn. spíše pro vědecké, než rutinně provozní účely) lze pak aditiva v chladicích kapalinách analyzovat pomocí elektrochemických metod. Například, modifikovanou rotující diskovou elektrodou (RDE), resp. RDE *arc emission* spektrometrií, která při správné kalibraci vykazuje věrohodné výsledky; nicméně tato metoda je primárně určena k analýze automobilových olejů, a také více vhodná především ke stanovení těžkých kovů a kontaminantů v použitých chladicích kapalinách<sup>[12,36]</sup>.

Boráty (resp. jejich deriváty) a některá další aditiva se dřív také stanovovaly spektroskopickými metodami jako plasmová emisní a atomová absorpční spektrometrie, a také titrací<sup>[23,37]</sup>.

## 2.3 Kapilární zónová elektroforéza

### 2.3.1 Teoretický princip a provedení

Kapilární zónová elektroforéza je separační metodou analytické chemie, která využívá rozdílné chování nabitých částic v roztoku pod vlivem vloženého napětí. Během analýzy v křemenné kapiláře se částice stejného druhu shlukují do zón a pohybují se konstantní rychlostí směrem k opačně nabitě elektrodě, a také procházejí detektorem, který je zaznamenává. Hnacími silami v kapilární zónové elektroforéze jsou elektroforetická pohyblivost  $\mu$  a elektroosmotický tok (EOF)<sup>[38]</sup>.

Elektroforetická pohyblivost (neboli mobilita) je definována jako podíl rychlosti  $v$  [ $\text{m s}^{-1}$ ] a intenzity pole  $E$  [ $\text{V m}^{-1}$ ]. Intenzita  $E$  je následně definována jako podíl vloženého napětí  $U$  [ $\text{V}$ ] a celkové délky kapiláry  $l_c$  [ $\text{m}$ ]; rychlost pak také závisí na délce kapiláry do detektoru  $l_d$  [ $\text{m}$ ] a migračním čase zóny  $t_{mig}$  [ $\text{s}$ ]<sup>[39]</sup>:

$$\mu = v/E = (l_d / t_{mig}) / (U / l_c) = l_d \times l_c / (t_{mig} \times U)$$

Pozorovanou pohyblivost iontu také ovlivňuje elektroosmotický tok způsobený materiálem kapiláry. EOF vzniká následujícím mechanismem: za vyšších hodnot pH silanolové skupiny na vnitřním povrchu kapiláry disociují a on tak nabývá záporný náboj schopný elektrostaticky přitahovat kladné solvované částice z roztoku; u stěny kapiláry tak vzniká vrstva, ve které převažují kationty. Po vložení napětí částice z této vrstvy migrují ke katodě, přičemž s sebou unášejí veškerý roztok v kapiláře, včetně záporných aniontů<sup>[38]</sup>. Mobilita molekuly pozorovaná při separaci  $\mu_{poz}$  tím pádem závisí nejen na její efektivní (vlastní) mobilitě  $\mu_{eff}$ , jež funkcí vlastních fyzikálních charakteristik (velikost náboje, velikost molekuly, velikost solvatačního obalu), ale i na mobilitě způsobené EOF  $\mu_{eof}$ <sup>[39]</sup>:

$$\mu_{poz} = \mu_{eff} + \mu_{eof}^{[40]}$$

Vzhledem k dějům probíhajícím v kapiláře, musí být BGE vodivý a je často pufrován. Nejpopulárnější pufrы jsou fosfátové nebo borátové<sup>[38]</sup>, které ale pak ruší stanovení fosfátů a borátů jako analytů, proto je nutné analýzu provádět s použitím jiných BGE.

### 2.3.2 Modifikace elektroosmotického toku

Cílem modifikace elektroosmotického toku je zvýšení kvality separace a zrychlení analýzy, což je nejvíc významné u aniontů s relativně velkou efektivní mobilitou, jako například fosfátové a borátové anionty.

Nejběžnějším a nejvíce flexibilním způsobem ovlivňování rychlosti elektroosmotického toku je přidání organických činidel – povrchově aktivních látek (neboli tenzidů, jinak také surfaktantů) do BGE. Tyto látky mají ve své struktuře nepolární hydrofobní část (nasycený uhlovodíkový řetězec) a polární kladně nabitou skupinu. Pomocí těchto činidel lze EOF jak zmírnit, tak i potlačit; některé druhy tenzidů mohou tok úplně obrátit. Principem jejich účinku je adsorpce látky na povrch kapiláry v důsledku působení elektrostatických a hydrofobních sil a tvorba dvojvrstvy, na jejíž vnitřní hranici obrácené k silanolovým skupinám a vnější hranici obrácené do roztoku je soustředěn pozitivní náboj. Na vnější hranici se pak vytváří další vrstva negativních částic z roztoku, která bude unášena směrem k anodě a stejně jako klasický katodický EOF, i obrácený anodický EOF bude strhávat s sebou veškerý roztok uvnitř kapiláry<sup>[41]</sup>.

Mezi nejvíc používané surfaktanty patří CTAB. Při nízkých koncentracích v BGE tato látka pokrývá kapilární stěnu pouze monovrstvou a odstiňuje záporný náboj disociovaných Si-OH, čímž potlačuje elektroosmotický tok. Při vyšších koncentracích CTAB v kapiláře vytváří druhou vrstvu a tím se EOF otáčí směrem k anodě.

Dalšími často používanými povrchově aktivními látkami jsou TTAB, DTAB (dodecyltrimethylammoniumbromid) a DETA (diethylentriamin).

### 2.3.3 Nepřímá detekce

Detekce v CZE může být založená na různých principech, avšak nejběžnějším typem je detekce spektrometrická. Některé látky, resp. ionty (např. fosfáty a boráty) nemají UV-absorpční schopnosti, a tak nemohou být detegovány přímo. Pro jejich analýzu se proto v kapilární zónové elektroforéze používá nepřímá spektrometrická detekce. Jejím principem je detekce „neabsorbce“, neboli poklesu absorbance. K tomu se do BGE přidává vysoce absorbující iont (chromofor), nabitý stejně jako analyt. Často používanými chromofory v CZE pro detekci aniontů jsou například chroman, benzoát a ftalát, pro

kationty – imidazol a pyridin. Měření probíhá převážně při vlnové délce absorpčního maxima zvoleného chromoforu, tak se vytváří kontinuální signál pozadí, neměnný v případě, že detektorem protéká konstantní koncentrace absorbujícího iontu. Jakmile detekčním okénkem prochází zóna neabsorbujícího analytu, poskytovaný signál kvantitativně klesá a v elektroferogramu se objeví negativní pík. Poté lze buď pracovat přímo se zápornými píky, nebo je převést na tradiční kladný tvar pomocí odečítání analytického signálu od referenčního (naměřeného při předem zvolené referenční vlnové délce, při níž chromofor neabsorbuje)<sup>[38,42,43]</sup>.

Citlivost nepřímé spektrometrické detekce je nižší než přímé, ale splněním několika podmínek lze dosáhnout optimálního výsledku. Zprv, chromofor musí mít vysoký molární absorpční koeficient a mobilitu blízkou mobilitě analytu. Zadruhé, je nutné pečlivě vybírat typ a koncentraci chromoforu a BGE tak, aby analyt v jeho přítomnosti poskytoval signál konstantně rozlišitelný od šumu. Zatřetí, pH základního elektrolytu, resp.  $H^+$  a  $OH^-$  ionty, musí minimálně ovlivňovat proces tvarování zóny analytu<sup>[43]</sup>.

#### **2.3.4 Dávkování**

Dávkování vzorku v CZE lze provést dvěma způsoby: hydrodynamicky a elektrokineticky. Hydrodynamické dávkování je nejběžnější, vzorek se nasává do kapiláry za „použití“ gravitační síly (tzn. rozdílem hladin spojitých nádob) nebo vložení tlaku. Výhodou tohoto typu dávkování je reprezentativní obsah komponentů v kapiláře, nevýhodou pak často menší citlivost pro málo zastoupené látky. Elektrokinetické dávkování je méně používané a funguje tak, že se na nádobku se vzorkem a nádobku s koncovým BGE na krátkou dobu vkládá napětí, které vyvolává pohyb iontů do kapiláry. Odsud je nevýhoda tohoto typu dávkování – preference pohyblivějších iontů před méně pohyblivými a nereprezentativnost výsledného vzorku. Pozitivní stránkou ale je zlepšený detekční limit pro stopové analyty<sup>[44]</sup>.

### **3 Cíl práce**

Cílem této práce je vyvinutí rychlé a efektivní metody pro stanovení borátů a fosfátů v komerčně dostupných chladicích kapalinách vedle sebe. Metoda musí splňovat i řadu dalších parametrů jako: vyžadovat minimální předúpravu vzorků, používat běžné chemikálie, mít dostatečně nízké meze detekce a stanovitelnosti a široký kalibrační rozsah, a také snadný způsob vyhodnocování dat.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

- chladicí kapaliny různých značek na bázi ethan-1,2-diolu: CS antifreeze G 11 (VZ001), Fridex G 48 (VZ002), Sheron antifreeze G 48 (VZ003), CarLineantifreeze G 48 (VZ004), CleanFox antifreeze G 48 (VZ005), Cinol antifreeze G 48 (VZ006) (ČR),
- deionizovaná voda MiliQ (Millipore, USA),
- hydroxid sodný 1 mol l<sup>-1</sup> (Agilent Technologies, Německo),
- kalibrační pufrы pro pH-metr o pH 4,0, 7,0 a 10,0 (Honeywell Fluka, USA),
- kyselina boritá krystalická čistá (Lachema, ČR),
- fosforečnan draselný, chroman sodný (čistota ≥ 99,5%, Lach-Ner, ČR),
- kyselina 2,6-pyridindikarboxylová (PDC), cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), kyselina octová, kyselina chloroctová, kyselina benzensulfonová (čistota ≥ 98,0 %, Sigma -Aldrich, Německo),
- kyselina 2-(*N*-morfolino)-ethansulfonová (MES), kyselina *N*-cyclohexyl-2-aminoethansulfonová (CHES), kyselina 3-(*N*-morfolino)-propansulfonová (MOPS), kyselina *N*-tris(hydroxymethyl)-methyl-3-amino-propansulfonová (TAPS), kyselina *N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonová (HEPES), L-lysin monohydrát, kyselina α-aminooctová (čistota ≥ 99,5%, Carl Roth, Německo),
- ethanol 96%, methanol p.a. (Lachner, ČR).

### 4.2 Instrumentace

- kapilární elektroforézy CE 1600 a 7100 s detektorem s diodovým polem (Agilent Technologies, Německo),
- pH-metr 3540 pH & Conductivity Meter (Jenway, Velká Británie),
- analytické váhy 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko);
- nepokrytá křemenná kapilára o délce 50,0/41,5 cm a vnitřním průměru 75 μm, nepokrytá křemenná kapilára o délce 80,0/71,5 cm a vnitřním průměru 75 μm (Polymicro Technologies, USA).

### 4.3 Pracovní podmínky

Teplota kazety s křemennou byla konstantně udržována na 25 °C. Každý den před a po vlastním měření se kapilára promývala 5-7 minut 1M roztokem NaOH a poté 5-7 minut deionizovanou vodou. Součástí metody bylo také promývaní kapiláry základním elektrolytem před každou separací, a to po dobu 2 minut (první minutu byla výstupní nádobkou vialka s odpadem, další minutu se promývalo do vialky se základním elektrolytem). Dávkování vzorků bylo prováděno jednak hydrodynamicky (tlak 5 kPa, čas dávkování 3-10 s), jednak elektrokineticky (dávkovací napětí od -5 do -30 kV po dobu 10-20 s). Separací napětí bylo -20 kV. Detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce 254 nm.

### 4.4 Příprava pracovních roztoků

#### 4.4.1 Příprava základního elektrolytu

Základním elektrolytem byl roztok 10 mM chromanu sodného a 1 mM CTAB o pH = 11,5. Roztok se připravoval čerstvý před každým laboratorním dnem.

Na začátku byly připraveny zásobní roztoky (z.r.) chromanu o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup> a CTAB o koncentraci 20 mmol l<sup>-1</sup>: na analytických váhách bylo odváženo přesné množství látky a kvantitativně převedeno do odměrné baňky, doplněno po rysku deionizovanou vodou a mícháno do úplného rozpuštění krystalů (v případě CTAB byl roztok zahříván, a také se občas doplňkově zahříval před přípravou základního elektrolytu, jelikož za nižších laboratorních teplot CTAB má tendenci krystalizovat). Tyto roztoky pak byly přelity do zásobních skleněných lahviček pro dlouhodobé uchování.

Před každým použitím byl pH-metr kalibrován tříbodovou kalibrací pomocí kalibračních pufrů o pH = 4, 7 a 10.

Vlastní BGE se připravoval takto: bylo pipetováno vypočtené množství zásobního roztoku chromanu sodného a naředěno deionizovanou vodou na příslušnou koncentraci. Tento roztok pak byl pod kontrolou pH-metru titrován 1M hydroxidem sodným do dosažení požadovaného pH. Pak byl do elektroforetických vialek pipetován zásobní CTAB

30  $\mu\text{l}$  a následně ředěn roztokem chromanu. Zmenšením koncentrace chromanu v takto zhotoveném BGE bylo zanedbáno, jelikož se jednalo o  $\leq 5\%$  změnu.

#### 4.4.2 Příprava standardů, roztoků vzorků, matrice

Standardní roztoky fosfátů a borátů o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny následujícím způsobem: na analytických váhách bylo odváženo přesné množství látky (fosfát draselný, kyselina boritá) a kvantitativně převedeno do odměrné baňky, doplněno po rysku deionizovanou vodou a mícháno do úplného rozpuštění krystalů. Tyto roztoky pak byly přelity do zásobních skleněných lahvíček pro dlouhodobé uchovávání.

Ze standardních roztoků analytů byl připravován vždy čerstvý modelový roztok obsahující fosfáty a boráty o stejné koncentraci  $0,083 \text{ mg ml}^{-1}$ : do elektroforetické vialky bylo pipetováno  $50 \mu\text{l}$  zásobního  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $50 \mu\text{l}$  zásobní  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a  $500 \mu\text{l}$  deionizované vody.

Roztoky všech testovaných vnitřních standardů o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  a následně dvou vybraných pracovních vnitřních standardů (kyselina chloroctová, MES) o koncentraci

$10 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny takto: na analytických váhách bylo odváženo přesné vypočtené množství krystalické látky a kvantitativně převedeno do odměrné baňky, doplněno po rysku deionizovanou vodou a mícháno do úplného rozpuštění krystalů. Zkušební roztoky se použily ihned, pracovní roztoky pak byly přelity do zásobních skleněných lahvíček pro dlouhodobé uchovávání.

Vzorky chladicích kapalin byly nejprve  $5\times$  naředěny jako zásobní roztoky: do odměrné baňky bylo pipetováno spočítané množství chladicí kapaliny a doplněno po rysku deionizovanou vodou. Tyto roztoky pak byly přelity do zásobních skleněných lahvíček pro dlouhodobé uchovávání a použití k přípravě naředěných vzorků na měření.

Měřené roztoky chladicích kapalin se připravovaly pipetováním spočítaného množství zásobních roztoků do elektroforetických vialek; složení roztoků se při různých pokusech vždy lišilo, ale lze rozlišit 3 základní typy (*Tabulka 1*). Rozsah koncentrací přídavek standardů respektoval očekávané množství analytů ve vzorcích, koncentrace vnitřního standardu byla přizpůsobena tak, aby výška jeho píku nepřekračovala maximální výšku píku nejkoncentrovanějšího z analytů. Standardní přídávky se měřily v 2 až 6 koncentračních hladinách. Konečné ředění vzorku chladicí kapaliny v měřeném roztoku

bylo 20 až 50krát.

**Tabulka 1.** Složení měřených roztoků

Vzorek (kód)	Chladicí kapalina (ředění)	Vnitřní standard [mg ml <sup>-1</sup> ]	Fosfáty (standard) [mg ml <sup>-1</sup> ]	Boráty (standard) [mg ml <sup>-1</sup> ]
VZ00x_čistý	20-50×	0	0	0
VZ00x_VS	20-50×	0,10 – 0,40	0	0
VZ00x_SPy	20-50×	0,10 – 0,40	0,042 – 0,48	0,050 – 0,50

Matrice vzorku byla připravena smícháním jednoho dílu deionizované vody a jednoho dílu ethylenglykolu ve skleněné lahvičce pro dlouhodobé uchování.

## 4.5 Pokusy s modelovým roztokem

### 4.5.1 Migrační pořadí

Ke zjištění migračního pořadí (resp. orientačních migračních časů) byly použity 3 roztoky: blank (deionizovaná voda), roztok fosfátu (0,083 mg ml<sup>-1</sup>) a modelový roztok fosfátu s borátem (0,083 mg ml<sup>-1</sup>). Dané roztoky se změřily ve dvojicích za podmínek popsanych v literatuře<sup>[33]</sup> (v kapiláře s délkou 50,0/41,5 cm a vnitřním průměrem 75 μm, BGE 10 mM chroman sodný + 5 mM CTAB, hydrodynamické dávkování tlakem 5 kPa po dobu 3 s). Naměřené píky byly přiřazeny odpovídajícím látkám.

### 4.5.2 Optimalizace pH BGE

Na modelovém roztoku byly vyzkoušeny 4 varianty základního elektrolytu měřeného vždy v tripletech: o neupraveném pH (kolem 8,32), o pH upraveném hydroxidem sodným na 9,50; 10,50 a 11,50. Mezi jednotlivými hodnotami pH BGE byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a zkoušeným elektrolytem podle kapitoly 4.3.

### 4.5.3 Optimalizace složení BGE

Pro základní elektrolyt bylo vyzkoušeno několik látek umožňujících nepřímou detekci: benzensulfonát, pyridindikarboxylát (PDC) a chroman, všechny v koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ .

Roztoky benzensulfonátu a PDC byly připraveny z tuhých krystalických látek jako zásobní (koncentrace  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ): na analytických váhách bylo odváženo přesné množství látky a kvantitativně převedeno do odměrné baňky, doplněno po rysku deionizovanou vodou a mícháno do úplného rozpuštění krystalů.

Zkušební BGE byly připraveny podle stejného schématu: do kádinky byl pipetován jeden díl zásobního roztoku detekční látky a 9 dílů deionizované vody. Tento roztok pak byl pod kontrolou pH-metru titrován 1M hydroxidem sodným do dosažení požadovaného  $\text{pH} = 11,50$ . Pak do plastových elektroforetických vialek byl pipetován zásobní CTAB  $150 \mu\text{l}$  a následně ředěn roztokem detekční látky na  $600 \mu\text{l}$  a opatrně zamíchán.

Varianty BGE byly vyzkoušeny na modelovém roztoku při hydrodynamickém dávkování ( $5 \text{ kPa}$ ,  $3 \text{ s}$ ), vždy ve třech opakovaných měřeních. Mezi jednotlivými variantami BGE byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a základním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

### 4.5.4 Optimalizace koncentrace CTAB v BGE

Na modelovém roztoku při konstantní koncentraci chromanu ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) v základním elektrolytu bylo vyzkoušeno 5 variant koncentrace CTAB: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0  $\text{mmol l}^{-1}$ . Tyto koncentrace byly připravovány přímo v elektroforetických vialkách pipetováním spočítaného množství zásobního roztoku a doplněním roztokem chromanu o upraveném pH na  $600 \mu\text{l}$ . Každé měření se opakovalo v tripletech. Mezi jednotlivými variantami BGE byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a zkušebním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

#### **4.5.5 Optimalizace koncentrace chromanu v BGE**

Na modelovém roztoku při konstantní koncentraci CTAB ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) v základním elektrolytu byly vyzkoušeny 3 varianty koncentrace chromanu: 5, 10 a  $15 \text{ mmol l}^{-1}$ . Tyto koncentrace byly připravovány ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou ve spočítaném poměru a následnou úpravou pH hydroxidem sodným na 11,50. Dále do elektroforetických vialek bylo pipetováno  $30 \mu\text{l}$  zásobního roztoku CTAB naředěno roztokem chromanu na  $600 \mu\text{l}$ . Každé měření se opakovalo v tripletech. Mezi jednotlivými variantami BGE byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a zkušebním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

### **4.6 Optimalizační pokusy s reálnými vzorky**

#### **4.6.1 Ředění chladicích kapalin**

Zprvė byla měřena sada zásobních roztoků všech 6 vzorků chladicích kapalin (připrava je popsána v kapitole 4.4.2) za podmínek hydrodynamického dávkování (tlak  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ s}$ ) a v BGE optimalizovaném na modelovém roztoku. Každé měření se opakovalo v tripletech. Mezi jednotlivými vzorky byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a základním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

Poté byly za stejných podmínek separace změřeny 4 vzorky o konečném ředění 20 až 50krát, a to pro jednu chladicí kapalinu číslo 001. Měřené vzorky se připravovaly pipetováním spočítaného objemu zásobního roztoku chladicí kapaliny (ředění 5x) do elektroforetických vialek a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem  $600 \mu\text{l}$ . Každé měření se opakovalo v tripletech.

#### **4.6.2 Délka kapiláry**

K testování vhodné délky byly připraveny 2 kapiláry: již používaná pracovní křemenná kapilára o délce  $50,0/41,5 \text{ cm}$  a vnitřním průměru  $75 \mu\text{m}$ , a také křemenná kapilára o délce  $80,0/71,5 \text{ cm}$  a vnitřním průměru  $75 \mu\text{m}$ . Obě kapiláry byly před použitím

připraveny promýváním 5-7 minut 1M roztokem NaOH a poté 5-7 minut deionizovanou vodou. Před analýzou vzorku se kapilára vždy promývala základním elektrolytem (jak je popsáno v kapitole 4.3).

Testovací vzorek byl připraven takto (v závorkách jsou uvedeny koncentrace ve výsledném vzorku): do elektroforetické vialky bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku chladicí kapaliny č. 001 ( $20\times$  ředění), 24  $\mu\text{l}$  MES ( $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ ), 60  $\mu\text{l}$  standardního roztoku fosfátu ( $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a doplněno deionizovanou vodou na 600  $\mu\text{l}$ .

Měření se provádělo v tripletech, za hydrodynamického dávkování (5 kPa, 3 s), v optimalizovaném BGE.

#### **4.6.3 Výběr vnitřního standardu**

Jako vnitřní standardy byly vyzkoušeny: lysin, glycin, kyseliny octová a chloroctová (ClAc), CHES, HEPES, TAPS, MOPS a MES.

K testování byla připravena sada měřených vzorků: do elektroforetické vialky obsahující 60  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku vzorku chladicí kapaliny č. 001 bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  testovaného standardu (příprava je v kapitole 4.4.2) a doplněno deionizovanou vodou na 600  $\mu\text{l}$ . Pro některé vzorky bylo před vodou také navíc přidáno 50  $\mu\text{l}$  standardního roztoku  $\text{K}_3\text{PO}_4$ .

Měření se provádělo v tripletech, za hydrodynamického dávkování (5 kPa, 3 s), v optimalizovaném BGE. Mezi jednotlivými vnitřními standardy byla kapilára promývaná 1M NaOH, deionizovanou vodou a základním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

### **4.7 Testování metody**

#### **4.7.1 Kalibrační závislost**

Pomocí dvou sad vzorků byly sestaveny 2 kalibrační závislosti relativní plochy píku na koncentraci analytu, a to pro oba analyty.

Každá sada obsahovala 6 vzorků, připravených ze standardních roztoků fosfátů a

borátů a lišících se mezi sebou koncentracemi analytů (v rámci jednoho vzorku jejich koncentrace byla vždy stejná), a také druhem vnitřního standardu konstantní koncentrace (*Tabulka 2*).

**Tabulka 2.** Charakterizace vzorků použitých k sestavení kalibrační závislosti

	<b>Sada A</b>	<b>Sada B</b>
<b>Přítomný analyt</b>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , BO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , BO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
<b>Koncentrace analytu</b>	0,025 – 0,48 mg ml <sup>-1</sup>	0,025 – 0,48 mg ml <sup>-1</sup>
<b>Vnitřní standard</b>	MES	ClAc
<b>Koncentrace VS</b>	0,40 mg ml <sup>-1</sup>	0,40 mg ml <sup>-1</sup>

Měření se provádělo v tripletech, za hydrodynamického dávkování (5 kPa, 3 s), v optimalizovaném BGE. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývaná základním elektrolytem; mezi sériemi promývání zahrnovalo také 1M NaOH a deionizovanou vodou podle schématu z kapitoly 4.3.

#### 4.7.2 Analýza reálného vzorku

Byla připravena sada vzorků, obsahujících 20krát ředěnou chladicí kapalinu č. 001, vnitřní standard (MES, ClAc) o konstantní koncentraci 0,40 mg ml<sup>-1</sup>, přídavek standardů analytů ve čtyřech koncentračních hladinách (fosfátů o koncentraci 0-0,20 mg ml<sup>-1</sup> a borátů o koncentraci 0-0,40 mg ml<sup>-1</sup>).

Každý vzorek se měřil ve tripletech, pomocí hydrodynamického dávkování tlakem 5 kPa po dobu 3 s, v optimalizovaném BGE. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývaná základním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3.

## **4.8 Dodatečná optimalizace**

### **4.8.1 Zkoumání vlivu matrice**

Ke zkoumání vlivu matrice na průběh analýzy byl připraven matriční vzorek, obsahující 20krát naředěnou směs vody s ethylenglykolem (matrice), fosfáty a boráty o koncentraci  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  a vnitřní standard MES o koncentraci  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ . Tento roztok byl dávkován hydrodynamicky (5 kPa, 3 s) a měřen v optimalizovaném BGE ve 4 opakováních. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývaná základním elektrolytem 2 minuty podle schématu z kapitoly 4.3.

### **4.8.2 Výběr typu dávkování**

Různé podmínky dávkování byly vyzkoušeny na 20krát ředěném vzorku chladicí kapaliny č. 001 s přídavkem MES o konečné koncentraci  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ . Tento vzorek byl měřen za hydrodynamického dávkování tlakem 5 kPa po dobu 3, 6 a 10 sekund (separační napětí -20 kV), a poté elektrokineticky dávkovacím napětím -5, -15 a -30 kV po dobu 10 a 20 sekund každé (separační napětí -20 kV). Každé měření se provádělo třikrát. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývaná základním elektrolytem 2 minuty podle schématu z kapitoly 4.3.

## **4.9 Stanovení analytů ve vzorkách**

Ke kalibraci byla připravena sada 6 standardních vzorků obsahujících fosfáty a boráty v rozmezí koncentrací  $0,025 - 0,48 \text{ mg ml}^{-1}$  každý, a MES o konstantní koncentraci  $0,40 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Druhou variantou kalibrační sady byly vzorky obsahující 50krát ředěnou chladicí kapalinu č. 001, vnitřní standard MES o konstantní koncentraci  $0,40 \text{ mg ml}^{-1}$  a přídavek standardů analytů v šesti koncentračních hladinách (fosfátů o koncentraci  $0-0,025 \text{ mg ml}^{-1}$  a borátů o koncentraci  $0-0,50 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

Každý vzorek se měřil ve tripletech, pomocí elektrokinetického dávkování napětím

-5 kV po dobu 10 s, v optimalizovaném BGE. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývaná základním elektrolytem podle schématu z kapitoly 4.3, a po ukončení promyta 5 minut 1M NaOH a 7 minut deionizovanou vodou.

Dále byly připraveny měřené vzorky pro zbylé chladicí kapaliny. Celkem to činilo 5 sad, každá ze 3 vzorků obsahujících 50krát ředěnou chladicí kapalinu, vnitřní standard MES o konstantní koncentraci 0,1 mg ml<sup>-1</sup>, přídavek standardů analytů v třech koncentračních hladinách (fosfátů o koncentraci 0 mg ml<sup>-1</sup> [VZ], 0,0083 mg ml<sup>-1</sup> [SP1] a 0,0125 mg ml<sup>-1</sup> [SP2]; borátů o koncentraci 0 mg ml<sup>-1</sup> [VZ], 0,1 mg ml<sup>-1</sup> [SP1] a 0,2 mg ml<sup>-1</sup> [SP2]). Podmínky měření zůstaly stejné.

## 4.10 Statistické zpracování

### 4.10.1 Asymetrický faktor, tailing faktor

Asymetrický faktor  $A_S$  a tailing faktor  $T_f$  se počítaly v 5 % výšky píku dle následujících rovnic:

$$A_S = \frac{t_{5\%}}{f_{5\%}}$$

$$T_f = \frac{f_{5\%} + t_{5\%}}{2f_{5\%}}$$

kde:  $t_{5\%}$  je šířka vzestupné části píku v 5 % výšky,  $f_{5\%}$  – šířka sestupné části píku v 5 % výšky<sup>[45]</sup>.

### 4.10.2 Zkouška kalibrační přímky

Správnost kalibrační přímky byla zkoušena na reálných vzorkách chladicí kapaliny, z nichž jeden obsahoval přesně známý přídavek standardů analytů, a druhý ho neobsahoval. Z rovnice kalibrační závislosti byla pro tyto 2 vzorky spočítána koncentrace fosfátů a borátů. Dále dle následující rovnice byl spočítán rozdíl koncentrací  $\Delta\tilde{c}$ , což odpovídá

skutečně naměřené koncentraci přídatku, a pak porovnan s koncentrací přidanou do vzorku:

$$\tilde{c}(VZ_{sp}) - \tilde{c}(VZ_0) = \Delta\tilde{c} \lesseqgtr c_{přid}$$

kde:  $\tilde{c}(VZ_{sp})$  je medián vypočtené koncentrace vzorku se standardním přídatkem z několika opakování měření,  $\tilde{c}(VZ_0)$  – medián vypočtené koncentrace vzorku bez standardního přídatku,  $c_{přid}$  – koncentrace přídatku.

Za shodné se považovaly hodnoty  $\Delta\tilde{c}$ , jež se od známého  $c_{přid}$  lišily maximálně o  $\pm 10\%$ .

#### 4.10.3 Mez detekce, mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé vzorky se počítaly z následujících rovnic:

$$LOD = \frac{3 \times h_n}{m}$$

$$LOQ = \frac{10 \times h_n}{m}$$

kde:  $h_n$  je výška šumu v blízkosti analytu,  $m$  – směrnice kalibrační přímky pro výšky píkú<sup>[45]</sup>.

#### 4.10.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla ověřována na reálném vzorku chladicí kapaliny č. 003 s přídatkem standardů analytů ve dvou koncentračních hladinách (SP1: fosfáty 0,0083 mg ml<sup>-1</sup>, boráty 0,1 mg ml<sup>-1</sup>; SP2: fosfáty 0,0125 mg ml<sup>-1</sup>, boráty 0,2 mg ml<sup>-1</sup>). Počet měření pro každý vzorek činil deset. Hodnocení míry opakovatelnosti probíhalo pomocí směrodatné odchyly  $s$ , resp. relativní směrodatné odchyly  $s_r$ .

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \%$$

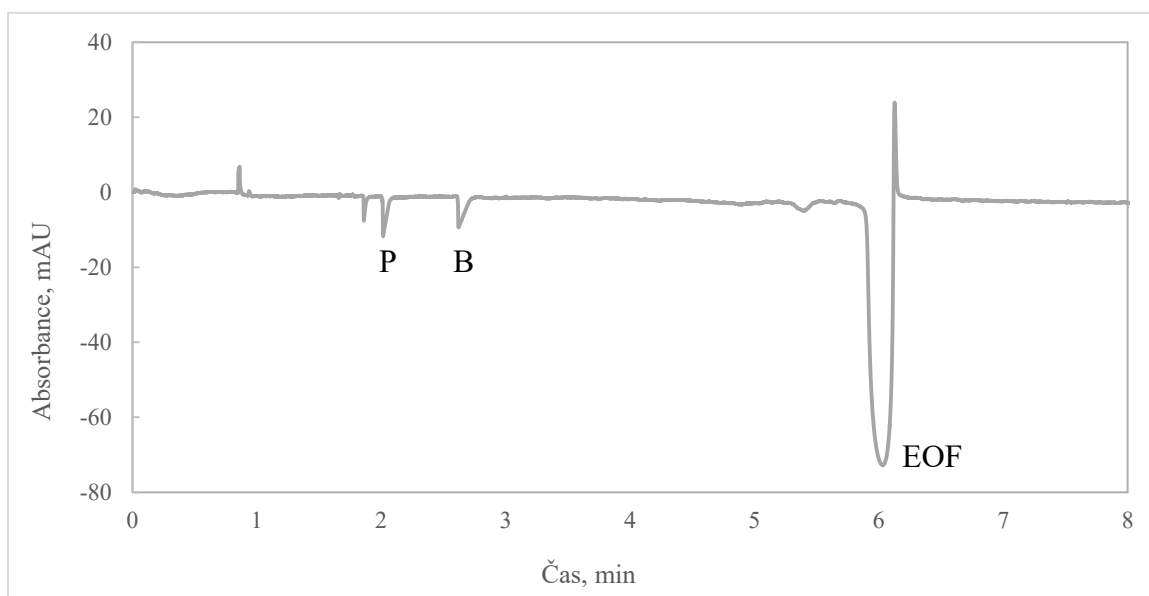
kde  $\bar{x}$  je průměr hodnot,  $x_i$  – i-tá hodnota,  $n$  – počet hodnot, resp. měření<sup>[45]</sup>.

Odchyly se počítaly pro absolutní a relativní plochy píků analytů, migrační časy.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Určování migračního pořadí

Určování pořadí migrace analytů probíhalo za podmínek popsanych v kapitole 4.5.1. Proud vzniklý v systému v průběhu separace činil cca  $-80 \mu\text{A}$ . Porovnáním elektroferogramu poskytnutého modelovým roztokem standardů analytů s elektroferogramy slepého vzorku (čisté deionizované vody) a roztoku standardu fosfátových aniontů bylo zjištěno, jaké píky náležejí jakým látkám. První pík v elektroferogramu modelového roztoku objevující se před 2. minutou byl přítomen i v elektroferogramu slepého vzorku. Jedná se tedy buď o nečistotu přítomnou v použité deionizované vodě, nebo systémový pík. Kolem druhé minuty následuje pík fosfátu, poté v čase přibližně 2,66 min detektorem procházejí boráty. Poslední velký pík kolem šesté minuty odpovídá neutrální zóně, která se pohybuje s elektroosmotickým tokem. Výsledný elektroferogram na *Obrázku 1* znázorňuje píky fosfátů a borátů, a také signál EOF.



**Obrázek 1.** Výsledný elektroferogram modelového roztoku. Písmenem P je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , B – borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Základním elektrolytem byl roztok obsahující 10 mM chroman sodný a 5 mM CTAB, separační napětí činilo -20 kV, detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce záření 254 nm. Koncentrace analytů byla stejná, a to  $0,083 \text{ mg ml}^{-1}$ .

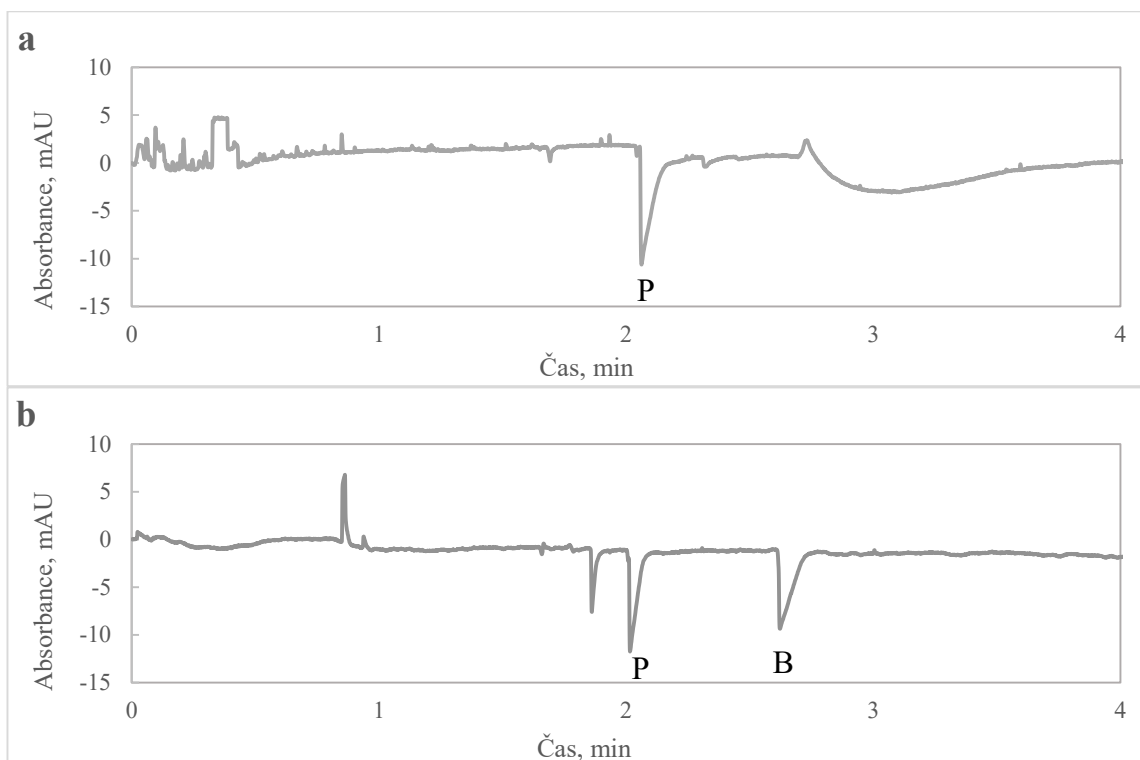
Separace byla úspěšná. Píky analytů jsou od sebe odděleny na základní linii. Problémem byla asymetrie píků chvostujícího charakteru, nejvíce se projevující u borátů, resp. s prodlužujícím se časem separace. Asymetrický faktor  $A_s$  pro fosfáty, jejichž formou při  $\text{pH} = 11,50$  bude primárně  $\text{HPO}_4^{2-}$ , činí 12,50, tailing faktor  $T_f$  se rovná 6,75; pro boráty  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$  tyto hodnoty činí  $A_s = 13,34$  a  $T_f = 7,17$  (vzorci viz kapitola 4.10.1). Chvostování píku může být způsobeno více faktory, např. adsorpcí analytu na stěnu kapiláry nebo elektromigrační disperzí, která dává píkům charakteristický trojúhelníkový tvar. V kapilární zónové elektroforéze jsou chvostující píky častým jevem, který lze potlačit výběrem vhodných složek do základního elektrolytu. V daném případě např. nahrazení chromanu jinými látkami jako benzensulfonát nebo pyridindikarboxylát (PDC) ovlivní elektromigrační disperzi a může snížit chvostování píků. Nicméně se píky analytů nepřekrývají a nevádí vyhodnocení obsahu, a proto chvostování není zásadním problémem.

## 5.2 Optimalizace BGE na modelovém roztoku

Primární optimalizace základního elektrolytu se prováděla na modelovém roztoku obsahujícím pouze standardy analytů a zahrnovala 3 parametry: výběr pracovního  $\text{pH}$ , složení a koncentrace složek BGE.

### 5.2.1 $\text{pH}$ základního elektrolytu

Optimální  $\text{pH}$  roztoku základního elektrolytu bylo vybráno na základě vyhodnocování elektroferogramů zaznamenaných v experimentech provedených podle kapitoly 4.5.2. V tomto pokusu bylo použito BGE o neoptimalizovaném složení, tzn. navrženém na základě informací z literatury, nicméně obecný trend chování analytů v něm byl zcela jasný, což ilustruje *Obrázek 2*.



**Obrázek 2. Elektroferogramy modelového vzorku změřeného v BGE o pH ~ 8,32 a 11,50.**

Graf **a** patří signálu poskytovanému vzorkem při neupraveném pH základního elektrolytu, který činí kolem 8,32; graf **b** patří signálu poskytovanému vzorkem při pH základního elektrolytu upraveném na 11,50. Písmenem P je označován pik fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , B – borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce záření 254 nm.

Vyzkoušeno bylo pH v rozmezí 8,30 (pH roztoku samotného 10 mM chromanu sodného) až 11,50 (upravováno 1M hydroxidem draselným). Vyšší hodnoty pH se nezkoušely z důvodu poměrně vysokých proudů (nad  $80 \mu\text{A}$ ), což mohlo vést k zahřívání roztoku v kapiláře, nutnosti snížit napětí a prodlužování časů analýzy. Se zvyšujícím se pH základního elektrolytu docházelo k ustálení signálu modelového vzorku, zmenšení šumu a driftu základní linie, a také se objevovaly píky analyzovaných aniontů, hlavně se to týče borátu, který v elektroferogramu pro BGE s neupraveným pH není nalezen. Lze to vysvětlit disociačními konstantami odpovídajících kyselin. Kyselina fosforečná má hodnotu  $\text{p}K_{\text{a},2} = 7,21$  a  $\text{p}K_{\text{a},3} = 12,67$ , a proto při zkoušených pH existuje ve formě vhodné pro analýzu; hodnota  $\text{p}K_{\text{a}}$  borité kyseliny pak činí 9,23 a tím jsou její anionty významně zastoupeny pouze v zásaditějších pH základního elektrolytu.

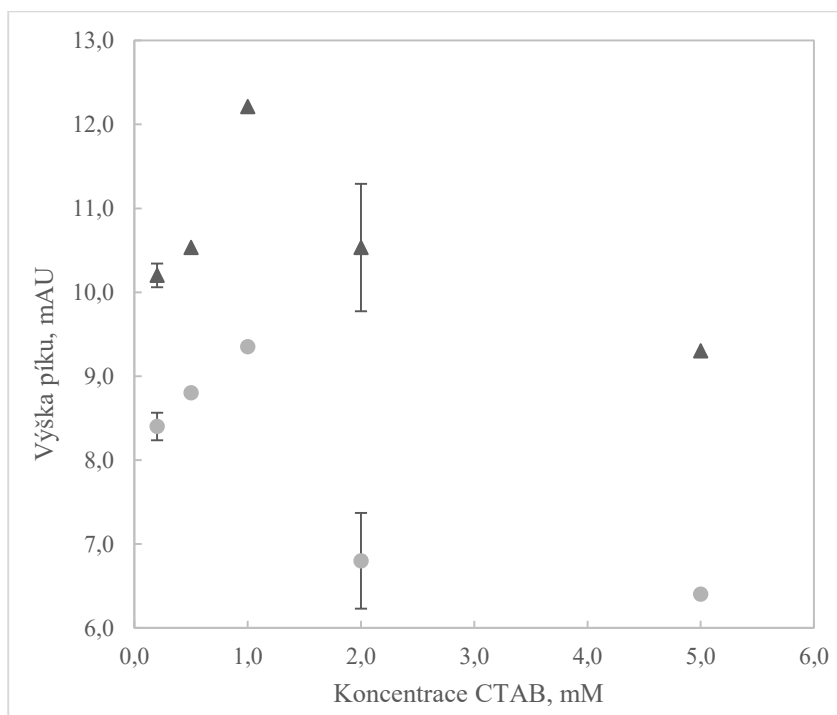
Na základě výsledků pokusů této série bylo pro BGE vybráno pH o hodnotě 11,50.

### 5.2.2 Složení a koncentrace základního elektrolytu

Primárně navržený základní elektrolyt obsahoval 2 hlavní látky: kationtový tenzid *CTAB* v koncentraci  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  a detekční látku *chroman sodný* v koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  umožňující nepřímou spektrometrickou UV detekci neabsorbujících analytů.

**CTAB** je přítomný v roztoku základního elektrolytu v nízké koncentraci a slouží k obrácení elektroosmotického toku v kapiláře (podrobnější informace o roli CTAB jsou uvedeny v kapitole 2.3.2). Díky své nízké koncentraci se příliš nezapojuje do separačních procesů ani výrazně neovlivňuje detekci. Vzhledem k tomu bylo rozhodnuto nezkoušet další alternativní tenzidy a provést pouze koncentrační optimalizaci.

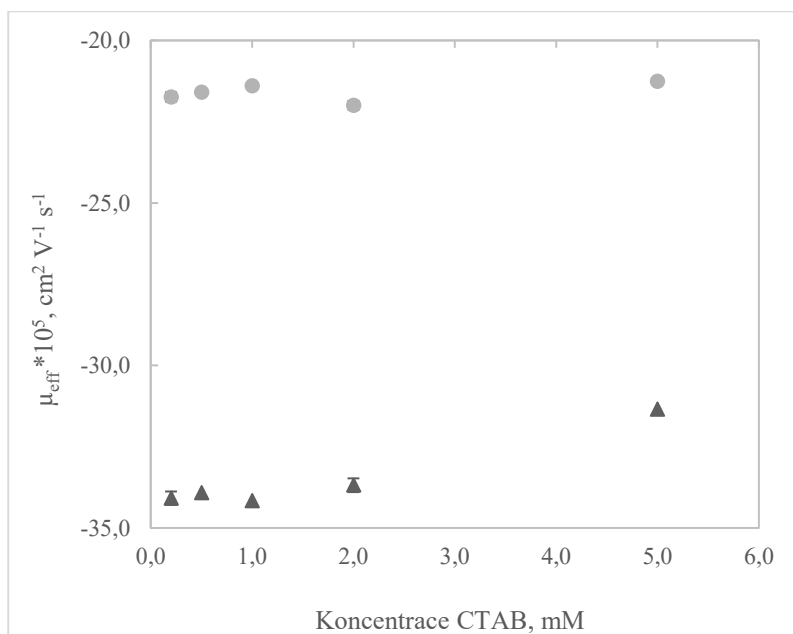
Celkově bylo pro CTAB vyzkoušeno 5 koncentračních úrovní při konstantní koncentraci chromanu sodného  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  (postup provedených experimentů je popsán v kapitole 4.5.4). Ze všech elektroferogramů (šum byl ve všech záznamech podobně velký) byly odečteny výšky píků a migrační časy analytů, a také migrační časy EOF, ze kterých pak byly spočítány efektivní mobility. Tato data slouží podkladem pro 2 grafy, na jejichž základě se usuzovalo o nejvhodnější koncentraci CTAB: graf závislosti výšky píku analytu na koncentraci CTAB (*Obrázek 3*) a graf závislosti efektivní mobility  $u_{eff}$  analytu na koncentraci CTAB (*Obrázek 4*).



**Obrázek 3. Závislost výšky píků analytů na koncentraci CTAB.** Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než  $0,2 \text{ mAU}$ .

Výška píku analytu je důležitým faktorem při posuzování analytické metody, protože souvisí s citlivostí detekce. Výška píku obou analytů rostla do určité hodnoty koncentrace CTAB a pak výrazně klesala, což může souviset s povrchovou aktivitou CTAB. Na začátku postupně docházelo k tvorbě „nasyčené“ dvojvrstvy, která podporovala posun analyzovaných aniontů k detektoru, EOF se posouval k menším časům (absolutní hodnota jeho efektivní mobility rostla). Disperze zóny analytu v tomto úseku klesala: šířka píku se zmenšovala, výška naopak rostla. Při přesycení kapiláry koncentracemi CTAB nad  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  docházelo k zvětšení počtu interakcí záporných analytů s kladně nabitým CTAB u stěny kapiláry, což vedlo k rozšiřování píků analytů, snižování jejich výšky a snížení účinnosti separace. Největší citlivosti bylo tak dosaženo při koncentraci CTAB  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ , a proto tato hodnota byla vybrána jako optimální.

Rozdíl efektivních mobilit analytů je úměrný rozlišení jejich píků. Proto byl sledován vliv koncentrace CTAB na efektivní mobility (Obrázek 4).

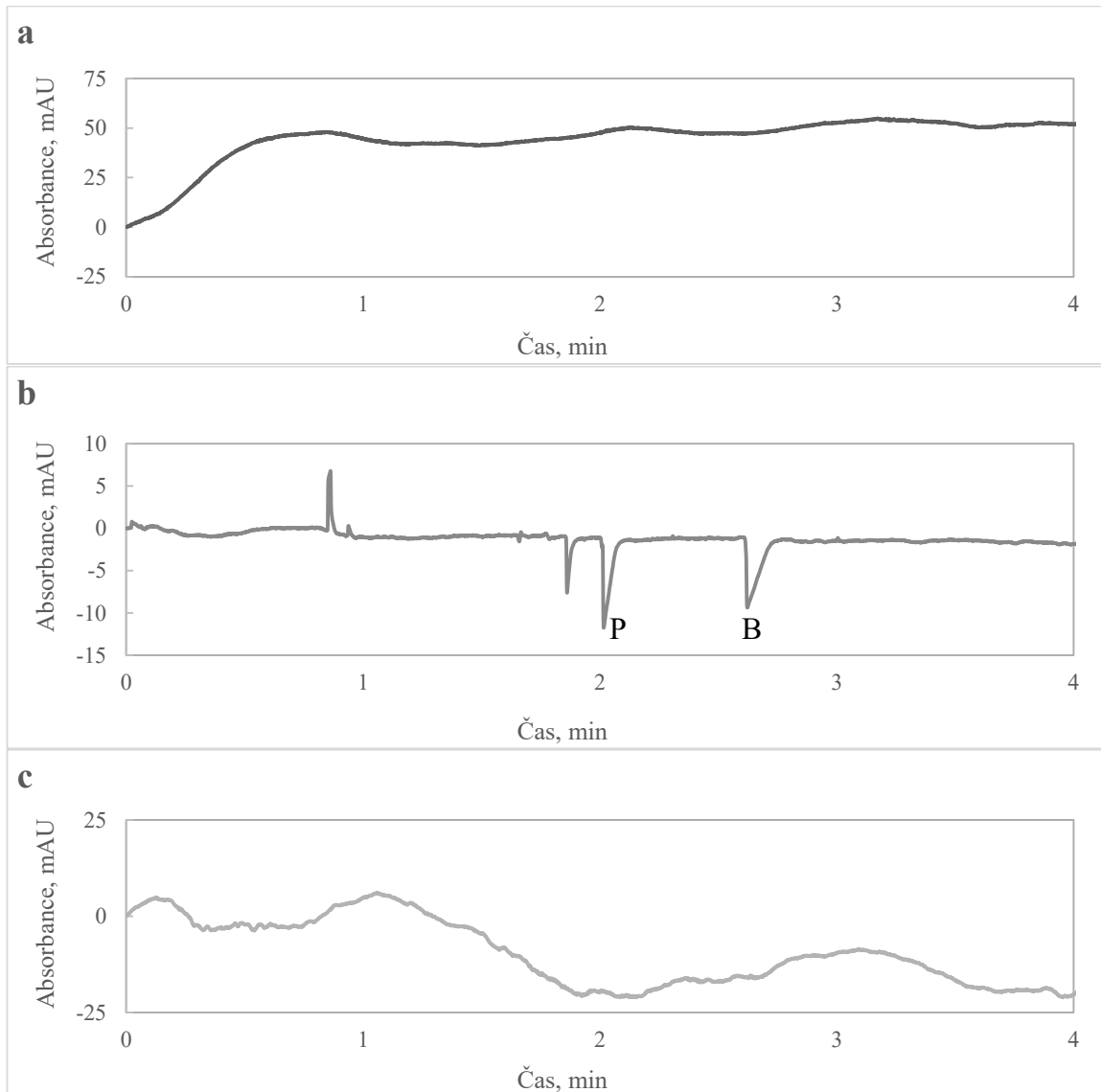


**Obrázek 4. Závislost efektivních mobilit  $\mu_{eff}$  analytů na koncentraci CTAB.** Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než  $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

Na borátový aniont změna koncentrace CTAB vliv prakticky neměla (kolísání hodnot bylo méně než o 2 %). U fosfátového aniontu absolutní hodnota efektivní mobility byla na začátku relativně stabilní a pak klesala (dochází pravděpodobně k interakci s kladně nabitým CTAB); maximální absolutní hodnota se vyskytla při 1 mM CTAB. Tím pádem, mezi mobilitami je největší rozdíl a dochází k nejlepší vzájemné separaci analytů při koncentraci CTAB  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ .

V případě aniontu pro nepřímou UV detekci na druhou stranu mělo smysl testovat různé alternativy **chromanu**, protože povaha detekčního aniontu ovlivňuje citlivost detekce a jeho mobilita ovlivňuje i tvar píků a účinnost separace. V předchozích aplikacích na obdobné téma prokazovaly dobré výsledky také benzensulfonát a pyridindikarboxylát<sup>[46–48]</sup>. Z trojúhelníkového tvaru píků analytů na *Obrázku 2b* je patrná relativně velká elektromigrační disperze, kterou oboje tyto anionty mohou do jisté míry potlačit, jelikož mají menší mobilitu než chroman. Zkušební varianty BGE byly připraveny, jak je uvedeno v kapitole 4.5.3, a provedení experimentů probíhalo za podmínek popsanych v kapitole 4.3. Výsledné elektroferogramy jsou porovnány na

Obrázku 5.

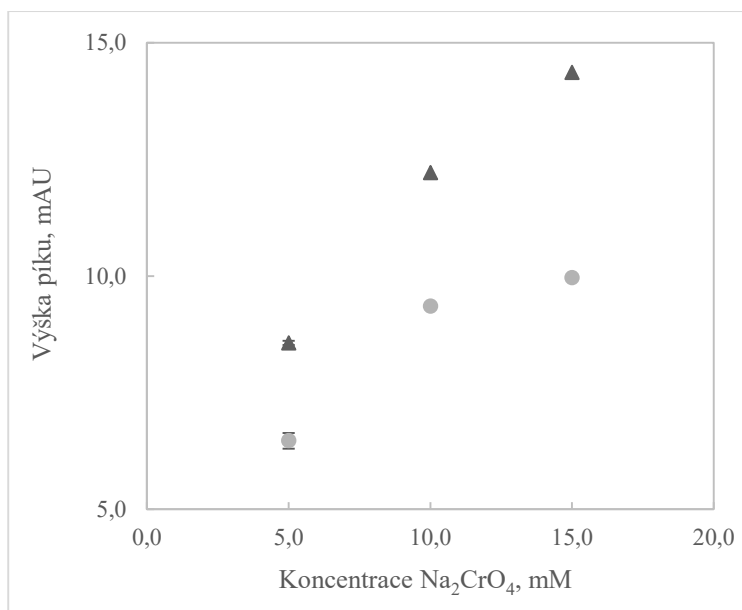


**Obrázek 5. Elektroferogramy modelového roztoku změřeného v základních elektrolytech obsahujících různé varianty detekčních látek. Graf a odpovídá výsledku použití pyridindikarboxylátu, graf b chromanu, graf c benzensulfonátu. Koncentrace detekční látky ve všech BGE je  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ , CTAB  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $\text{pH} = 11,50$ . Písmenem P je označován pik fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , B borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce záření  $254 \text{ nm}$ .**

Nejlepší chování vykazoval chroman, elektroferogramy modelového vzorku za jeho přítomnosti byly přehledné a vhodné pro interpretaci a odečet potřebných dat. Základní elektrolyty s benzensulfonátem a PDC byly zcela neúčinné, jelikož poskytovaly

nestabilní a nereprodukovatelné signály.

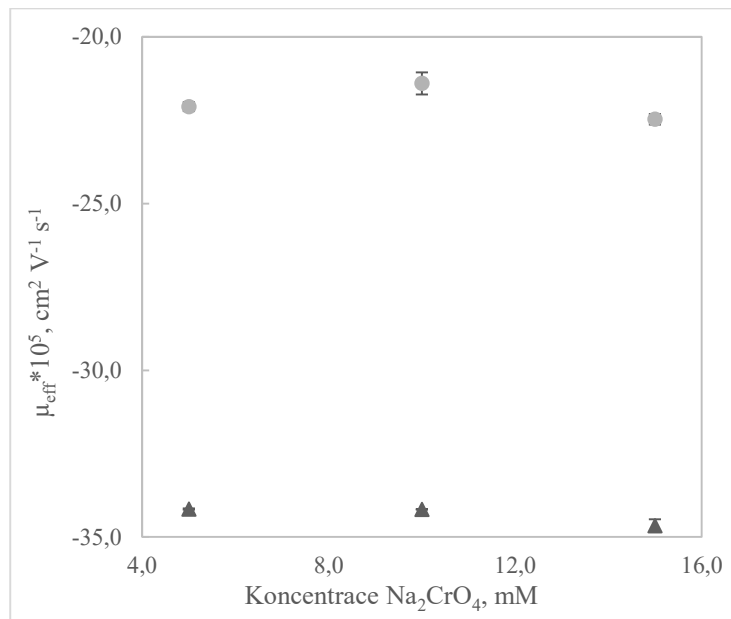
Z výše uvedeného důvodu se proto dále pracovalo s chromanem, jehož optimální koncentrace byla nalezena zpracováním dat z experimentů, jejichž pracovní popis je v kapitole 4.5.5. Optimalizace se prováděla pro 3 koncentrační hodnoty za konstantní již optimalizované koncentrace CTAB  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ , a stejně jako pro tenzid byly sestaveny a analyzovány grafy závislosti výšek a efektivních mobilit analytů na koncentraci chromanu, zobrazené na *Obrázku 6 a Obrázku 7*.



**Obrázek 6. Závislost výšky píků analytů na koncentraci chromanu.** Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než  $0,2 \text{ mAU}$ .

Výška píků roste se zvětšující se koncentrací chromanu. To je v souladu s obecným pravidlem, že při zvyšování vodivosti BGE se zvyšuje účinnost separace a píky se tedy stávají užšími a vyššími. Při vyšší koncentraci chromanu však začínal kolísat proud, což negativně ovlivňovalo analýzu, a proto jako pracovní byla zvolena koncentrace  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ , mající jak dostatečnou úroveň citlivosti, tak i stabilitu poskytovaných signálů.

Na rozdíl od obdobného grafu pro CTAB, graf efektivních mobilit analytů pro chroman (*Obrázek 7*) výrazné trendy neměl, rozdíly mobilit byly porovnatelné, a proto výběr optimální koncentrace detekční látky neovlivnily.



**Obrázek 7. Závislost efektivních mobilit  $\mu_{eff}$  analytů na koncentraci CTAB.** Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $HPO_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[B(OH)_4]^-$ ; jejich koncentrace činila  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$ . Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než  $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

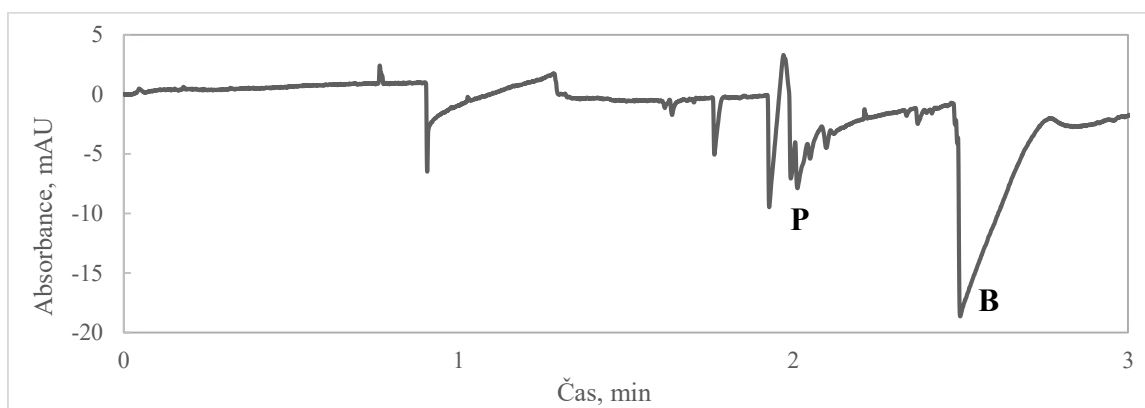
Výsledkem celé této série pokusů kapitoly 5.2 bylo určení konečné varianty základního elektrolytu pro metodu: pH = 11,50, CTAB  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ , chroman sodný  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ .

## 5.3 Optimalizace metody na reálném vzorku

### 5.3.1 Ředění vzorků chladicích kapalin

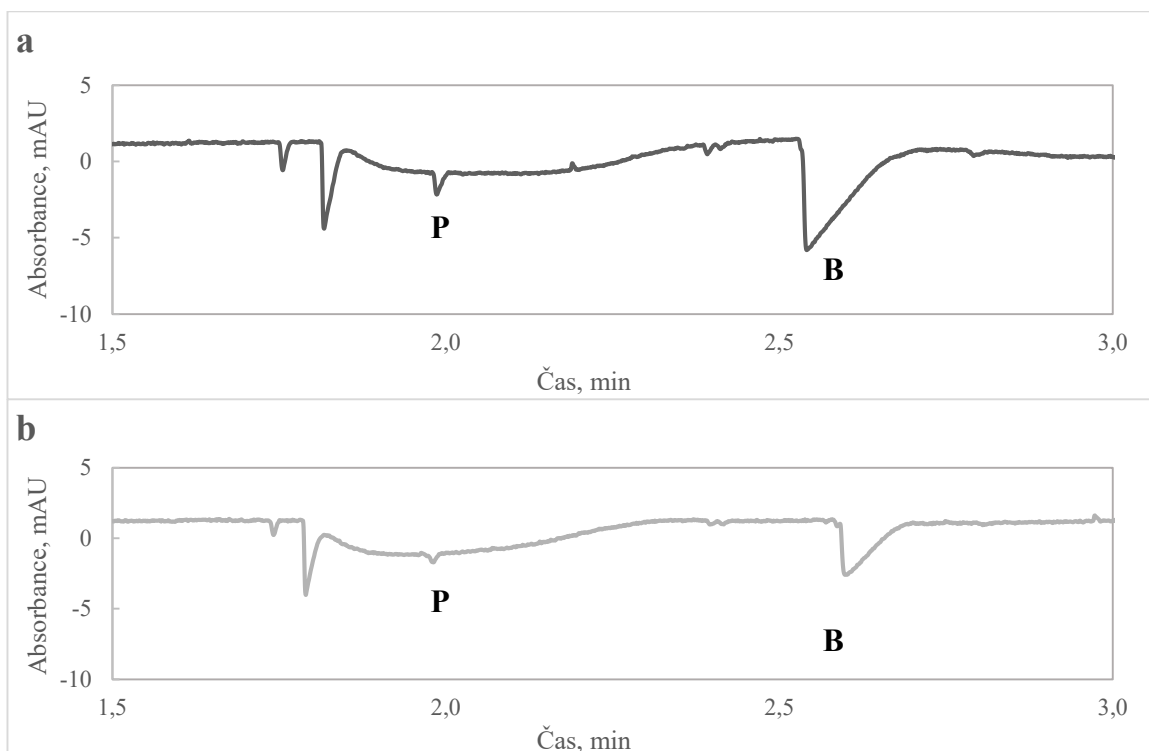
Po primárních optimalizacích metody provedených na modelových roztocích, jež se týkaly základního elektrolytu, byly provedeny sekundární optimalizace zaměřené na další parametry metody. V této fázi se pracovalo s reálnými vzorky chladicích směsí. Všechny vzorky o pětinasobném počátečním ředění proměřené pracovním postupem z kapitoly 4.6.1 poskytovaly nepoužitelné elektroferogramy, jelikož signály těchto vzorků byly relativně nestabilní a měly tendenci se při opakovaném měření posouvat k delším časům (příklad

jednoho elektroferogramu je znázorněn na *Obrázku 8*).



**Obrázek 8.** Elektroferogram 5× naředěného vzorku chladicí kapaliny č. 001. Písmenem P je označován předpokládaný pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , B borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce záření 254 nm.

Kromě toho bylo zjištěno, že plocha píku borátů, resp. jejich koncentrace je více než 10krát větší vůči fosfátům, které navíc k tomu byly špatně identifikovatelné v okolí, přetíženém dalšími píky ze vzorku, což negativně ovlivňovalo společné stanovení analytů. Z důvodů nutnosti vyvážit a stabilizovat signál a šum tak, aby pík fosfátu byl měřitelný a píky borátu a dalších složek vzorku nebyly příliš velké, byl proveden výběr vhodného ředění v rozmezí 20 až 50krát (postup viz kapitola 4.6.1), výsledné elektroferogramy obou případů jsou porovnány na *Obrázku 9*.



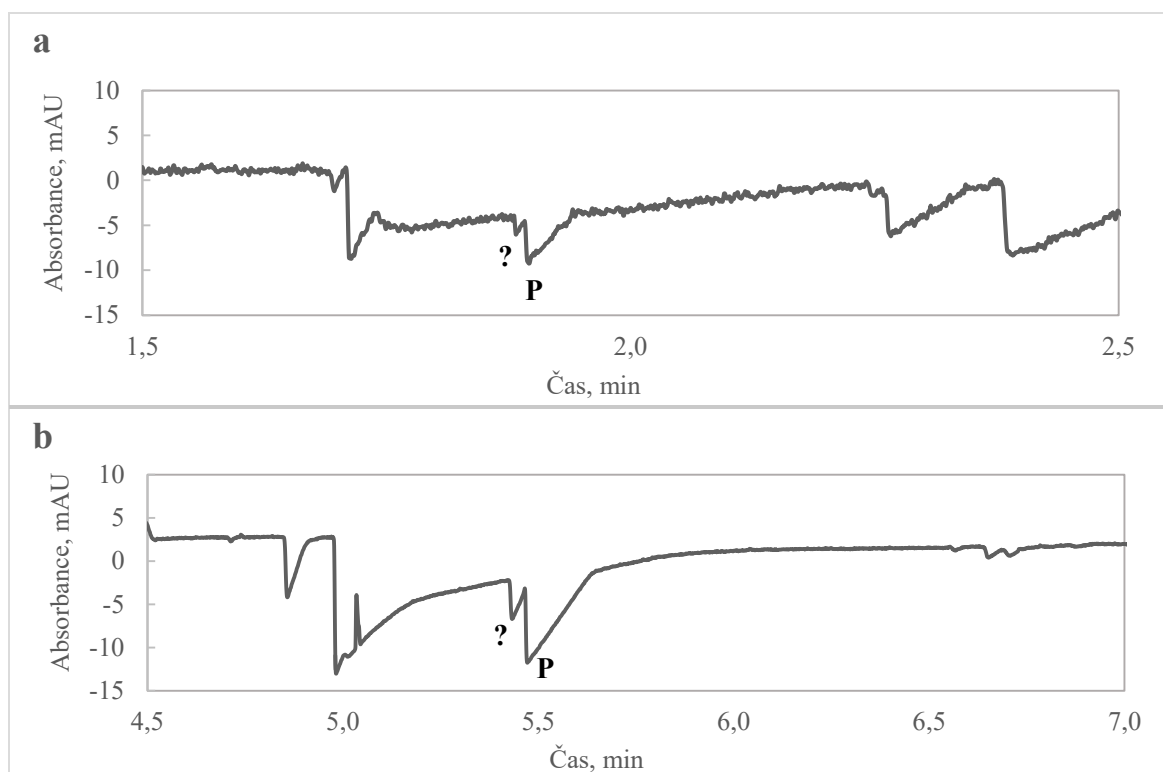
**Obrázek 9. Porovnání elektroferogramů vzorků chladicí kapaliny o různém ředění.** Na grafu **a** je znázorněno ředění 20×, na grafu **b** 50×. Písmenem **P** je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , **B** borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Absorpční spektrometrická detekce při vlnové délce záření 254 nm.

Vhodné byly obě tyto možnosti. Pro méně citlivý starší přístroj (Agilent CE 1600) se v průběhu následujících měření volilo ředění 20×, protože poskytovalo lepší poměr signál/šum pro  $\text{HPO}_4^{2-}$ , pro citlivější přístroj (Agilent CE 7100) bylo pak vhodnější používat 50× ředění, jelikož se při tom usnadňovala kvantifikace borátů.

### 5.3.2 Délka kapiláry

Při detailním zkoumání elektroferogramů byly objeveny malé píky relativně konstantní plochy doprovázející každý analyt, pocházející buď z vody, nebo vznikající rozštěpením zóny analytu vlivem základního elektrolytu. Při vyšších koncentracích docházelo k jejich splynutí s hlavním píkem. Nejvíce to ovlivňovalo vyhodnocení obsahu fosfátů, vzhledem k jejich malé koncentraci a resp. ploše píku. Proto byla vyzkoušena kapilára o délce 80 cm vůči používané 50 cm ke kontrole, jestli se tyto píky podaří rozdělit.

Pro obě kapiláry se měřil jeden stejný vzorek za postupu a podmínek, popsanych v kapitolách 4.6.2 a 4.3, výsledné elektroferogramy jsou představeny na *Obrázku 10*.



**Obrázek 10.** Části výsledných elektroferogramů reálného vzorku chladicí kapaliny za použití kapilár o různé délce. Elektroferogram **a** odpovídá kapiláře s délkou 50,0/41,5 cm, elektroferogram **b** kapiláře délkou s 80,0/71,5 cm. Písmenem **P** je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , otazníkem neznámý pík. Detekce byla absorpční spektrometrická při vlnové délce záření 254 nm.

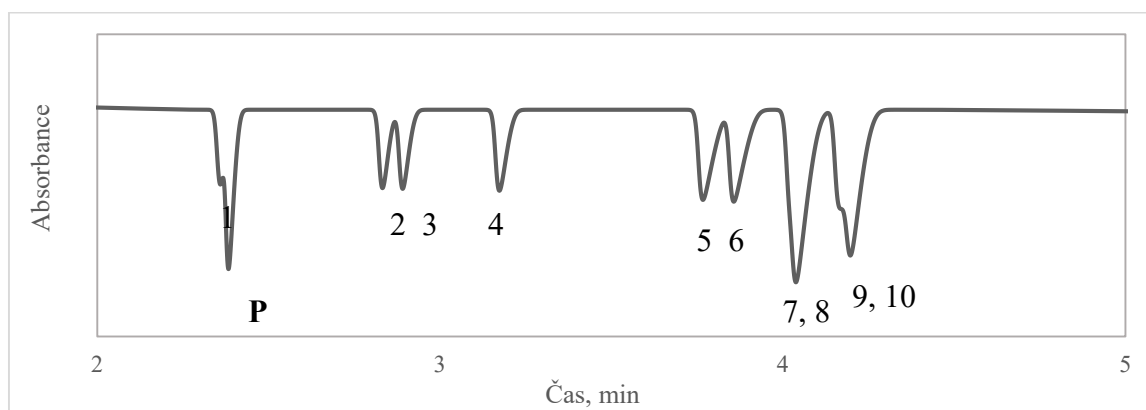
Bylo zjištěno, že na rozdělení píků délka kapiláry vliv neměla, ačkoliv přispívala ke zlepšení intenzity signálu, ale zároveň vedla k silnějšímu rozmývání zóny borátů a prodloužení celkové doby analýzy více než 2krát, ze 4 minut na 11, což nebylo žádoucí vzhledem k počtu vzorků a nutnosti opakovat měření minimálně dvakrát pro dosažení věrohodných výsledků. Proto byla délka kapiláry nechána na původní hodnotě 50 cm.

Pro odhalení původu píku byl také změřen elektroferogram deionizované vody, která se používala v přípravě veškerých roztoků, nicméně z výsledných dat nelze přesně rozhodnout, zda je voda zdrojem: v oblasti fosfátů se vyskytl velký překrývající pík, v oblasti borátů byl nalezen naopak velmi malý pík, který v podstatě lze připsat kolísání

šumu základní linie. Vzhledem k tomu, že píky se objevovaly konstantně a bez ohledu na druh měřeného vzorku, bylo rozhodnuto, že píky mají nejspíš systémový původ, jsou chybou a tak nemohou být předmětem vyhodnocování, proto se při následujícím počítání ploch pík analytů jejich příspěvek nezahrnoval.

### 5.3.3 Vnitřní standard

Velikost ploch pík analytů při opakovaných měřeních kolísá, a proto k eliminaci vlivu tohoto jevu na výsledek kvantifikace analytů bylo rozhodnuto použít vnitřní standard. Pomocí programu Peakmaster<sup>[49]</sup>, který předpovídá migraci a tvar pík analytů a zohledňuje při tom parametry základního elektrolytu, bylo navrženo několik vhodných látek pro zamýšlené účely: lysin, glycin, mravenčí, octová a chloroctová kyselina, CHES, HEPES, TAPS, MOPS a MES. Jejich teoretický elektroferogram v použitém BGE je na *Obrázku 11*.



**Obrázek 11. Elektroferogram spočítaný programem Peakmaster pro různé vnitřní standardy.** Písmenem P je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Čísla 1–10 patří navrhovaným vnitřním standardům: 1 –  $\text{HCOO}^-$ , 2 –  $\text{ClCH}_2\text{COO}^-$ , 3 –  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , 4 – glycin, 5 – MES, 6 – MOPS, 7 – TAPS, 8 – CHES, 9 – HEPES, 10 – lysin.

Již před zahájením měření byly vyloučeny 3 potenciální vnitřní standardy, a to  $\text{HCOO}^-$ , TAPS a HEPES kvůli překryvu jejich pík s píky fosfátů, CHES a lysinu. Experimenty se zbylými látkami a vzorkem chladicí kapaliny č. 001 se prováděly podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.3. Zkoumáním výsledných elektroferogramů pro každou

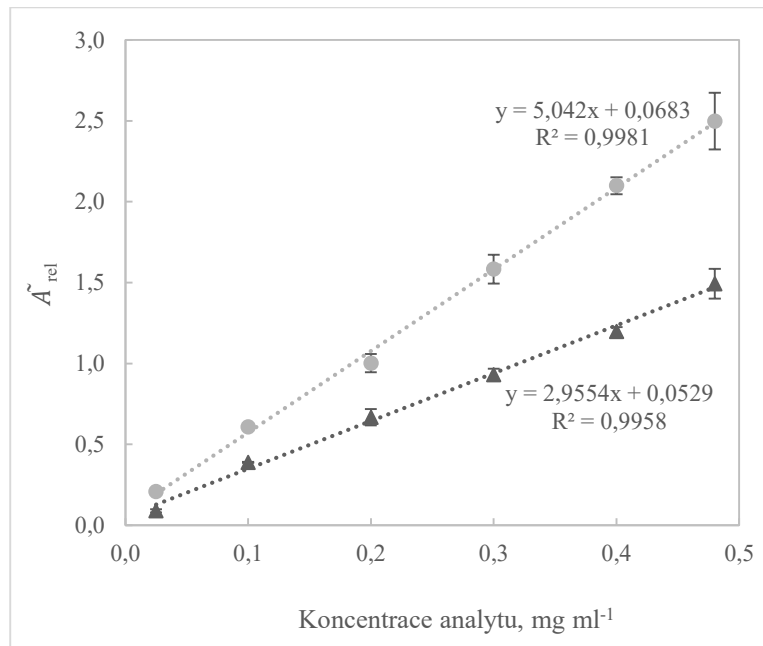
látku bylo zjištěno, že pík glycinu splýval s boráty, které chyběly v predikci kvůli jejich komplikovanému chování v roztoku. Glycin tedy rovněž nebylo možné použít; CHES a lysin se ve vyhrazené době analýzy neobjevily, a tím byly zamítnuty; kyselina octová byla ve stopovém množství přítomná ve vzorku, čímž byla funkce této látky jako vnitřního standardu vyloučena; chloroctan se okrajově překrýval s octanem, a také měl nepatrné překrytí s neznámou látkou ze vzorku, proto bylo rozhodnuto ho nechat jako referenční variantu; MOPS a MES vykazovaly přibližně stejné výsledky, ačkoliv MES byl o něco rychlejší, což hrálo v jeho prospěch, jelikož prodlužování času bylo nežádoucí jednak vzhledem k časové náročnosti analýzy, jednak k rozmývání píků a překrytí s dalšími látkami z matrice.

Tím pádem, jako vnitřní standard byl vybrán **MES**, a k tomu byl referenčně vyzkoušen chloroctan pro kontrolu, zda poloha a rozmývání píku MES ovlivní správnost výsledků.

## 5.4 První testování metody

Po všech předchozích vývojových krocích následovalo testování metody, zda poskytuje správné a stabilní výsledky. Testování spočívalo v sestavení kalibrační závislosti a zjištění koeficientů rovnic přímek, měření vzorků a výpočtu koncentrace analytů, a nakonec ověřování správnosti výsledků. Provedení experimentů probíhalo, jak je popsáno v kapitole 4.7.

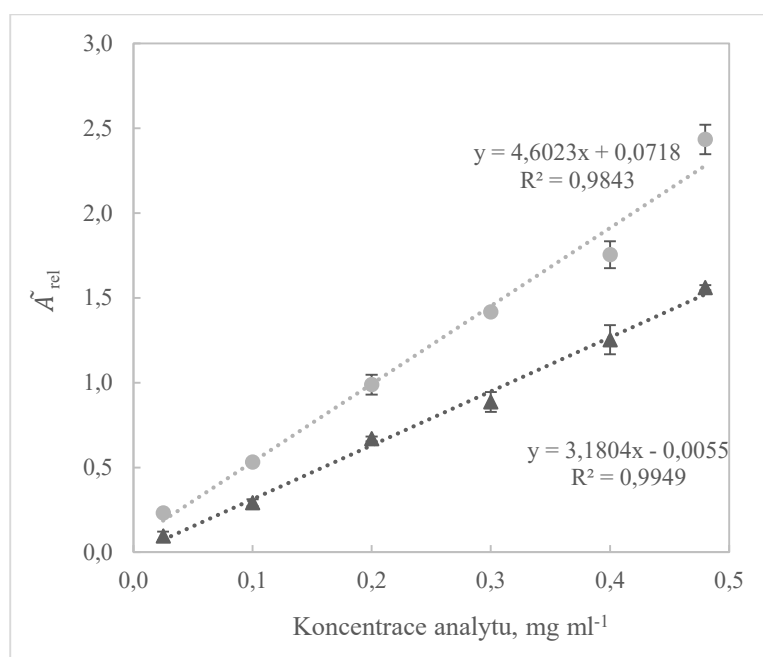
K výpočtu koncentrace analytů ve vzorcích v rutinním laboratorním provozu bylo nevhodnější použít metodu kalibrační přímky, která umožňuje kvantifikovat více vzorků a vyžaduje k tomu méně ruční práce a přístrojového času. **Kalibrační závislost** byla sestavena pomocí sady standardních vzorků obsahujících analyty o několika koncentračních hladinách, vybraných s ohledem na rozmezí očekávaných obsahů, a MES. Tato kalibrační závislost znázorňovala, jak střední relativní plocha píku analytu  $\tilde{A}_{rel}$ , (plocha píku analytu vztažená na plochu píku vnitřního standardu) závisí na koncentraci analytu. Výsledný graf kalibrační závislosti je zobrazen na *Obrázku 12*.



**Obrázek 12.** Graf kalibrační závislosti středních relativních ploch pík analytu pro MES jako vnitřní standard na koncentraci analytu ve vzorku ( $n = 3$ ). Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Přerušovanou čarou jsou označeny spojnice trendů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než 0,2.

Ve zkoušeném intervalu koncentrací aniontů je závislost lineární, což je ověřeno výpočtem hodnoty koeficientu determinace  $R^2$ , která je pro oba analyty větší než 0,99. Pro boráty je koeficient determinace  $R^2 = 0,9981$  o něco vyšší než pro fosfáty  $R^2 = 0,9958$  (resp. totéž platilo ve většině případů i dále), a lze to vysvětlit jejich větším obsahem, který umožňoval přesnější integraci pík.

Jak již bylo zmiňováno v kapitole 5.3.3, jako referenční vnitřní standard byl vybrán chloroctan, proto byla připravena a změřena sada stejných vzorků obsahujících tuto látku místo MES. Kalibrační závislost vytvořená na základě obdržených dat je na *Obrázku 13*. Pro boráty zde byla větší odchylka v linearitě závislosti, zejména se to projevovalo u vysokých koncentrací, kde to pravděpodobně bylo vyvoláno trojúhelníkovým tvarem píku s rozmytým chvostem, u něž bylo při integraci obtížné jednoznačně určit konec.



**Obrázek 13.** Graf kalibrační závislosti středních relativních ploch pík analytu (pro chloroctan) na koncentraci analytu ve vzorku. Trojúhelníkové body patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kulaté borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Přerušovanou čarou jsou označeny spojnice trendů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než 0,2.

Po sestavení kalibrační závislosti, ověření její linearitu a zjištění rovnic kalibračních přímk následovalo **měření sady reálných vzorků**. Tato sada byla připravena obdobně s kalibračními vzorky, tzn. kromě vzorku obsahujícího pouze ředěnou chladičí kapalinu a vnitřní standard, zahrnovala také vzorky dopované přidavky standardů analytů v různých koncentracích. Takto sestavená sada umožňovala provést zpětnou kontrolu správnosti metody. Její smysl spočíval v tom, že vzorek s přidavkem analytu musí vyvolávat odpověď, resp. vést k relativní ploše píku, která odráží součtový obsah aniontů pocházejících z chladičí kapaliny a standardu. Jinak řečeno, rozdíl koncentrací analytu vypočtený pomocí rovnice kalibrační přímky mezi vzorkem s přidavkem standardu a bez přidavku ( $\Delta\tilde{c}$ ) se musí rovnat tomuto přidavku ( $c_{\text{přid}}$ ). V *Tabulce 3* jsou uvedeny k porovnání výsledky provedené kontroly pro sady vzorků, kde vnitřním standardem byl buď MES, nebo chloroctan. Vzorec, podle kterého se prováděl výpočet, je uveden v oddílu 4.10.2.

**Tabulka 3.** Porovnání rozdílů stanovených koncentrací mezi vzorky s a bez přídavků standardů  $\Delta\tilde{c}$  se skutečnými koncentracemi těchto přídavků  $c_{\text{přid}}$  (test 1) s použitím chloroctanu a MES jako vnitřního standardu.

<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>			<b>[B(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup></b>		
$\Delta\tilde{c}$ , <i>mg ml<sup>-1</sup></i> ; <b>chloroctan</b>	$\Delta\tilde{c}$ , <i>mg ml<sup>-1</sup></i> ; <b>MES</b>	<i>c<sub>přid</sub></i> , <i>mg ml<sup>-1</sup></i>	$\Delta\tilde{c}$ , <i>mg ml<sup>-1</sup></i> ; <b>chloroctan</b>	$\Delta\tilde{c}$ , <i>mg ml<sup>-1</sup></i> ; <b>MES</b>	<i>c<sub>přid</sub></i> , <i>mg ml<sup>-1</sup></i>
0,0004	0,0032	0,025	0,137	0,111	0,100
0,0520	0,0576	0,100	0,220	0,197	0,200
0,1137	0,1400	0,200	0,351	0,365	0,400

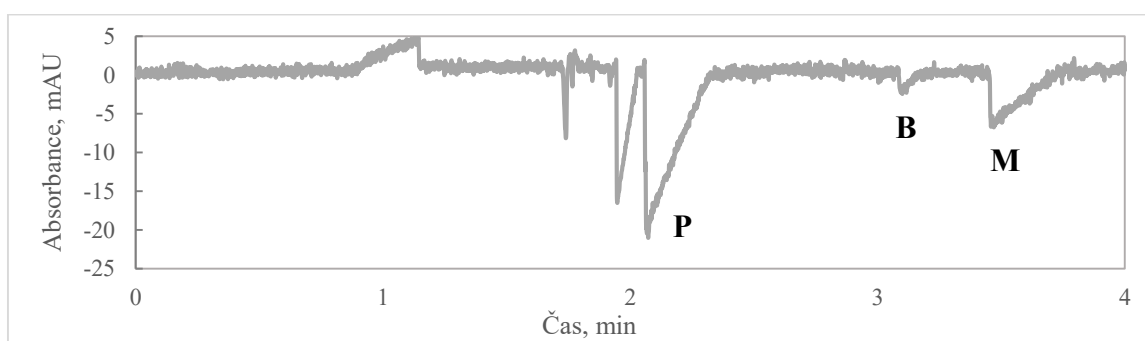
Jak vyplývá z tabulky, v podstatě ani pro jeden vzorek tvrzení z předchozího odstavce neplatí, a tím je celá kalibrační závislost také neplatná pro vzorky s maticí chladicích kapalin. Například pro vzorek s přídavkem fosfátu o koncentraci 0,025 mg ml<sup>-1</sup> byla odpověď tak nízká vzhledem k očekávané, jako kdyby vzorek neobsahoval žádný přídavek; u vyšších koncentrací mají hodnoty vyšší shodu, ale stejně se pohybují v rozmezí maximálně 70 % od hodnoty skutečného přídavku. V případě borátů nabývají hodnoty  $\Delta\tilde{c}$  87-137 % hodnoty  $c_{\text{přid}}$  při vztažení na chloroctan a 91-110 % hodnoty  $c_{\text{přid}}$  při vztažení na MES. Pro všechny vzorky také platí, že metoda funguje lépe při použití MES jako vnitřního standardu, což odpovídá závěrům ohledně chloroctanu, udělaným v kapitole 5.3.3.

Na základě toho bylo rozhodnuto provést další optimalizační kroky, spočívající ve zkoumání vlivu matrice, který byl doposud zanedbán, a také zkoušení jiných způsobů dávkování. Pro další práci byl využíván jako vnitřní standard pouze MES.

## 5.5 Dodatečné optimalizace

### 5.5.1 Matrice

Doposud bylo uvažováno, že díky velkému ředění matrice, kterou činí směs vody s ethylenglykolem (EG) v poměru přibližně 1:1, neovlivní výsledek analýzy vzorku. Nicméně vzhledem k nevyhovujícím výsledkům testování metody bylo rozhodnuto vliv matrice prozkoumat na připraveném modelovém vzorku (postup viz kapitola 4.8.1). Výsledný elektroferogram je zobrazen na *Obrázku 14*.



**Obrázek 14.** Elektroferogram modelového vzorku obsahujícího matrici ve formě směsi voda:EG = 1:1. Písmenem P je označována oblast očekávaného výskytu píku fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , B borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ , M je označen MES. Absorpční spektrometrická detekce při vlnové délce záření 254 nm.

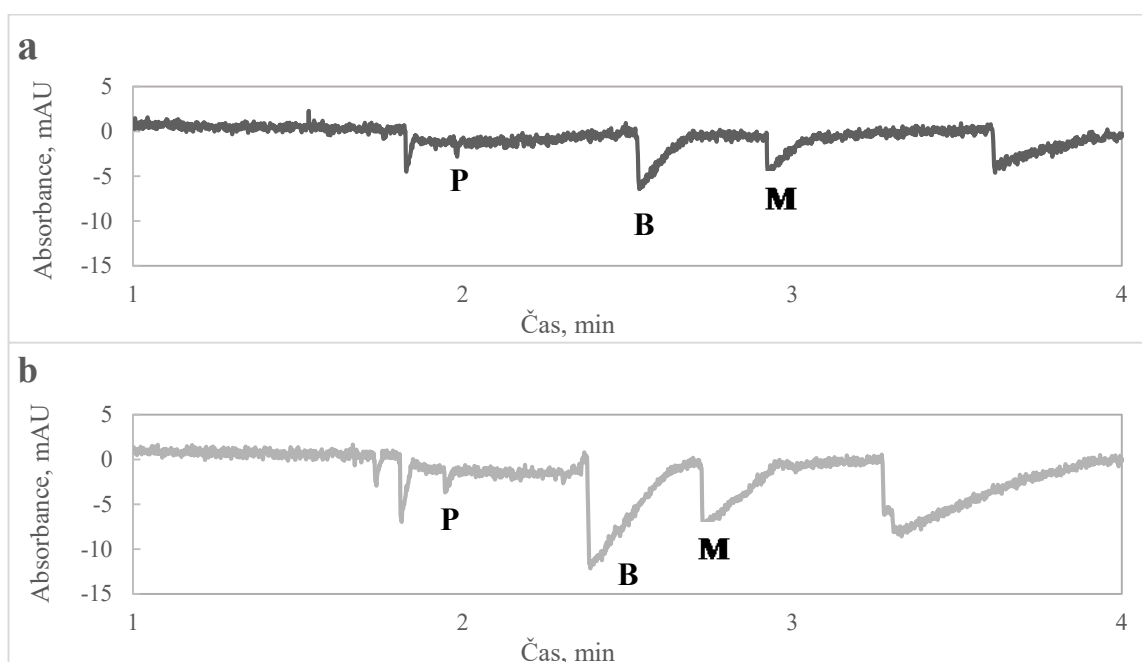
Signál vzorku byl konstantně zatížen velkým píkem v oblasti fosfátů, jak je vidět z obrázku, a tím bylo znemožněno stanovení tohoto analytu. Lze říci, že tato modelová matrice měla na analýzu jiný vliv než matrice skutečná a nebylo proto možné její vliv eliminovat vytvořením kalibrační závislosti připravené ve směsi vody a EG v poměru 1:1.

### 5.5.2 Dávkování

Doposud se veškerá měření prováděla za nezměněných podmínek hydrodynamického dávkování 5 kPa po dobu 3 sekund. Nicméně požadované citlivosti pro reálný vzorek dosaženo nebylo. Stanovení fosfátů často nebylo možné uskutečnit, jelikož odstup jejich signálu od šumu byl velmi malý. Tento problém nebylo možné odstranit menším ředěním

vzorku, protože to negativně ovlivňovalo stanovení borátů (pík tohoto analytu byl příliš velký a rozmytý, viz 5.3.1). Proto bylo nutné vyzkoušet další způsoby dávkování. Pracovalo se jak s časem hydrodynamického dávkování, jehož zvýšení by mělo vést k nárůstu výšky píků analytů, tak i s elektrokinetickým dávkováním o různém čase a napětí. Experimentální provedení je popsáno v kapitole 4.8.2.

**Hydrodynamické dávkování** tlakem 5 kPa bylo prováděno na reálném vzorku chladicí kapaliny po dobu 3, 6 a 10 sekund, výsledné elektroferogramy extrémů tohoto intervalu jsou porovnány na *Obrázku 15*.

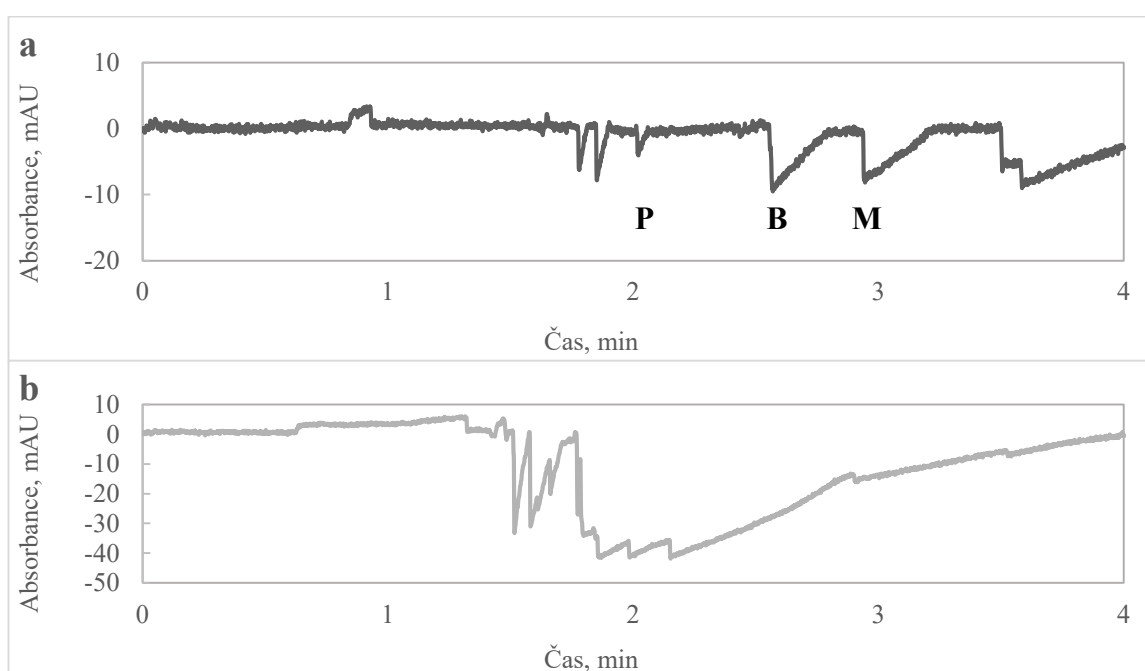


**Obrázek 15.** Elektroferogramy vzorku při různých dobách hydrodynamického dávkování. Na elektroferogramu **a** je znázorněna dávkovací doba 3 sekundy, elektroferogramu **b** 10 sekund. Tlak dávkování byl 5 kPa. Písmenem **P** je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , **B** borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ , **M** je označen MES. Absorpční spektrometrická detekce při vlnové délce záření 254 nm.

Se zvýšením doby dávkování se očekávaně zvětšila výška píků, je to nejvíce vidět na borátech a vnitřním standardu, nicméně pro fosfáty příliš značný rozdíl nebyl, jelikož hodnota šumu v tomto stanovení byla vysoká, a také kvůli poněkud velkému počátečnímu rozdílu v koncentracích analytů ve vzorku. Zápornou stranou rostoucí dávkovací doby bylo

posouvání píků k menším retenčním časům, což v případě borátů a fosfátů vedlo ke snížení rozlišení, a v případě vyšších koncentrací mohlo vést k jejich překryvání, což ohrožovalo použitelnost celé metody.

**Elektrokinetické dávkování** bylo vyzkoušeno jako alternativa hydrodynamického, ačkoliv měla svoje limitace (podrobněji je to rozvedeno v kapitole 2.3.4). Testováno bylo 6 variant tohoto dávkování: pro napětí -30, -15 a -5 kV po dobu 10 nebo 20 sekund každé. Výsledky vykazovaly jasný trend. Oba extrémní případy, tj. dávkování napětím -5 kV po dobu 10 s a -30 kV po dobu 20 s jsou ukázány na *Obrázku 16*.



**Obrázek 16. Elektroferogramy vzorku při různých variantách elektrokinetického dávkování.** Na elektroferogramu **a** je zobrazeno dávkování -5 kV, 10 s, elektroferogramu **b** -30 kV, 20 s. Písmenem **P** je označován pík fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , **B** borátů  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ , **M** – MES. Absorpční spektrometrická detekce při vlnové délce záření 254 nm.

Se zmenšujícím se napětím dávkování se zlepšovaly elektroferogramy vzorku. Při -30 kV byla kapilára předávkována vzorkem a v oblasti výskytu analytů vznikla velká vlna, v níž nelze identifikovat hledané píky. Na rozdíl od toho, při dávkovacím napětí -5 kV mají píky jednoduše intergrovatelný tvar a v případě fosfátů jsou dobře odlišitelné od šumu. Stejný trend platí i pro elektroferogramy v rámci jedné úrovně napětí ale o

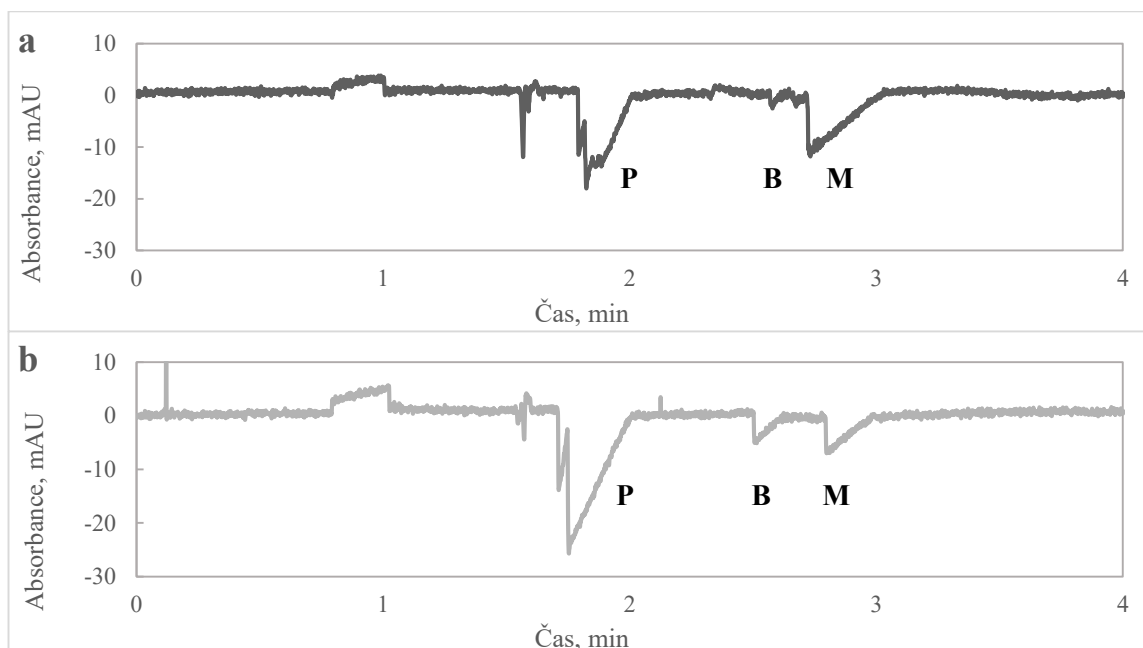
různých dobách. Zkracování doby dávkování přispívalo k lepší čitelnosti elektroferogramů. Neposlední roli hraje i stabilita proudu, která pro vyšší napětí často selhávala.

Tím pádem, při porovnání všech způsobů dávkování, bylo rozhodnuto pracovat dále s elektrokinetickým dávkováním -5 kV, 10 sekund, jelikož jím poskytované výsledky byly nejvhodnější.

## 5.6 Druhé testování

Druhé testování v první fázi probíhalo obdobně prvnímu (kapitola 5.4): pomocí sady standardních modelových roztoků byla sestavena kalibrační závislost, porovnáním rozdílů koncentrací ověřena její funkčnost. Od prvního testu se druhý lišil pouze způsobem dávkování, jehož optimalizace byla provedena z důvodu nízké citlivosti a proces byl popsán v kapitole 5.5.2.

Sestavení kalibrační závislosti se v tomto kroku nepodařilo: v oblasti fosfátů se konstantně objevoval velký pík, který zabraňoval jejich kvantifikaci. Jednou z možných příčin je přítomnost dalších kontaminujících aniontů ve vodě, které byly elektrokinetickým dávkováním nadávkovány ve větším množství než při hydrodynamickém dávkování. Taková situace je možná vzhledem k tomu, že elektrokinetické dávkování je diskriminační a přednostně dávkuje rychleji migrující analyty. Příklad výsledných elektroferogramů pro dvě různé koncentrační hladiny analytů ve vzorku, zatížených vzniklou chybou, je znázorněn na *Obrázku 17*.

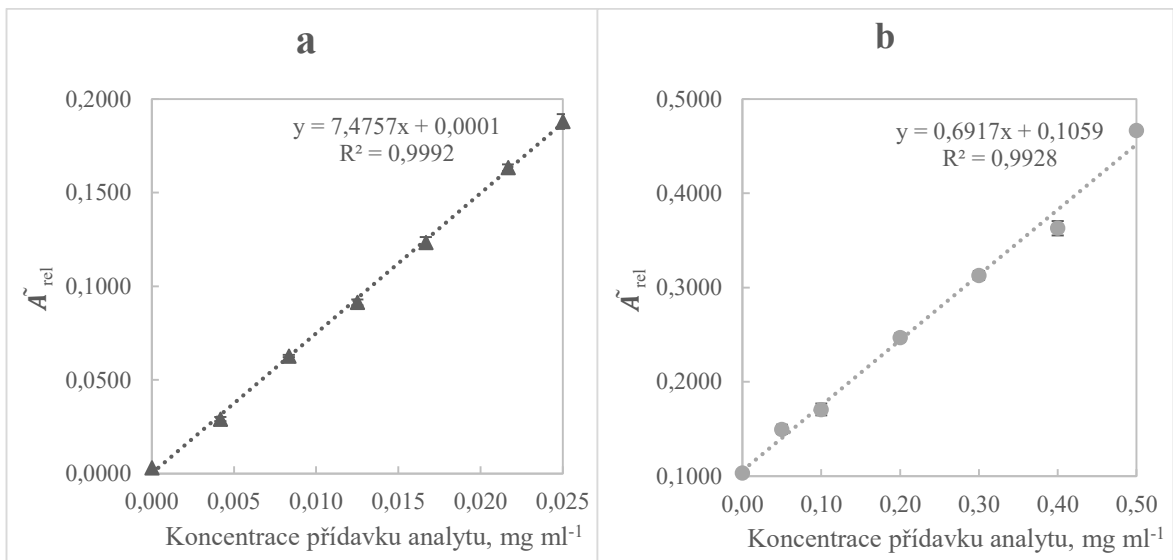


**Obrázek 17. Příklady elektroferogramů standardních vzorků.** Elektroferogram *a* patří koncentrační hladině analytů  $0,025 \text{ mg ml}^{-1}$ , elektroferogram *b* –  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ . Písmenem *P* je označována oblast očekávaného výskytu píku fosfátů ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , *B* boráty  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ , *M* je označen MES. Dávkování elektrokinetické,  $-5 \text{ kV}$ ,  $10 \text{ s}$ . Absorpční spektrometrická detekce při vlnové délce záření  $254 \text{ nm}$ .

Možnosti řešení tohoto problému byly dvě. První spočívala v přípravě kalibrační závislosti ze vzorků obsahujících místo standardních roztoků analytů jednu z chladicích kapalin se standardními přídavky, jelikož v případě optimalizace dávkování chladicí kapaliny velký pík nevznikal (viz kapitola 5.5.2). Nevýhodou této metody bylo, že chladicí kapalina použitá k přípravě takové kalibrační závislosti sama o sobě obsahovala boráty a fosfáty. Především v případě borátů tedy nebylo možné stanovovat nízké koncentrace interpolací, ale extrapolací. Druhou cestou, ačkoliv méně žádoucí, bylo odmítnutí metody kalibrační přímky a měření ostatních vzorků metodou standardního přídavku.

Kvůli nepřijatelným výsledkům kalibrace v čisté vodě, byla stejně jako při práci s hydrodynamickým dávkováním vzorku ve druhé fázi tohoto testování připravena sada reálných vzorků. Kromě toho se měření přesunulo na citlivější modernější přístroj (Agilent CE 7100), což očekávaně vedlo k výraznému snížení šumu základní linie, většímu odstupu signálu od šumu a změně ředění vzorků na větší (50násobné). V tomto případě byly získány vyhovující elektroferogramy a z dat bylo možné zkonstruovat grafy kalibrační závislosti,

kteřé jsou na *Obrázku 18*. Jejich linearita byla prokázána pomoci koeficientu  $R^2 > 0,99$  pro oba analyty.



**Obrázek 18.** Grafy kalibrační závislosti středních relativních ploch pík analytu na koncentraci analytu ve vzorku. Graf *a* patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , graf *b* borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Přerušovanou čárou jsou označeny spojnice trendů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než 0,2.

Stejně jak při prvním testování byly z rovnic kalibračních přímek spočítány koncentrace vzorků a rozdíly koncentrací, které pak za účelem kontroly byly porovnány s koncentracemi přídatků standardů (*Tabulka 4*).

**Tabulka 4.** Porovnání rozdílů koncentrací mezi vzorky s a bez přídavků standardů s koncentracemi těchto přídavků (test 2).

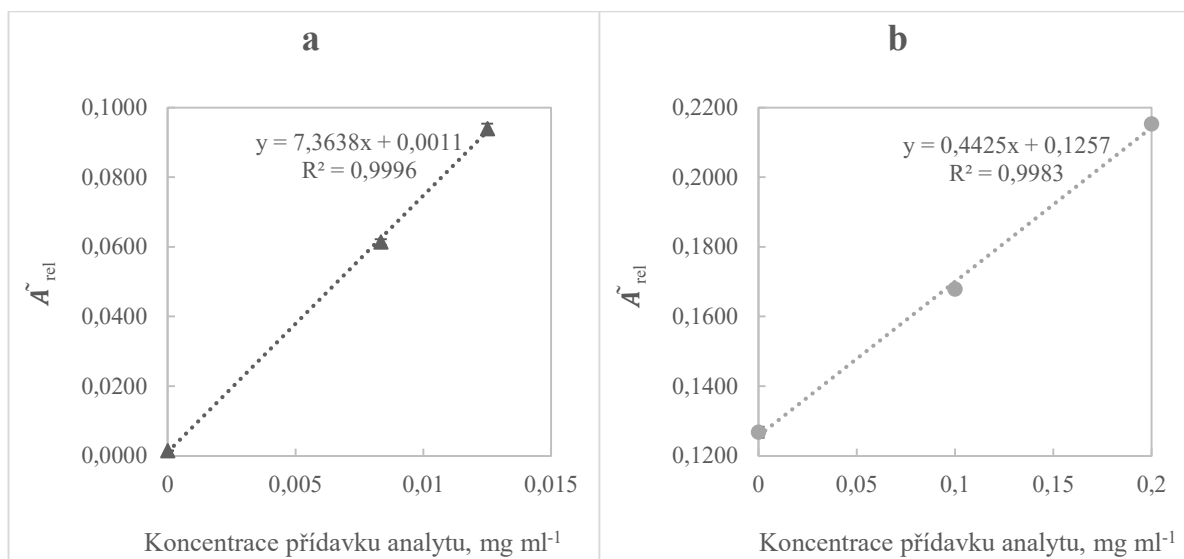
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>			<b>[B(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup></b>		
$\Delta\check{c}, \text{mg ml}^{-1}$	$c_{\text{přid}}, \text{mg ml}^{-1}$	$R_e, \%$	$\Delta\check{c}, \text{mg ml}^{-1}$	$c_{\text{přid}}, \text{mg ml}^{-1}$	$R_e, \%$
0,0039	0,0042	92,9	0,06	0,05	120
0,0084	0,0083	101,2	0,09	0,10	90
0,0122	0,0125	97,6	0,20	0,20	100
0,0165	0,0167	98,8	0,30	0,30	100
0,0218	0,0217	100,5	0,37	0,40	93
0,0251	0,0250	100,4	0,52	0,50	104

kde:  $R_e$  je procento stanovené látky ze skutečného množství neboli výtěžnost

Kontrola proběhla úspěšně. Z tabulky vyplývá, že pro všechny vzorky hodnoty  $\Delta\check{c}$  nabývají 92-110 % hodnoty  $c_{\text{přid}}$ , což je na přijatelné úrovni vzhledem k požadavkům kladeným na metodu. Největší odchylka se pozorovala pro první body obou analytů, tj. pro body s nulovou koncentrací přídavku standardu.

Následně bylo nutné ověřit platnost kalibrační závislosti získané s maticí jednoho vzorku chladicí kapaliny na jiném, nezávislém vzorku. Takovým vzorkem byla chladicí kapalina č.002. Kontrola spočívala v porovnání výsledků, obdržených výpočtem z kalibrační přímky s *nezávislým výpočtem obsahu analytů* metodou standardního přídavku.

K zjištění obsahu metodou standardního přídavku byla proměřena sada 3 vzorků, připravených podle posledního odstavce kapitoly 4.9, z vypočtených středních relativních ploch pík analytů byly sestaveny lineární závislosti těchto hodnot na koncentraci přídavku (*Obrázek 19*). Již v tomto kroku bylo jasné, že výsledky souhlasit nebudou, jelikož obdržené směrnice rovnic přímek se od koeficientů pro kalibrační přímku lišily.



**Obrázek 19.** Grafy závislosti středních relativních ploch píků analytu na koncentraci analytu ve vzorku (standardní přidavek). Graf a patří fosfátům ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ , graf b borátům  $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ . Přerušovanou čarou jsou označeny spojnice trendů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ) a jsou zobrazeny pouze, když její hodnota je větší než 0,2.

Z rovnic byly spočítány koncentrace vzorků, které pak byly porovnány s koncentracemi vypočtenými pomocí kalibrační přímky (Tabulka 5).

**Tabulka 5.** Porovnání výsledků obdržných různými metodami.

Metoda	$\text{HPO}_4^{2-}$			$[\text{B}(\text{OH})_4]^-$		
	$k$	$b$	$\check{c}, \text{mg ml}^{-1}$	$k$	$b$	$\check{c}, \text{mg ml}^{-1}$
Kalibrační přímka	7,4757	0,0001	$1,83 \cdot 10^{-4}$	0,6917	0,1059	$3,02 \cdot 10^{-2}$
Standardní přídavek	7,3638	0,0011	$1,50 \cdot 10^{-4}$	0,4425	0,1257	$2,84 \cdot 10^{-1}$

Výsledky obou výpočtů nesouhlasí. Výpočet přes kalibrační přímku falešně zvyšuje obsah fosfátů ve vzorku chladicí kapaliny, pro boráty naopak falešně snižuje. Z výsledků provedených experimentů je zřejmé, že závislost relativní plochy píku na koncentraci je pro chladicí kapalinu lineární a je tak možné provádět stanovení metodou standardního přidavku. Z nepřesnosti výsledků získaných s použitím kalibrační závislosti naopak

vyplývá, že matrice jednotlivých chladicích směsí se mezi sebou liší natolik, že nelze kalibrační závislost naměřenou v jedné matrici použít na vzorky s matricí jiné chladicí směsi. Z toho plyne, že kalibrační přímku používat pro metodu nelze, je nutno dále pokračovat cestou standardního přídávku, což bylo uděláno pro zbylé vzorky chladicích kapalin.

## **5.7 Aplikace metody na vzorky**

Po všech optimalizacích a zkouškách byla vyvinutá metoda aplikovaná na vzorky chladicích kapalin. Vzorky byly proměřeny v kapiláře o délce 50 cm v BGE obsahujícím 1 mM CTAB a 10 mM chroman sodný, dávkovalo se elektrokineticky napětím -5 kV po dobu 10 sekund, spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Ze získaných elektroferogramů byly odečteny plochy píků fosfátů, borátů a MES, spočítány střední relativní plochy a do grafů byly vyneseny závislosti na koncentraci přídávku standardu analytu, byla ověřena linearita závislostí ( $R^2 > 0,99$ ). Z rovnic přímek byly vypočteny koncentrace v naředěných a původních vzorcích každé z 6 chladicích kapalin. Výsledné hodnoty včetně statistiky jsou uvedeny v *Tabulce 6*.

Tabulka 6. Vypočtené koncentrace analytů ve vzorcích.

HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>							
Vzorek	<i>c<sub>ř</sub></i> mg ml <sup>-1</sup>	<i>L</i> <sub>12_ř</sub> mg ml <sup>-1</sup>	<i>s<sub>r</sub></i> %	<i>LOD</i> , mg ml <sup>-1</sup>	<i>LOQ</i> , mg ml <sup>-1</sup>	<i>c<sub>p</sub></i> mg ml <sup>-1</sup>	<i>L</i> <sub>12_</sub> <i>p</i> mg ml <sup>-1</sup>
VZ001		<LOQ					
VZ002		<LOQ					
VZ003	1,01 10 <sup>-2</sup>	1,62 10 <sup>-3</sup>	7,3	1,30 10 <sup>-4</sup>	4,34 10 <sup>-4</sup>	5,06 10 <sup>-1</sup>	8,08 10 <sup>-2</sup>
VZ004	Nebyl nalezen						
VZ005	5,54 10 <sup>-4</sup>	6,51 10 <sup>-5</sup>	5,3			2,77 10 <sup>-2</sup>	3,25 10 <sup>-3</sup>
VZ006		<LOQ					
[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>							
Vzorek	<i>c<sub>ř</sub></i> mg ml <sup>-1</sup>	<i>L</i> <sub>12_ř</sub> mg ml <sup>-1</sup>	<i>s<sub>r</sub></i> %	<i>LOD</i> , mg ml <sup>-1</sup>	<i>LOQ</i> , mg ml <sup>-1</sup>	<i>c<sub>p</sub></i> mg ml <sup>-1</sup>	<i>L</i> <sub>12_</sub> <i>p</i> mg ml <sup>-1</sup>
VZ001	0,139	0,027	8,7			6,939	1,326
VZ002	0,281	0,028	4,5			14,041	1,400
VZ003	1,078	0,146	6,2	0,009	0,030	53,877	7,319
VZ004	0,328	0,058	8,0			16,396	2,876
VZ005	0,124	0,013	4,8			6,182	0,653
VZ006	0,228	0,019	3,9			11,384	0,968

kde: *c* je koncentrace analytu, *L*<sub>12</sub> – 95% interval spolehlivosti, *s<sub>r</sub>* – relativní směrodatná odchylka, *LOD* – meze detekce, *LOQ* – meze stanovitelnosti; indexem *ř* jsou označovány hodnoty pro ředěný vzorek, *p* – původní chladicí kapalinu.

Spočítané množství fosfátů ve vzorcích bylo blízko meze detekce a pro některé vzorky pod mezí stanovitelnosti, proto jejich kvantifikace se v tabulce neuvádí; směrodatné odchylky se pohybovaly pod 10 % a výpočty tak jsou dostatečně přesné. Je to dáno především malým zastoupením analytu, ale také příliš velkým zvoleným finálním ředěním pro některé chladicí kapaliny, což vede k nižší přesnosti odečtu plochy, resp. výšky píku při integraci. Pro přesnější stanovení lze pak snížit ředění na 30tinásobné, což bude kompromisním řešením s ohledem na vysoký (řádově ~10<sup>3</sup>) rozdíl koncentrací fosfátů s boráty.

Pro boráty, jejichž obsah byl dostatečný pro stabilitu integrace ploch, resp. snadné

vyhodnocování koncentrací a mezí detekce a stanovitelnosti, výsledky jsou adekvátní. Vypočtené koncentrace jsou přesné ( $s_r < 10\%$ ) a vždy vyšší než LOQ.

Kromě toho, mezi hodnotami LOD a LOQ obou analytů je velký rozdíl. Důvodem pro výrazně větší citlivost metody pro fosfáty slouží menší rozmytí jejich píku a také větší mobilita aniontů, takže při elektrokinetickém dávkování jsou dávkovány preferenčně. Výrazně větší citlivosti odpovídají i výrazně větší směrnice závislosti pro fosfáty ve srovnání s boráty na Obr. 18 a 19.

## 5.8 Zkouška opakovatelnosti

Opakovatelnost se ověřovala na vzorcích jedné chladicí kapaliny č.003 o dvou koncentračních hladinách standardního přídavku analytu (vzorky SP1 a SP2; připraveno podle posledního odstavce kapitoly 4.9). Z vyhodnocení dat elektroferogramů deseti po sobě jdoucích měření pro každý vzorek byla spočítána opakovatelnost ve tvaru relativní směrodatné odchylky relativních a absolutních ploch, a také migračních časů (*Tabulka 7*).

**Tabulka 7.** Opakovatelnost relativní plochy, absolutní plochy a migračního času pro dvě koncentrační hladiny jednoho vzorku chladicí kapaliny.

<i>Vzorek</i>	<i>c<sub>příd</sub>, mg ml<sup>-1</sup></i>	<i>Analyt</i>	<i>s<sub>r</sub> (A<sub>rel</sub>), %</i>	<i>s<sub>r</sub> (A), %</i>	<i>s<sub>r</sub> (t<sub>mig</sub>), %</i>
<b>SP1</b>	0,0083	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	8,5	11,3	2,6
	0,10	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	6,7	12,6	4,2
<b>SP2</b>	0,0125	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6,4	4,8	3,7
	0,20	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	4,0	1,9	1,8

kde:  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka.

Z tabulky je patrné, že opakovatelnost migračních časů je velmi dobrá (směrodatná odchylka  $s_r$  je pod 5 %), a tak pravděpodobnost nesprávné identifikace signálů analytů v zaznamenaných elektroferogramech je nízká.

Opakovatelnost relativních ploch je dostatečně vysoká, relativní směrodatná odchylka pro ně nepřesahuje 10 % a zároveň má nízký rozptyl jak mezi analyty, tak i mezi koncentračními hladinami. Pro absolutní plochy píků opakovatelnost kolísá výrazněji. Je

to dáno náhodným kolísáním hodnot integrovaných ze záznamů blíž k začátku nebo konci měřené sekvence, kdy plocha mohla vzrůst vůči předchozím hodnotám až o 30 %. Navíc pro analyty existuje trend menší relativní směrodatné odchylky pro hojněji zastoupené boráty, ale u absolutních ploch vzorku SP1 je tento trend porušen odchýlenou hodnotou. Použití vnitřního standardu vyrovnává náhodné výkyvy absolutních ploch, stabilizuje hodnoty odchylek a tím pádem výpočet z relativních ploch je oprávněn a je nezbytný pro dosažení správnějších výsledků. Pro oboje plochy platí také tendence zvýšení opakovatelnosti s rostoucí koncentrací analytu ve vzorku.

## 6 Závěr

Byla vyvinuta elektroforetická metoda pro stanovení fosfátů a borátů v chladicích kapalinách vhodná pro kontrolu kvality recyklace a práce elektrodialyzační linky.

Metoda zahrnuje následující parametry a podmínky: křemenná kapilára o celkové délce 50,0 cm a efektivní 41,5 cm, separační napětí -20 kV, absorpční spektrofotometrickou nepřímou detekci při 254 nm, elektrokinetické dávkování napětím -5 kV po dobu 10 s. Základní elektrolyt obsahoval chroman sodný o koncentraci 10 mmol l<sup>-1</sup> a CTAB o koncentraci 1 mmol l<sup>-1</sup>, hodnota jeho pH činila 11,5. Vzorky chladicích kapalin byly zředěny 20 až 50× v závislosti na citlivosti přístroje (starší přístroj poskytoval větší šum základní linie ve kterém se ztrácel malý pík fosfátů, a proto bylo nutné používat menší ředění vzorku), a také obsahovaly přídavky vnitřního standardu MES. Vyhodnocení obsahu probíhalo metodou standardního přídavku. Opakovatelnost vyjádřená v relativní směrodatné odchylce byla pro migrační časy analytů velmi vysoká (pod 5 %), vysoká pro relativní plochy píků (pod 10 %) a poněkud horší pro absolutní plochy píků (pod 15 %).

Metoda vyhovuje na ni kladeným požadavkům a cíli práce, má nízké meze detekce a stanovitelnosti a vysokou opakovatelnost. Nevýhodou je však nemožnost používání kalibrační přímky.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] “Overview | OICA”, [Online]. Available: <http://www.oica.net/production-statistics> [Přístup získán 15.10.2020].
- [2] J. A. Lima, G. R. Otterman, *Manual on Selection and Use of Engine Coolants and Cooling System Chemicals*, ASTM, Philadelphia, PA, **1989**.
- [3] B. A. Stefl, K. F. George, *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol. (Ed.: John Wiley & Sons, Inc.)*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, **2000**.
- [4] W. H. Bradley, *SAE Technical Paper 921634*, **1992**.
- [5] R. G. Hunt, W. E. Franklin, C. C. Hildebrandt, G. H. Buchanan, *SAE Technical Paper 961027*, **1996**.
- [6] S. A. Schwartz, *SAE Technical Paper 960638*, **1996**.
- [7] W. H. Bradley, *Engine Cool. Test. Fourth Vol.* ASTM International, West Conshohocken, PA, **1999**, 292-315.
- [8] J. R. Huff, *J. of commercial vehicles, SAE Transactions*, SAE International, **1992**, 101, 340–346.
- [9] J. Fink, *Pet. Eng. Guide Oil Field Chem. Fluids*, Elsevier, **2015**, 445–453.
- [10] S. F. Bosen, W. A. Bowles, E. A. Ford, B. D. Perlson, *Ullmanns Encycl. Ind. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2000**
- [11] R. D. Hudgens, *J. of engines, SAE Transactions*. SAE International, **1999**, 108, 82–91.
- [12] ASTM D3306-20, *Specification for Glycol Base Engine Coolant for Automobile and Light-Duty Service*, ASTM International, West Conshohocken, PA, **2020**.
- [13] “Coolant Experts”, [Online]. Available: [http://www.coolantexperts.com/coolant\\_overview/traditional\\_coolant](http://www.coolantexperts.com/coolant_overview/traditional_coolant), [Přístup získán 19.10.2020].
- [14] M. Finšgar, I. Milošev, *Corros. Sci.* **2010**, 52, 2737–2749.
- [15] Coolants, [Online]. Available: <http://www.ausoil.net>, [Přístup získán 18.10.2020].
- [16] J. Fink, *Pet. Eng. Guide Oil Field Chem. Fluids*, Elsevier, **2015**, 215–254.
- [17] T. W. Weir, P. V. de Ven, *SAE Technical Paper 960641*, **1996**.
- [18] “Coolant Overview”, [Online]. Available: [http://www.reco-cool.com/coolant\\_overview/coolant\\_composition](http://www.reco-cool.com/coolant_overview/coolant_composition) [Přístup získán 18.10.2020]

- [19] P. Roberge, *Handbook of Corrosion Engineering*, McGraw-Hill Professional, New York, **1999**.
- [20] M. G. Fontana, *Corrosion Engineering*, McGraw-Hill, New York, NY, **1978**.
- [21] K. Sayin, D. Karakaş, *Corros. Sci.* **2013**, *77*, 37–45.
- [22] H. Kaesche, *Corrosion of Metals: Physicochemical Principles and Current Problems*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2003**.
- [23] R. D. Hudgens, W. G. Bugelski, *J. of commercial vehicles*, *SAE Transactions*, SAE International, **1990**, *99*, 136–156.
- [24] “Engine Coolant”, [Online]. Available: <https://www.valvoline.com/our-products/antifreeze-products/antifreeze-education/engine-coolant>, [Přístup získán 18.10.2020].
- [25] “VW TL 774-15: Ethylene Glycol-Based Coolant Additive”, [Online]. Available: <https://oil-club.ru>, [Přístup získán 19.10.2020].
- [26] C. Sarzanini, *J. Chromatogr. A* **2002**, *956*, 3–13.
- [27] M. Carlson, R. D. Thompson, *Food Addit. Contam.*, **1998**, *15*, 898–905.
- [28] Z. Hongguo, *Thermo Scientific Application Note 1119*, Sunnyvale, CA, **2019**.
- [29] A. Tapparo, G. Giorgio Bombi, *The Analyst* **1998**, *123*, 1771–1773.
- [30] P. M. Woyciesjes, S. M. Woodward, A. V. Gershun, *J. of commercial vehicles*, *SAE Transactions*, SAE International, **1993**, *102*, 23–36.
- [31] S. Jeyakumar, V. V. Raut, K. L. Ramakumar, *Talanta*, **2008**, *76*, 1246–1251.
- [32] D. Kaniansky, M. Masár, J. Marák, R. Bodor, *J. Chromatogr. A*, **1999**, *834*, 133–178.
- [33] M. Jimidar, C. Hartmann, N. Cousement, D. L. Massart, *J. Chromatogr. A*, **1995**, *706*, 479–492.
- [34] M. C. Breadmore, P. R. Haddad, *ELECTROPHORESIS*, **2001**, *22*, 2464–2489.
- [35] M. C. Barciela Alonso, R. Prego, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *416*, 21–27.
- [36] D. P. Anderson, M. Lukas, B. K. Lynch, *Diesel Engine Coolant Analysis, New Application for Established Instrumentation.*, Spectro Inc, Littleton, MA, **1998**.
- [37] N. M. Potter, R. R. Lovelace, *Anal. Chim. Acta*, **1984**, *162*, 419–422.
- [38] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, F. P. Smith, *Forensic Sci. Int.*, **1998**, *92*, 75–88.
- [39] C. K. Lim, *J. Appl. Toxicol.*, **1993**, *13*, 305–305.
- [40] S. Fanali, *ELECTROPHORESIS*, **1997**, *18*, 2116–2117.

- [41] D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, New York, NY, **1995**.
- [42] G. de Jong, *Capill. Electrophor. Spectrom. CE-MS*, John Wiley & Sons, Ltd, **2016**, 1–5.
- [43] S. A. Shamsi, in *Encycl. Anal. Chem. (Ed.: R.A. Meyers)*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2006**.
- [44] A. Weston, *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices*, Academic Press, **2011**.
- [45] J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, Harlow, **2010**.
- [46] S. Goncalves, V. R. Alves, S. O. Perez, *Food Chem.*, **2020**, 321, 126705.
- [47] M. Navarro-Pascual-Ahuir, M. Jesus Lerma-Garcia, E. F. Simo-Alfonso, J. Manuel Herrero-Martinez, *Food Anal. Methods*. **2017**, 10, 3991–4002.
- [48] K. Yoshikawa, M. Shimizu, T. Matsumura, A. Sakuragawa, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2018**, 98, 789–798.
- [49] “Peakmaster”, [Online]. Available: <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>  
[Přístup získán 22.02.2021]