UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Chemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Eliška Petržilková

Analýza tetrachlorozlatitanu draselného vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Analysis of potassium tetrachloroaurate by high performance liquid chromatography

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto závěrečnou práci jsem 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.

V Praze dne

…….

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce, paní RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a chápavý přístup během celé doby mého studia.

Abstrakt

V teoretické části je popsána metoda HPLC a její komponenty. Dále jsou uvedeny základní informace o analytu, konkrétně o chování zlata a jeho reaktivitě.

V experimentální části je popsán postup optimalizace složení mobilní fáze v systému HILIC na dvou stacionárních fázích, konkrétně na kolonách Luna NH_2 (5 μm, 100 Å, 2 x 250 mm) a XBridge Amide (3,5 μm, 2,1 x 150 mm).

Nejlepší chromatogramy byly zaznamenány na koloně Luna NH_2 v mobilní fázi o složení 94 % ACN a 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl a jejího průtoku 0,4 ml·min^{-1}. Pro kolonu XBridge Amide byly nejvhodnější podmínky měření při složení mobilní fáze 94 % ACN a 6 % 10,0 mmol·dm^{-3} HCl a jejího průtoku 0,7 ml·min^{-1}. Následně byla za těchto podmínek ověřena opakovatelnost měření, která byla vyhodnocena z 10 opakovaných dávkování roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci 1,0 mmol·dm^{-3} ve 100% ACN. Opakovatelnost neposkytovala stejné výsledky, a proto byla hledána příčina. Ověření funkčnosti dávkovače a detektoru při odpojené koloně vyšla v pořádku. Po opakovaném připojení kolony bylo zjištěno, že příčina je právě zde, z důvodu použití mobilní fáze obsahující HCl a dále již nebylo možné s kolonou pracovat. Nebylo tedy možné změřit kalibrační roztoky a určit mez detekce a mez stanovitelnosti pro zvolené experimentální podmínky.

Klíčová slova

Tetrachlorozlatitan draselný, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HILIC

Abstract

The theoretical part describes the HPLC method and its components. The following are basic information about the analyte, specifically about the behavior of gold and its reactivity.

The experimental part describes the procedure of optimizing the composition of the mobile phase in the HILIC system on two stationary phases, namely on Luna NH_2 columns (5 μm, 100 Å, 2 x 250 mm) and XBridge Amide (3.5 μm, 2.1 x 150 mm).

The best chromatograms were recorded on a Luna NH_2 column in a mobile phase composed of 94% ACN and 6% 5.0 mmol·dm^{-3} HCl and its flow rate 0.4 ml·min^{-1}. For the XBridge Amide column, the most suitable measurement conditions were a mobile phase composition of 94% ACN and 6% 10.0 mmol·dm^{-3} HCl and a flow rate of 0.7 ml·min^{-1}. Subsequently, the repeatability of the measurements was verified under these conditions, which was evaluated from 10 repeated injections of a tetrachloroaurate solution of a concentration of 1.0 mmol·dm^{-3} in 100% ACN. Repeatability did not give satisfactory results, so the reason was looked for. Verification of the functionality of the injector and detector with the column disconnected was successful. After reconnecting the column, it was found that the cause was right here, due to the use of a mobile phase containing HCl and it was no longer possible to work with the column. Therefore, it was not possible to measure the calibration solutions and determine the limit of detection and the limit of determination for the selected experimental conditions.

Keywords

Potassium tetrachloroaurate, high performance liquid chromatography, HILIC

Obsah

Seznam zkratek a symbolů 7
Cíl práce 9
1 Teoretická část 10
1.1 Základní informace 10
1.2 Historie až současnost 10
1.3 Instrumentace 13
1.4 Výběr stacionární a mobilní fáze 16
1.5 Vyhodnocování dat 18
1.6 Zlato 22
1.6.1 Základní informace 22
1.6.2 Stanovení zlata 23
1.6.3 Využití zlata 24
2 Experimentální část 25
2.1 Použité chemikálie 25
2.2 Použité přístroje a pomůcky 25
2.3 Přípravy mobilní fáze a zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného 25
2.4 Podmínky analýzy 26
2.5. Výpočty 26
3 Výsledky a diskuse 27
3.1 Aminová kolona Luna NH_2 29
3.2 Amidová kolona XBridge Amide 33
Závěr 39
Zdroje 40
Seznamy obrázků a tabulek 42

Seznam zkratek a symbolů

AAS – atomová absorpční spektrometrie (atomic absorption spectrometry)

ACN – acetonitril

CE-ICP-MS – kapilární elektroforéza s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry)

C8 – oktylový uhlíkatý řetězec

C18 – oktadecylový uhlíkatý řetězec

C30 – triakontylový uhlíkatý řetězec

F_M – objemový průtok (flow rate)

GC – plynová chromatografie (gas chromatography)

H – výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to a theoretical plate)

HCl – kyselina chlorovodíková

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (inductively coupled plasma mass spectrometry)

k – retenční faktor (retention factor)

$K_{D,1}$ – distribuční konstanta

L – délka separační kolony (length of the column)

LC-ICP-MS – kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry)

LOD – mez detekce (limit of detection)

M_r – relativní molekulová hmotnost

MeOH – methanol

n – počet teoretických pater (number of theoretical plates)

NPHPLC – chromatografie s normálními fázemi (normal-phase high-performance liquid chromatography)

$R_{1,2}$ – rozlišení dvou látek

$r_{1,2}$ – relativní retence

RPHPLC – chromatografie s obrácenými fázemi (reversed-phase high-performance liquid chromatography)

t_R – elační čas (retention time)

$t_R^{'}$ – redukovaný čas

THF – tetrahydrofuran

UHPLC – ultra-účinná kapalinová chromatografie (ultra-high-performance liquid chromatography)

UV – ultrafialové (ultraviolet)

V_R – elační objem (retention volume)

$V_R^{'}$ – redukovaný objem

$w_{\frac{1}{2}j}$ – poloviční šířka píku (peak width at half height)

w_j – šířka píku (peak width)

Cíl práce

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace experimentálních podmínek pro analýzu tetrachlorozlatitanu draselného hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou detekcí.

1 Teoretická část

1.1 Základní informace

Chromatografie je separační proces, při němž se látky dělí mezi 2 vzájemně nemísitelné fáze, první je mobilní fáze (pohyblivá) a druhá je stacionární fáze (nepohyblivá). Látky se dělí na základě interakcí mezi vzorkem, mobilní a stacionární fází, jako je například adsorpce, rozpouštění, iontová výměna a jiné. Vzorek je unášen mobilní fází přes stacionární fázi, která se složkami vzorku interaguje a v závislosti na tom jsou jednotlivé složky vzorku více či méně zpomalovány. Vzorek je poté rozdělen na jednotlivé složky. Chromatografická separace se dělí podle účelu na 2 typy:

a. Preparativní chromatografie – izolace čistých složek ze směsí
b. Analytická chromatografie – dělení látek proto, aby mohly být analyticky stanoveny

V obou typech separace je důležité dosáhnout co nejlepšího rozdělení. U preparativní chromatografie je žádoucí mít co největší výtěžek čistých látek a u analytické chromatografie je důležité, aby analytické parametry jako je citlivost, správnost a reprodukovatelnost byly co nejlepší. [1]

1.2 Historie až současnost

Dnešní podoba vysokoúčinné kapalinové chromatografické (HPLC) metody má historii u kolonové kapalinové chromatografie. Tato metoda má dlouhou historii a ve svém klasickém sloupcovém provedení byla používána až do poloviny 60. let 20. století. Mobilní fáze se pohybovala pouze gravitací, v té době ještě bez použití tlaku, a průtoky byly v řádech mililitrů za minutu. Separace nebyly dostatečně účinné a analýzy trvaly dlouho. Klasická sloupcová kapalinová chromatografie se ale stále používá pro separaci jednoduchých směsí. Pokud bychom chtěli separovat složitější směsi, tak k tomu už klasická kapalinová chromatografie nestačí a k těmto účelům slouží dnes již velmi dominující vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Při vývoji HPLC byly využity poznatky z plynové chromatografie (GC), která je vývojově starší a poskytovala vysoce účinné separace. Větší účinnost HPLC zajišťuje stacionární fáze s malými pravidelnými částicemi o stejné velikosti, kterými je kolona homogenně vyplněna. Kapalná mobilní fáze je zde poháněna vysokým tlakem pomocí čerpadla, od toho se odvíjí často používaný název vysokotlaká kapalinová chromatografie. Vzorek je dávkován v analytické HPLC v malém množství, řádově mikrolitrech. Proto je nutné použít

k detekci citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál z detektoru je poté zpracován počítačem. [2]

HPLC má velkou výhodu v široké oblasti použitelnosti: můžeme stanovovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. [2]

V HPLC je mobilní fází kapalina. Separace složek je závislá na interakci se stacionární fází, ale také na použité mobilní fázi. Jak dlouho stráví analyt v mobilní nebo ve stacionární fázi závisí na afinitě analytu ke každé z nich. [3]

Podle mechanismu separace nebo typu stacionární fáze můžeme dělit HPLC na: [4]

1. Rozdělovací chromatografii
2. Adsorpční chromatografii
3. Iontovou [iontově výměnnou] chromatografii
4. Vylučovací chromatografii
5. Afinitní chromatografii
6. Chirální chromatografii
7. Hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC)

1. Rozdělovací chromatografie – je nejvíce používaný typ ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Stacionární i mobilní fáze jsou kapaliny, které jsou vzájemně nemísitelné. Tento typ chromatografie můžeme ještě dělit na chromatografii na kapalné fázi a chromatografii na chemicky vázané fázi. Odlišnost mezi nimi je ve způsobu, jakým je stacionární fáze ukotvena na nosiči. U prvního typu je to fyzikální adsorpcí a u druhého typu je chemicky vázaná. [4] Chemicky vázané fáze, a hlavně nepolární reverzní fáze, jsou v dnešní době nejvíce používanými stacionárními fázemi ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Výhody chromatografie na chemicky vázaných fázích jsou: A. stanovení analytů se širokým rozsahem polarity, B. velká nabídka použitelných fází, C. lze používat levné mobilní fáze, D. v módu obrácených fází je jednodušší, rychlejší a reprodukovatelnější v porovnání s módem normálních fází, E. možnost použití na biologické systémy. [2]

2. Adsorpční chromatografie – zde je důležitým procesem interakce molekul s povrchem adsorbentu, tedy s pevnou stacionární fází. Tato interakce by neměla být příliš silná, aby adsorpce byla reverzibilní a molekuly neměly dlouhé retenční časy. Selektivita adsorpční kolony je daná sílou mezimolekulových interakcí dělených složek

s adsorbentem a s elučním činidlem. Tyto síly se dají ovlivnit změnou chemické povahy a koncentrací aktivních center na povrchu adsorbentu nebo složením a koncentrací mobilní fáze. Jako adsorbenty se nejčastěji používají silikagel nebo alumina. [5]

3. Iontově výměnná chromatografie – jako stacionární fáze se nejčastěji používá iontoměničová pryskyřice, kterou je naplněna kolona, a iontově výměnné skupiny této stacionární fáze jsou převedeny do formy „protiiontu“ E. Analyt obsahující ionty se stejným nábojem jako protiiont E se nadávkuje do kolony, zde proběhne výměna iontů, kdy se vzorek naváže na pryskyřici a protiiont E se uvolní pryč z iontoměničové kolony. Kolona je pak promývána roztokem obsahujícím protiiont E a ionty ze vzorku jsou posouvány dolů ve sloupci stacionární fáze v koloně. Posun je selektivní proces s ionty pohybujícími se různými rychlostmi ve sloupci, a právě tato selektivita je klíčovým faktorem úspěchu iontové výměny jako metody iontové separace. [6]

4. Vylučovací chromatografie – dělí molekuly na základě jejich velikosti. Molekuly jsou různě zpožďovány na základě pronikání do pórů stacionární fáze, která je tvořena porézním gelem. Malé molekuly pronikají hlouběji do pórů a mají vyšší retenční hodnoty než molekuly velké, které do pórů nepronikají a jsou unášeny mobilní fází rychleji ven z kolony. Vylučovací chromatografie se od jiných typů chromatografií odlišuje tím, že se zde neuplatňují chemické a fyzikální interakce mezi analyty a stacionární fází, tedy, že se neustavuje rovnováha a molekuly se dělí pouze na základě molekulově sítového efektu. [4]

5. Afinitní chromatografie – využívá biologické specifity, a tedy interakce mezi biologicky aktivní látkou (například proteinem) a ligandem. Vhodný ligand se chemicky zakotví na nerozpustný inertní nosič, kterým je plněna separační kolona. Na takto připravené stacionární fázi budou zadržovány jen takové biologicky aktivní látky, které mají dostatečně velkou afinitu k ligandu a ostatní látky kolonou projdou bez zadržení. Specificky vázanou látku lze poté z kolony uvolnit elučním rozpouštědlem, dojde k disociaci komplexu analyt – ligand, tedy k uvolnění vázané látky z vazby s ligandem. Využití afinitní chromatografie je téměř všude, kde ligand specificky interaguje s biomolekulou. [7]

6. Chirální chromatografie – se využívá pro dělení molekul chirálních látek. Molekuly chirální látky mají stejné chemické složení, ale v prostorovém uspořádání jsou si navzájem svými zrcadlovými obrazy. Takové molekuly jsou označovány jako

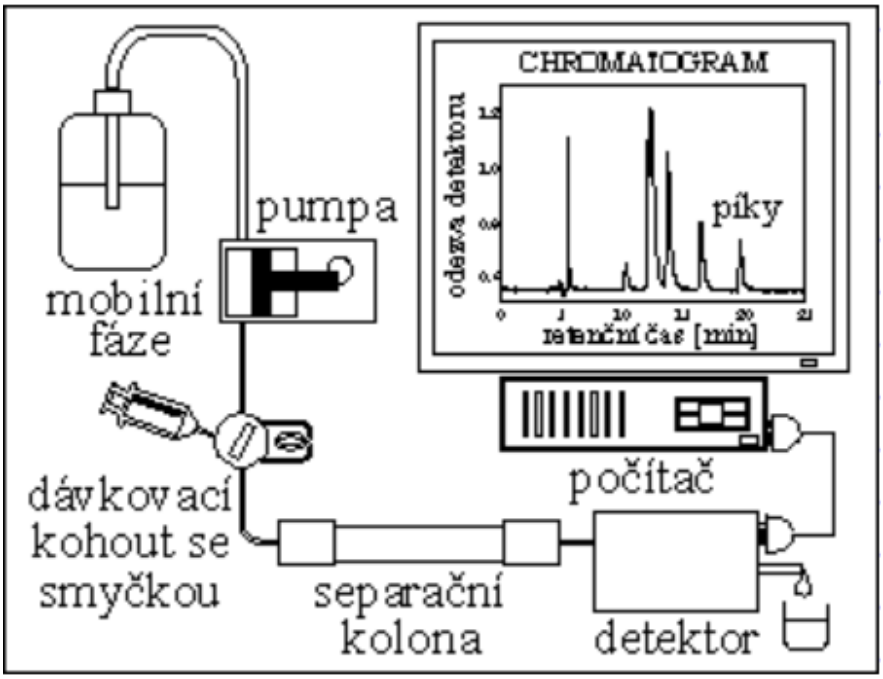
enantiomery dané chirální látky (z řeckého slova „cheiro“ označující ruku, protože jsou jako pár rukou). Chromatografickou separaci enantiomerů lze dosáhnout různými způsoby, ale vždy je nutné použít nějaký druh chirálního diskriminátoru nebo selektoru. Chirální aditivum v mobilní fázi a chirální stacionární fáze jsou 2 typy selektorů. Tyto selektory musí mít také chirální charakter, aby mohly odlišně interagovat s příslušnými enantiomery. Jeden enantiomer poté více interaguje (např. přitažlivé síly ve formě vodíkových vazeb, π-vazeb a dipólů) se selektorem než druhý a tím se od sebe dělí. Chirální HPLC je ideální pro přípravu optických izomerů ve velkém měřítku. [8]

7. HILIC – tato chromatografická technika využívá polární stacionární fázi v kombinaci s vodně-organickou mobilní fází, která obsahuje více než 50 % organického rozpouštědla ve vodě, nejčastěji acetonitrilu v rozsahu 80-98 %. Tento typ chromatografie poskytuje dostatečnou retenci silně polárním sloučeninám, kterým nabízí jinou selektivitu oproti chromatografii s obrácenými fázemi. Výhodami HILIC v porovnání s reverzní chromatografií jsou pro analýzu polárních látek méně viskózní mobilní fáze (vysoký podíl organické složky acetonitrilu), a hlavně vynikající vhodnost pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Metoda HILIC našla užitečné uplatnění u malých polárních látek jako jsou léčiva, toxiny a další, ale i u velkých biomakromolekul, například glykoproteinů. [9]

1.3 Instrumentace

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie se používají malá zrna sorbentu (okolo 3 – 10 μm), aby došlo k účinné separaci. Takto malá zrna sorbentu kladou odpor pohybující se mobilní fázi a aby bylo dosaženo dostatečně velkých průtoků, je nutné pracovat při tlaku v řádu desítek MPa. Kvůli tomu je metoda HPLC mnohem dražší a složitější než jiné typy chromatografie. [4]

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, pumpy, dávkovacího zařízení, separační kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 – Schéma kapalinového chromatografu

(Zdroj: P. Coufal. *HPLC* [online]. Praha, 1996 [cit. 2021-4-18]. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html)

Zásobníky mobilní fáze

HPLC přístroje mají 1 či více zásobníků na mobilní fázi, které jsou o objemu 0,5 – 2,5 litru. Často se u těchto zásobníků vyskytují i zařízení na odstraňování rozpuštěných plynů a prachu z kapalin, protože by mohly způsobovat nepřesnosti v měření. Odplynění mobilní fáze se provádí ve vakuu, pomocí probublávání inertním plynem (nejčastěji dusíkem) nebo ultrazvukem. Složení mobilní fáze ze zásobníku může být konstantní, pak hovoříme o izokratické eluci, nebo se může během separace měnit složení mobilní fáze a poté hovoříme o gradientové eluci. Gradientová eluce může zvyšovat účinnost separace. Směšovací zařízení (směšovací ventily) řídí složení mobilní fáze, protože jsou k němu přiváděny kapaliny ze zásobníků a následně jsou zde míšeny v poměrech na požadovanou směs a dále může tyto poměry měnit v průběhu separace. [4]

Čerpadla

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie se používají vysokotlaká čerpadla a jsou na ně kladeny vcelku náročné požadavky:

1. výstupní tlaky musí být v rozmezí 1-100 MPa pro HPLC a 100-200 MPa pro UHPLC (ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

2. změna průtoku mobilní fáze musí být možná v rozmezí 0,1-10 ml

3. průtok mobilní fáze musí být bezpulsní

4. musí být vyrobeny z odolného materiálu (nerezová ocel, titan)

5. vnitřní objem čerpadel musí být co nejmenší

Nejdůležitější vlastností každého čerpadla je zajištění stabilního průtoku mobilní fáze. Vysokotlaká čerpadla jsou dělena do 2 skupin podle toho, jestli pracují při konstantním tlaku nebo při konstantním objemovém průtoku. Obě dvě skupiny fungují na principu vytlačování mobilní fáze ze zásobníku (pístem či membránou). Stěžejní rozdíl mezi nimi je ve způsobu dosažení pohybu pístu. U první skupiny, která pracuje s konstantním tlakem je používán tlak buď plynu nebo hydraulické kapaliny na píst. U druhé skupiny, která pracuje s konstantním objemovým průtokem, se používá k posunu pístu mechanický pohon. V moderních HPLC přístrojích se používají dvě pístová čerpadla, která pracují tak, aby byl zajištěn bezpulzní a konstantní průtok mobilní fáze. [10]

Dávkovací zařízení

Nejčastějším dávkovacím zařízením u HPLC je šesticestný dávkovací ventil s dávkovací smyčkou. Dávkovací smyčky můžeme měnit podle objemu, který potřebujeme nadávkovat, zhruba od 1 do 100 µl. Dávkování je reprodukovatelné a u mnoha přístrojů je i automatizované. Tyto automatické dávkovače nastřikují vzorky z nádobek, které jsou seřazeny v autosampleru. [4]

Kolony

U HPLC se používají nejčastěji náplňové kolony. Kvůli různým požadavkům existují kolony různých délek, vnitřních průměrů, typů sorbentů a velikostí částic náplní. Pro převážnou část analýz jsou kolony vyrobeny z nerezové oceli. Kolony, které se využívají k analytickým účelům, jsou celkem krátké, okolo 10, 15 až 25 cm, s vnitřním průměrem 2 až 4,6 mm. K rychlým separacím jsou vhodné krátké kolony okolo 3 cm. Pro dosažení vysoké účinnosti se používají kolony s velmi malým vnitřním průměrem 1-2 mm a délkou 25–50 cm. Pro ochranu kolony jsou často používány tzv. předkolony. Ty jsou umístěné buď mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením nebo mezi dávkovacím zařízením a kolonou. [3]

Detektory

Na detektory u HPLC jsou kladeny následující požadavky: 1. malý vnitřní objem 2. stabilní a reprodukovatelný signál 3. lineární závislost signálu detektoru na koncentraci analytu 4. vysoká citlivost 5. nízká mez detekce 6. nízký šum signálu a signál bez driftu [2]

Detektory pro HPLC by měly být selektivní pro stanovované látky a málo citlivé pro mobilní fázi. Detektor by měl zvládnout tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejčastěji používanými detektory v HPLC jsou fotometrický, refraktometrický, fluorescenční a elektrochemický. [3]

1. Fotometrický detektor je nejpoužívanějším detektorem a pracuje v UV nebo viditelné oblasti elektromagnetického záření. Patří k selektivním detektorům, ale dají se použít u 90 % aplikací. Detektory, které pracují v celé oblasti UV spektra, musí obsahovat ještě monochromátor. [11]
2. Refraktometrický detektor je založen na měření změny mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Pokud se v eluátu nachází stanovovaná látka, zaznamená se výchylka signálu. Tento detektor je málo citlivý, ale náhradou za to je univerzální. Pozor si musíme dát na udržování konstantní teploty během měření. [3]
3. Fluorescenční detektor má omezené použití, protože je vysoce selektivní. Funguje na principu fluorescence. Látka, která obsahuje ve své molekule fluorofor, má schopnost absorbovat UV záření, tím se elektrony v molekule dostanou na vyšší energetickou hladinu a když se elektrony vrací zpět do základního energetického stavu, tak vyzáří záření, které má delší vlnovou délku než budící UV záření. Toto záření se měří fotonásobičem, který převádí signál na elektrický proud. Fluorescenční detektor můžeme i kombinovat s fotometrickým detektorem. [12]
4. Elektrochemický detektor patří mezi selektivní detektory. Měříme buď vodivost látky nebo elektrický proud, který odpovídá oxidaci nebo redukci látky. Jsou poměrně vysoce citlivé. Pracovní elektroda má různé složení podle potřeby oxidace či redukce. Pro oxidaci látky využíváme například elektrodu z ušlechtilého kovu a pro redukci látek rtuťovou elektrodu. [2]

1.4 Výběr stacionární a mobilní fáze

Nejčastěji využívaným typem/módem vysokoúčinné kapalinové chromatografie je HPLC na reverzních fázích (RPHPLC) a na normálních fázích (NPHPLC). V RPHPLC je

stacionární fáze nepolární nebo slabě polární v porovnání s použitou polární mobilní fází. Nejčastější volbou je silikagelový nebo polymerní nosič s chemicky zakotvenou fází C18. Pokud potřebujeme snížit retenci, tak použijeme stacionární fázi s kratšími uhlíkovými řetězci např. C8, naopak ke zvýšení retence použijeme jako stacionární fázi delší uhlíkový řetězec např. C30. Mobilní fáze je tedy polární. Je složená z vody a mísitelného organického rozpouštědla (modifikátoru), z důvodu snížení polarity a zvýšení eluční síly. Můžeme použít mnoho organických rozpouštědel mísitelných s vodou, ale nejčastěji používané jsou tyto tři: acetonitril (ACN), methanol (MeOH) a tetrahydrofuran (THF). Eluce látek probíhá podle klesající polarity. První eluují nejvíce hydrofilní látky (polární) a poslední nejvíce hydrofobní látky (nepolární). V NPHPLC je stacionární fáze naopak polární. Nejběžnější stacionární fází je silikagel a silikagel s chemicky navázanými skupinami (např. diol-, kyano– nebo amino-). Mobilní fáze je nepolární. Je složená z alkanu a mísitelného polárního rozpouštědla (modifikátoru), který zvyšuje eluční sílu. Stále se z velké části jako mobilní fáze používá hexan, ale je často nahrazován, z důvodu obav z jeho dlouhodobé toxicity, např. isoheptanem nebo cyklohexanem. Dále byla z těchto důvodů navržena tzv. zelená chemická rozpouštědla, která chrání životní prostředí. Nejčastěji používanými modifikátory jsou: chloroform, ethylacetát, dichlormethan a isopropanol. Separované látky zde eluují podle zvyšující se polarity. První eluují nejvíce hydrofobní látky (nepolární) a poslední nejvíce hydrofilní látky (polární). [13]

Mobilní fáze

Volba mobilní fáze je důležitým faktorem k úspěšné separaci. V ideálním případě by rozpouštědla jako mobilní fáze měla mít tyto vlastnosti: [14]

1. Dobrá rozpustnost složek vzorku
2. Nekorozivní pro komponenty HPLC
3. Vysoká čistota, nízké náklady
4. Nízká viskozita, toxicita a hořlavost

Rozpouštědla jsou vybírána podle HPLC separačního módu, analytu, typu stacionární fáze a typu detekce. Buď můžeme použít čistá rozpouštědla jako je voda, methanol, acetonitril atd. nebo směsi rozpouštědel. Někdy jsou přidávány do mobilní fáze různé přísady jako např. soli, kyseliny nebo zásady, které poskytují nebo udržují určité pH. Probíhá-li separace s jedním rozpouštědlem nebo se směsí rozpouštědel o stejném složení, pak hovoříme o izokratické eluci. Pokud se složení mobilní fáze během separace mění, poté se jedná o gradientovou eluci. Gradienty se často získávají smícháním dvou rozpouštědel o rozdílném složení, takzvaný

binární gradient. Smíchání více rozpouštědel (ternární či kvartérní gradient) není běžné. Schopnost mobilní fáze eluovat látku rychleji ve srovnání s jinými rozpouštědly je nazývána jako „eluční síla“. Povaha mobilní fáze má vliv i na další parametry HPLC jako je např. volba detektoru. [15]

Stacionární fáze

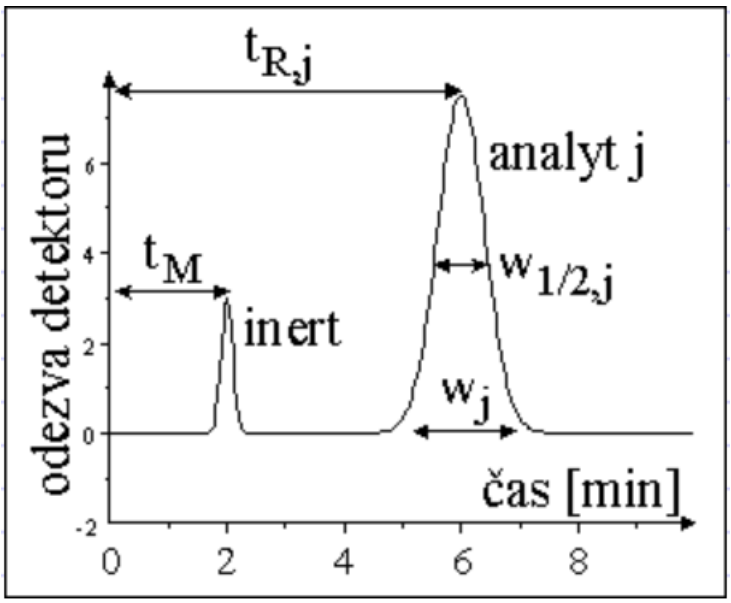
Volba typu stacionární fáze, velikosti částic stacionární fáze a rozměrů kolony jsou nejdůležitější pro úspěšnou separaci. Stacionární fáze v HPLC rozdělujeme na částicové a monolitické náplně. V monolitických kolonách je částice nahrazena jedním kusem makropórezního materiálu. Existují jak organické (př. polystyren), tak anorganické (př. na bázi oxidu křemičitého) monolitické stacionární fáze. Hlavními výhodami použití těchto stacionárních fází jsou: snadná příprava, snížený odpor proudění kapaliny a rychlejší přenos hmoty. Nevýhodou je, že mají menší škálu použitelných stacionárních fází. U organických monolitů chybí mezopóry a z toho důvodu jsou vhodné pro separaci velkých molekul. Naopak monolity oxidu křemičitého mezopóry obsahují a ty jsou vhodné pro rychlou separaci malých molekul. Částicové stacionární fáze jsou nejběžněji silikagelové, tvořené z porézních částic oxidu křemičitého. Částice mohou být buď plně porézní nebo povrchově porézní. Povrchově porézní částice má neporézní jádro a porézní povrchovou vrstvu. Po vývoji a zkoumání bylo zjištěno, že mají lepší účinnost než plně porézní částice. Díky zvýšení efektivity můžeme na povrchově porézních částicích provádět velmi rychlé analýzy bez generace vysokých protitlaků při průtoku mobilní fáze kolonou naplněné těmito částicemi. Bohužel podobně jako u monolitických stacionárních fází je komerční dostupnost těchto stacionárních fází omezená. Nejčetnější jsou v praxi stále plně porézní náplně. Současnost nám v HPLC vytváří nový trend a to miniaturizace, tedy menší velikosti částic a menší rozměry kolon, z čehož vyplývá použití menších průtoků mobilní fáze a menší dávkované objemy vzorků, což snižuje finanční náklady prováděných analýz, spotřebu použitých chemikálií a jednodušší možnost propojení s hmotnostní detekcí. [16]

1.5 Vyhodnocování dat

Chromatogram

Detektor umístěný na konci aparatury za kolonou vytváří signál, který je úměrný typu a koncentraci analytu. Záznam signálu detektoru v závislosti na čase analýzy nebo spotřebovaného objemu mobilní fáze nazýváme chromatogram a zóny vzorku se v něm

zobrazují jako píky. Podle polohy píku na x-ové ose můžeme kvalitativně určit analyt a podle plochy píku kvantitativně množství. [4] Na Obr. 2 vidíme ukázkový chromatogram.



Obr. 2 – Schéma chromatogramu

$t_{R,j}$ – retenční čas analytu j, t_M – mrtvý retenční čas, w_j – šířka píku analytu j při základně, $w_{1/2,j}$ – šířka píku analytu j v polovině jeho výšky

(Zdroj: P. Coufal. *HPLC* [online]. Praha, 1996 [cit. 2021-4-18]. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html)

Retenční charakteristiky

Veličiny, které kvalitativně popisují analyzovanou látku v určitém chromatografickém módu, jsou eluční čas (t_R) a eluční objem (V_R). Eluční čas je doba od nástřiku vzorku do zaznamenání maxima píku. Stejně tak eluční objem, je celkový objem mobilní fáze, který protekl od nástřiku vzorku kolonou po maximum píku. Tyto 2 veličiny jsou navzájem propojeny vztahem s objemovým průtokem (F_M), což je objem mobilní fáze proteklý kolonou za časovou jednotku.

$$V_R = t_R \cdot F_M \qquad (1)$$

Dále jsou pak veličiny eluční čas a eluční objem vyjádřené pomocí součtu mrtvých časů či mrtvých objemů a redukovaných časů či objemů podle rovnic (2) a (3).

$$t_R = t_R' + t_M \qquad (2)$$

$$V_R = V_R' + V_M \qquad (3)$$

Mrtvý čas (t_M) je doba, kterou analyt stráví v mobilní fázi, a redukovaný čas ($t_R^{'}$) je doba, kterou analyt stráví ve stacionární fázi. Analogicky pak s objemem, kdy za dobu mrtvého času proteče kolonou mrtvý objem (V_M) a za dobu redukovaného času proteče kolonou redukovaný objem ($V_R^{'}$).

Další veličina důležitá k popisu retenčního chování analytu je retenční faktor (k). Retenční faktor vyjadřuje, kolikrát je větší látkové množství analytu ve stacionární fázi v porovnání s mobilní fází a z chromatogramu pak určíme retenční faktor podle uvedeného vzorce. [11]

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R^{'}}{V_M} = \frac{t_R^{'}}{t_M} \qquad (4)$$

Účinnost

Mírou účinnosti separace je v chromatografii tzv. teoretické patro. S tím je spojen i tvar eluční křivky. Šířka eluční křivky (w) je pro výpočet účinnosti klíčová a je závislá na difúzi neboli na difúzním rozšiřování zón. Účinnost je nižší se širší eluční křivkou, a tudíž s větší difúzí a naopak. Výpočet počtu teoretických pater n udává vztah: [11]

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_j}\right)^2 = 5{,}545 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{\frac{1}{2}j}}\right)^2 \qquad (5)$$

Pokud známe délku separační kolony L, můžeme vypočítat i výškový ekvivalent teoretického patra H podle vztahu: [11]

$$H = \frac{L}{n} \qquad (6)$$

Účinná separace je charakterizována vysokým počtem teoretických pater n a tedy nízkou hodnotou výškového ekvivalentu teoretického patra H.

Rozlišení

Hlavním cílem chromatografie je získat co nejlepší rozdělení látek (píků) v daném čase. Rozdělení látek je buď úplné, částečné nebo nedokonalé, ale tento stav musíme vyjádřit kvantitativně. Proto byla zavedena veličina tzv. rozlišení $R_{1,2}$ (relativní separace dvou látek). Rozlišení dvou látek (zde označeny jako i a j) můžeme z chromatogramu spočítat podle vztahu: [11]

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot [t_{R,i} - t_{R,j}]}{w_i + w_j} \qquad (7)$$

Pokud je hodnota rozlišení menší než 1, tak píky nejsou rozděleny. Dostatečného rozlišení analytů dosahujeme při hodnotě 1,5. Větší rozlišení je zbytečné a nežádoucí, protože prodlužuje dobu analýzy. U symetrických píků postačuje pro kvantitativní vyhodnocování i hodnota rozlišení rovna 1. [11]

Faktory ovlivňující rozlišení lze rozdělit na –faktor selektivity, faktor kapacity a faktor účinnosti. Zvětšením těchto faktorů lze dosáhnout lepšího rozlišení. Při vyjádření rozlišení pomocí výše uvedených faktorů platí rovnice:

$$R_{1,2} = \frac{1}{4} \cdot \frac{r_{1,2}-1}{r_{1,2}} \cdot \frac{k_1}{1+k_1} \cdot \sqrt{n} \qquad (8)$$

1. Faktor selektivity ($F_{sel} = \frac{r_{1,2}-1}{r_{1,2}}$)

Selektivita v chromatografii je dána volbou stacionární a mobilní fáze. Dělení látek je tedy založeno právě na selektivitě. Ta je vyjádřena hodnotou relativní retence ($r_{1,2}$), která závisí na poměru hodnot redukovaných objemů nebo retenčních faktorů či distribučních konstant.

$$r_{1,2} = \frac{V_{R,1}^{'}}{V_{R,2}^{'}} = \frac{K_{D,1}}{K_{D,2}} = \frac{k_1}{k_2} \qquad (9)$$

Hodnota rozlišení může být tedy ovlivněna: změnou mobilní fáze, změnou stacionární fáze, změnou obou fází zároveň nebo změnou rychlosti toku mobilní fáze.

2. Faktor kapacity ($F_{kap} = \frac{k_1}{1+k_1}$)

Podle vztahu (8) je patrné, že se vzrůstající hodnotou retenčního poměru se bude zvětšovat i rozlišení a naopak. Retenční faktor může být ovlivněn: množstvím stacionární fáze v koloně, změnou stacionární nebo mobilní fáze (stejně jako u faktoru selektivity) či změnou separační teploty.

3. Faktor účinnosti ($F_{\text{úč}} = \sqrt{n}$)

Rozlišení analytů je podle vzorce (8) přímo úměrné druhé odmocnině počtu teoretických pater (n). Faktor účinnosti je ovlivnitelný pomocí: délky kolony (při delší koloně počet teoretických pater stoupá), rychlostí mobilní fáze či velikostí částeček sorbentu a separační teplotou. [11]

1.6 Zlato

1.6.1 Základní informace

Zlato je žlutý, lesklý, měkký a obzvláště stálý prvek. Jeho vlastnosti v kovovém stavu (Au^0) jsou známy už od středověku. Jeho nízká reaktivita s kyslíkem, sírou nebo koncentrovanými bázemi či kyselinami umožňují jeho široké využití. Rozpouští se pouze v lučavce královské za vzniku chloridu zlatitého ($AuCl_3$) a v nadbytku kyseliny chlorovodíkové vzniká kyselina tetrachlorozlatitá ($H[AuCl_4]$) podle rovnic [10] a [11].

$$Au + 3\,HCl + HNO_3 \rightarrow AuCl_3 + NO + 2\,H_2O \qquad (10)$$

$$Au + 4\,HCl + HNO_3 \rightarrow H[AuCl_4] + \ NO + 2\,H_2O \qquad (11)$$

Naopak zlato snadno reaguje s halogeny. S bromem reaguje už při laboratorní teplotě za vzniku bromidu zlatného i bromidu zlatitého, dále s chlorem, se kterým reaguje teprve až při zvýšené teplotě buď do 150 °C, kdy vzniká chlorid zlatitý nebo mezi 150-250 °C za vzniku chloridu zlatného. Raději než přímo s halogeny, reaguje zlato s roztoky halogenů v jejich bezkyslíkatých kyselinách, jak je vidět z rovnice (12). [17]

$$2\,Au + 2\,HCl + 3\,Cl_2 \rightarrow 2\,H[AuCl_4] \qquad (12)$$

Tato specifická reaktivita vede k biologicky aktivním roztokům zlata. Tyto přípravky se používají při léčbě artritidy nebo různých druhů rakoviny. Pokud je kyselina tetrachlorozlatitá ($H[AuCl_4]$) uvedena do přítomnosti silného redukčního činidla (např. tetrahydridoboritanu sodného – $NaBH_4$) a stabilizátoru (např. citrátu sodného), má schopnost tvořit nanočástice. [18] Další fyzikálně chemické vlastnosti zlata jsou shrnuty v Tabulce 1. [17]

Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti zlata a jeho umístění v periodické soustavě prvků

český název	**Zlato**
latinský název	**Aurum**
anglický název	**Gold**
chemická značka	**Au**
protonové číslo	**79**
relativní atomová hmotnost	**196,97**
perioda	**6**
skupina	**I.B**
zařazení	**přechodné kovy**
oxidační stavy	**-I, I, III, V**
teplota tání [°C]	**1064**
teplota varu [°C]	**2808**
hustota [$g \cdot cm^{-3}$]	**19,32**
hustota při teplotě tání [$g \cdot cm^{-3}$]	**17,31**
elektronegativita	**2,54**

1.6.2 Stanovení zlata

Pro kvantifikaci zlata lze využít různé analytické metody – od nejsnadněji použitelné spektrofotometrické metody po ultra-specifickou hmotnostní spektrometrii. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra je jednou z nejjednodušších metod kvantifikace zlata. Pro kvantifikaci zlata pod rozsahem $\mu mol \cdot dm^{-3}$ je ICP-MS (hmotnostní spektrometrie indukčně vázané plazmy) jedinou možnou analytickou metodou. ICP-MS je obvykle spojena se separačními metodami konkrétně kapalinovou chromatografií (LC-ICP-MS) nebo kapilární elektroforézou (CE-ICP-MS). Přímé nebo nepřímé stanovení zlata s využitím těchto metod často vede k analytickým problémům kvůli interferencím mezi složkami autentického vzorku a citlivostí metody. Proto se vyžadují kroky předúpravy vzorku k zajištění opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků a k dosažení potřebné meze kvantifikace. Bohužel zatím neexistuje žádná snadno použitelná analytická metoda, která by zajistila dostatečnou citlivost pro kvantifikaci zlata v různých převážně vodných vzorcích. Přehled analytických metod

používaných pro stanovení zlata v iontové formě nebo ve formě nanočástic je uveden v Tabulce 2. [18[1]]

Tabulka 2: Přehled analytických metod kvantifikace zlata

Metoda	**LOD [$\mu mol \cdot dm^{-3}$]**
Spektrofotometrie	90,00
Fluorimetrie	$1{,}52 \cdot 10^{-2}$
LC-ICP-MS	$2{,}60 \cdot 10^{-4}$
CE-ICP-MS	$5{,}00 \cdot 10^{-2}$
AAS	0,61

1.6.3 Využití zlata

Zlato může být využito v mnoha různých odvětvích. Známe ho především z výroby šperků, k pozlacování předmětů z méně ušlechtilých kovů nebo u zubních implantátů. Dále se využívá v potravinářství jako barvivo. Zlato se využívá i v různých slitinách. Buď ve šperkařství jako zlato mnoha barev (např. slitina zlata s mědí je červené zlato nebo s niklem jako bílé zlato) nebo v kosmickém průmyslu, kdy slitina zlata s indiem utěsňuje skleněné okenní otvory. Tetrachlorozlatitan sodný ($Na[AuCl_4]$) se využívá ve fotografickém odvětví. [19]

[1] V publikaci [18] jsou sjednoceny různé metody z vícero zahraničních publikací do následující tabulky.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité v této práci jsou shrnuty v následující Tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	**Čistota**	**Mr [g/mol]**	**Výrobce**	**Stát**
Acetonitril	99,9 % pro gradientovou eluci	41,05	Sigma-Aldrich	USA
Kyselina chlorovodíková	35 % p.a.	36,46	LachNer	ČR
Tetrachlorozlatitan draselný	99,995 %	377,88	Sigma-Aldrich	USA
Deionizovaná voda (ultra-pure)	0,18 μS/cm			

2.2 Použité přístroje a pomůcky

K měření byl použit přístroj kapalinového chromatografu od firmy Shimadzu (Japonsko) složen ze zásobníku na láhve, odplyňovače DGU-20A5R, pumpy LC-20AD a detektoru SPD-20AV. K navážení vzorku byly využity váhy Nimbus 254i (ADAM Equipment, Velká Británie). Dále k přípravě vzorku byly použity pipety Biohit proline 10 – 100 μl a 100 – 1000 μl (Unimed, ČR). Dávkování vzorku bylo prováděno injekční stříkačkou 250 μl (Hamilton, USA). K separaci byly použity kolony Luna NH_2 5 μm s rozměry 2 x 250 mm (Phenomenex, USA) a XBridge Amide 3,5 μm s rozměry 2,1 x 150 mm (Waters, USA).

2.3 Přípravy mobilní fáze a zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného

Příprava mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vodné složky. Jako vodná složka byla použita nejdříve deionizovaná voda, poté roztok kyseliny chlorovodíkové v deionizované vodě o koncentracích 1,0, 5,0 a 10,0 $mmol \cdot dm^{-3}$. Roztok HCl o koncentraci 10,0 $mmol \cdot dm^{-3}$ byl připraven ze 35% HCl odpipetováním 0,443 ml do 500 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Roztoky HCl o koncentracích 1,0 $mmol \cdot dm^{-3}$ a 5,0 $mmol \cdot dm^{-3}$ byly připraveny naředěním roztoku HCl o koncentraci 10,0 $mmol \cdot dm^{-3}$ deionizovanou vodou. Při počátečních pokusech byla směs acetonitrilu a vodné složky míchána v daném poměru ze

dvou zásobních lahví (v jedné ACN, v druhé vodná složka) směšovačem v chromatografu. Po nalezení vhodného složení vodné fáze a poměru vodné a organické složky byla připravena směsná mobilní fáze externě do jedné zásobní lahve. Tímto způsobem bylo připraveno 1000 ml směsi acetonitrilu a 10,0 mmol·dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové v objemovém poměru 94:6 (940 ml acetonitrilu a 60 ml 10,0 mmol·dm^{-3} HCl).

Příprava vzorku

Navážka 0,3779 g tetrachlorozlatitanu draselného byla kvantitativně převedena do 10ml odměrné baňky a doplněna po rysku deionizovanou vodou, 90% acetonitrilem nebo 100% acetonitrilem. Zásobní roztoky tetrahlorozlatitanu draselného byly uchovány v lednici při teplotě 6-8 °C. Z tohoto zásobního roztoku byly vhodným ředěním připravovány analyzované vzorky tetrachlorozlatitanu draselného.

2.4 Podmínky analýzy

Nalezené optimální podmínky analýzy, při kterých byly získány nejlepší výsledky. Na koloně Luna NH_2: složení mobilní fáze 94 % ACN a 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok mobilní fáze 0,4 ml·min^{-1}, dávkovaný objem 5 µl 10,0 mmol·dm^{-3} tetrachlorozlatitanu draselného v 90% ACN a na koloně XBridge Amide: složení mobilní fáze 94 % ACN a 6 % 10,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok mobilní fáze 0,7 ml·min^{-1}, dávkovaný objem 2 µl 1,0 mmol·dm^{-3} tetrachlorozlatitanu draselného ve 100% ACN.

2.5. Výpočty

Směrodatná odchylka (SD)

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

Relativní směrodatná odchylka (RSD)

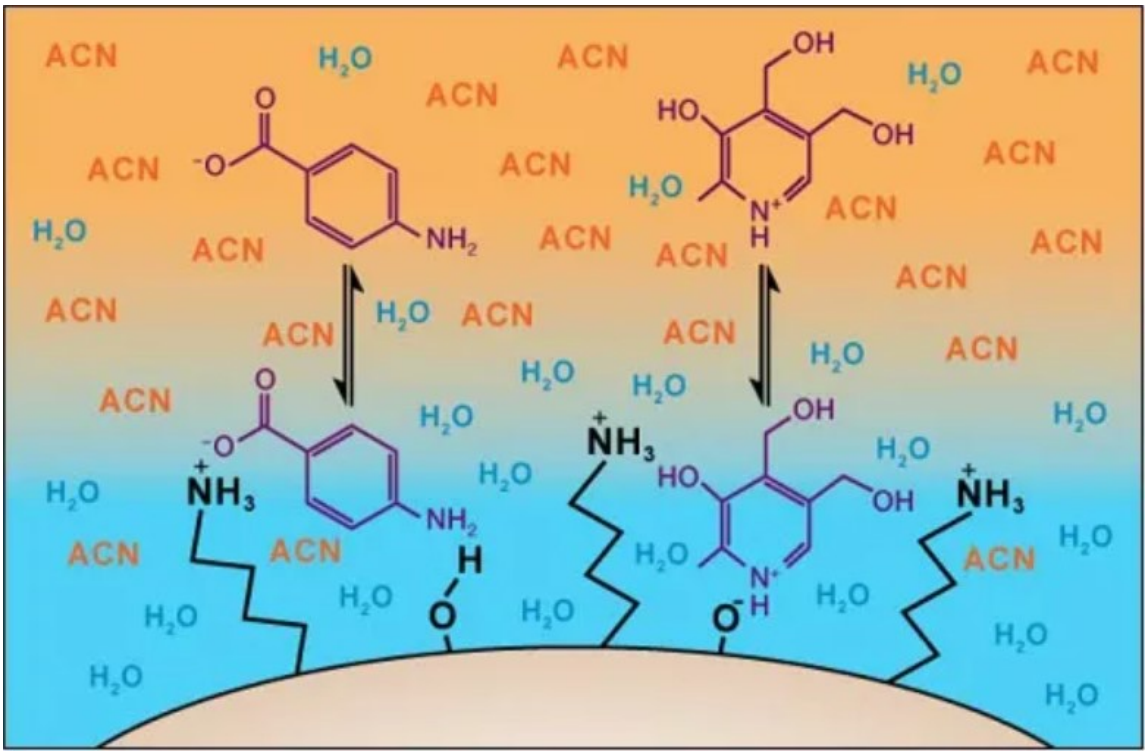
$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

3 Výsledky a diskuse

V odborné literatuře je velmi málo publikací, které se zabývají analýzou tetrachlorozlatitanu s využitím metody HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Publikovaná metoda chromatografického stanovení zlata ve formě tetrachlorozlatitanu je založena na tvorbě iontového páru s kationtem barviva Rhodaminu B a následné extrakci z vodné fáze diisopropyletherem. Po odpaření organické fáze byl odparek rozpuštěn v mobilní fázi a nadávkován do kapalinového chromatografu. HPLC analýza probíhala na koloně Nucleosil C18 s využitím mobilní fáze složené z acetonitrilu a 0,1 % roztoku trifluoroctové kyseliny ve vodě v objemovém poměru 25/75. Dávkováno bylo 20 μl vzorku a detekce probíhala při 555 nm. Limit kvantifikace pro tuto publikovanou metodu je 0,1 $\mu mol \cdot dm^{-3}$ zlatité soli. [18]

V této bakalářské práci byla pro analýzu tetrachlorozlatitanu využita HILIC chromatografie.

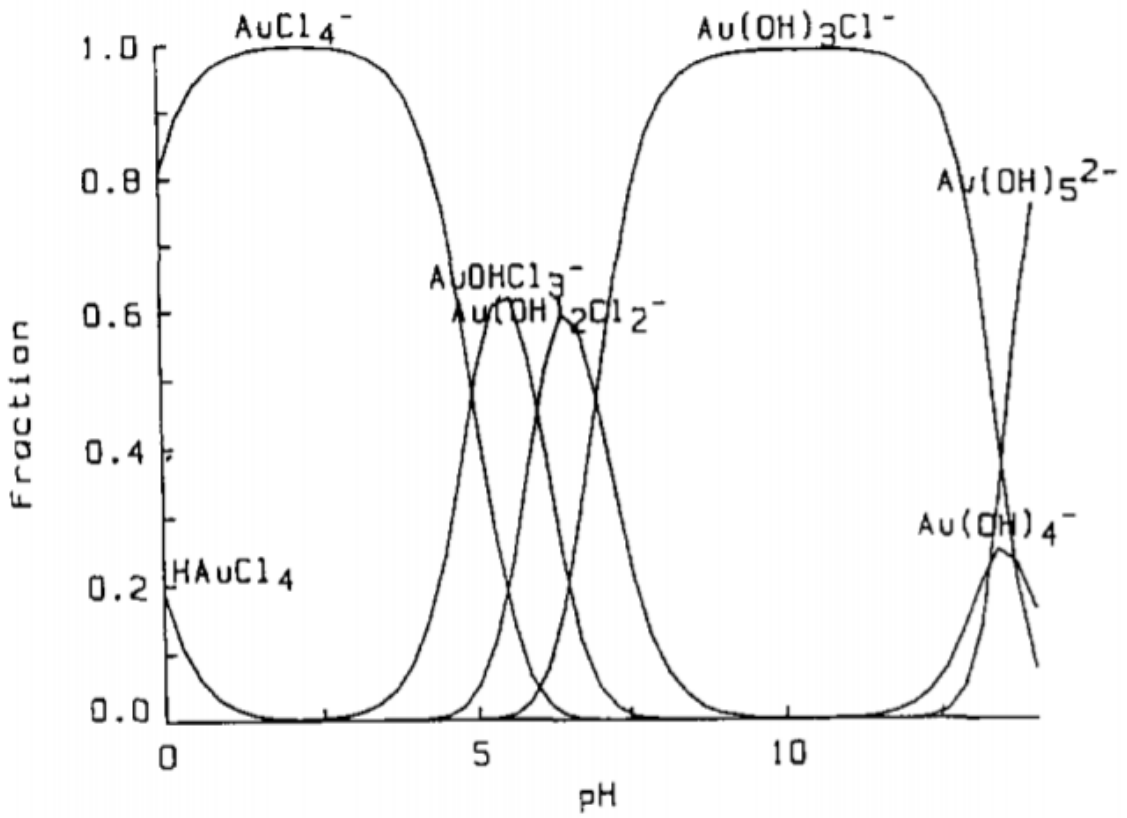
HILIC je druhem vysokoúčinné kapalinové chromatografie, který kombinuje použití polární kolony s mobilní fází složenou z vysokého procenta organického rozpouštědla mísitelného s vodou a nízkého procenta vodné složky. Tato technika je výhodná pro analýzu polárních a ionizovatelných sloučenin, které nevykazují dobrou retenci v reverzních fázích. Typ interakcí mezi analytem a stacionární fází jsou převážně polární interakce jako např. iontová, iontově dipólová nebo vodíková vazba. Na povrchu polární stacionární fáze se vytvoří stacionární (adsorbovaná) vrstva vody a analyt se rozděluje mezi tuto vodnou fázi a acetonitrilem v mobilní fázi. Mobilní fáze obsahuje vysoké procento acetonitrilu a nízké procento vodné složky. HILIC je také velmi citlivý na rozpouštědlo vzorku, a proto by vzorek měl být rozpuštěn v rozpouštědle co nejvíce podobném mobilní fázi. [20] Schématický popis principu HILIC je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3 – Schématické znázornění interakcí v HILIC chromatografii. Modrá barva představuje vrstvu vody a oranžová barva vrstvu acetonitrilu. Analyt může interagovat se stacionární fází různými polárními interakcemi a zároveň dochází k rozdělení analytu mezi vrstvu acetonitrilu (oranžová vrstva) a vodnou (modrou) vrstvu.

(Zdroj: What the HILIC is HILIC? Phenomenex blog [online]. USA: Phenomenex, 23.6.2016 [cit. 2021-8-2]. Dostupné z: https://phenomenex.blog/2016/06/23/what-the-hilic-is-hilic/)

Pro HILIC analýzu tetrachlorozlatitanu draselného byly využity 2 kolony od různých výrobců, a to kolona Luna NH_2 5 µm s rozměry 2 x 250 mm (Phenomenex, USA) a XBridge Amide 3,5 µm s rozměry 2,1 x 150 mm (Waters, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs organického rozpouštědla acetonitrilu a vodné složky, tvořené deionizovanou vodou nebo kyselinou chlorovodíkovou o koncentracích 1,0, 5,0, a 10,0 $mmol \cdot dm^{-3}$. Kyselina chlorovodíková v mobilní fázi byla zvolena na základě publikovaného distribučního diagramu tetrachlorozlatitanu. Distribuční diagram jednotlivých forem zlatitanu je uveden na Obr. 4.



Obr. 4 - Distribuční pH diagram

($c_{Au^{3+}} = 10\ \mu g{\cdot}ml^{-1}, c_{Cl^-} = 0{,}1\ mol{\cdot}dm^{-3}$)

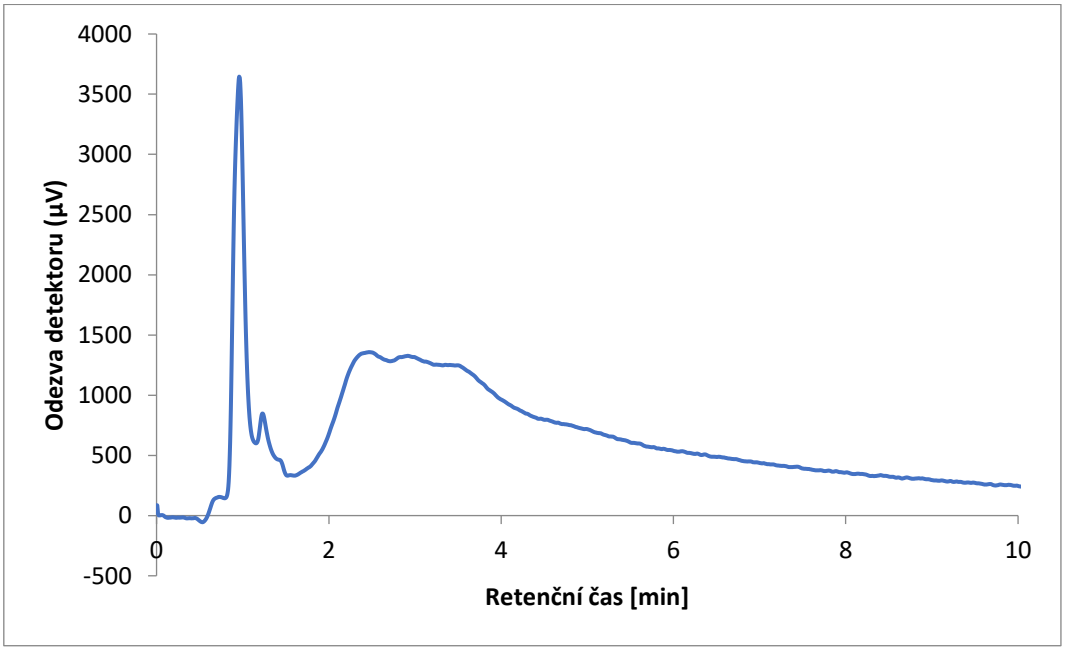
(Zdroj: B. Baraj, A. Sastre, A. Merkoçi a M. Martínez. Determination of chloride complex of Au(III) by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995, **718**(1), 227-232 [cit. 2021-8-15]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(95)00655-9)

Z distribučního diagramu na Obr. 4 je vidět, že tetrachlorozlatitan v závislosti na pH a koncentraci chloridových iontů tvoří hydroxokomplexy. Při hodnotách pH 2-3 je zlatitá sůl výhradně ve formě tetrachlorozlatitanu.

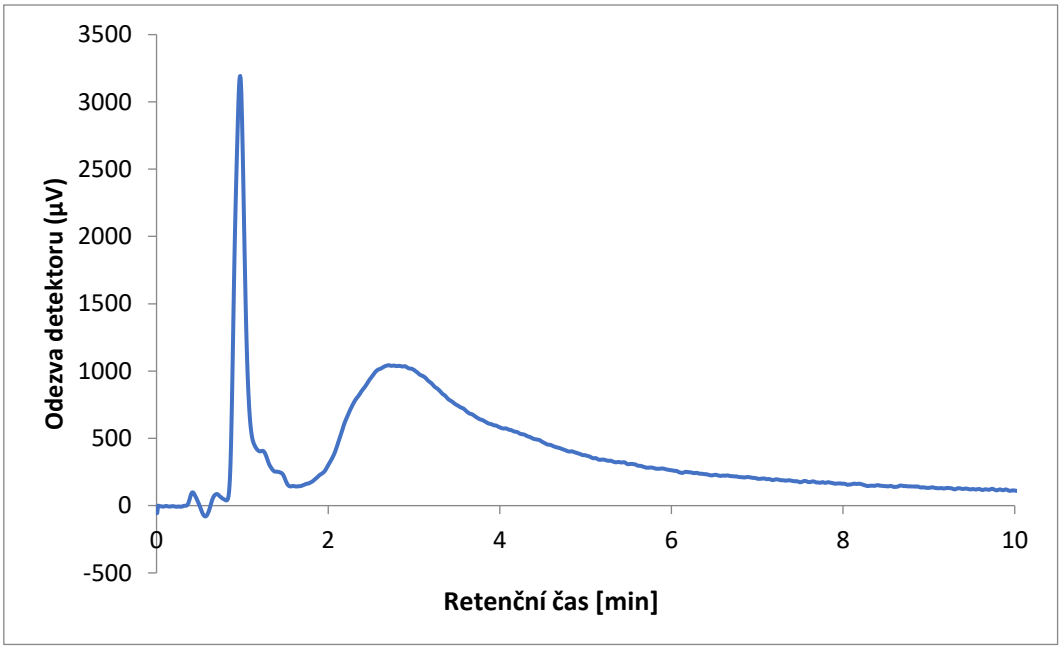
3.1 Aminová kolona Luna NH_2

Jako první byla pro analýzu tetrachlorozlatitanu draselného vyzkoušena kolona Luna NH_2. Při hledání vhodných podmínek analýzy byla nejdříve použita mobilní fáze složená z acetonitrilu a vody, v objemových poměrech v rozsahu 80:20 až 98:2. Vzorek tetrachlorozlatitanu o koncentraci 10 mmol·dm^{-3} byl nejdříve rozpuštěn v deionizované vodě a později v 90% acetonitrilu. Při použití deionizované vody jako rozpouštědla vzorku byly pozorovány 2 píky, bez ohledu na to, zda byl nadávkován vzorek nebo zda byla nadávkovaná

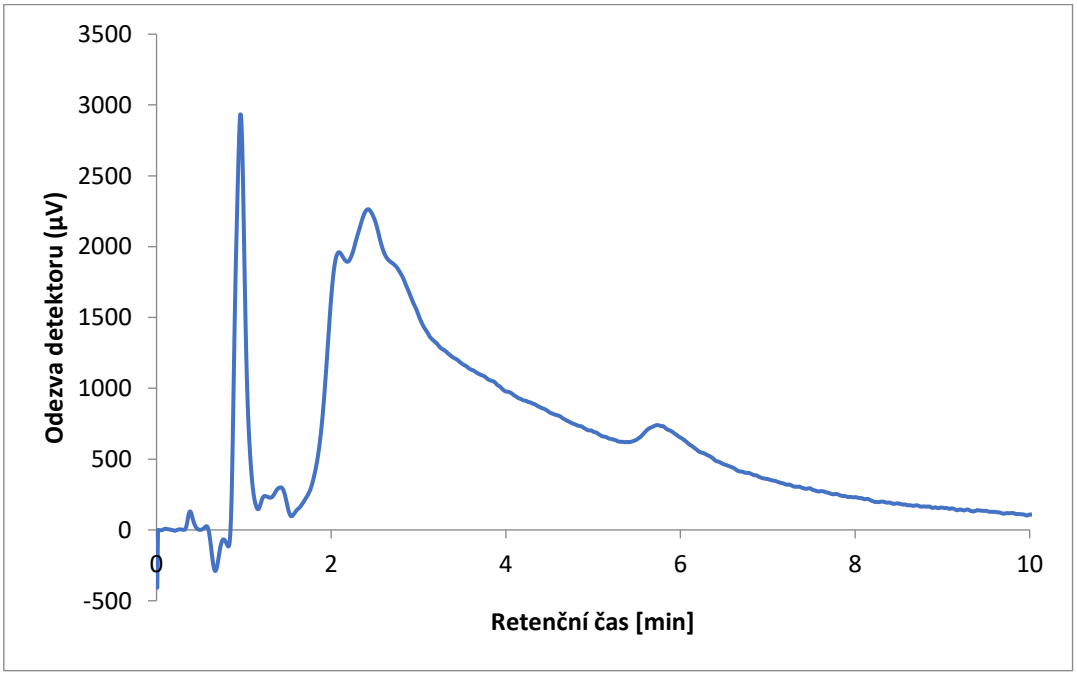
samotná mobilní fáze nebo čistý acetonitril. Poměr výšek těchto dvou píků se neustále měnil, i když byla opakovaně dávkována čistá mobilní fáze nebo jen acetonitril. Změnou rozpouštědla vzorku na 90% acetonitril se tento problém odstranil. Na Obr. 5 je zobrazen chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu v mobilní fázi složené z acetonitrilu a vody v poměru 94:6. Tvar píku bohužel neodpovídal požadavkům, a proto byla do vodné složky mobilní fáze přidána kyselina chlorovodíková. Nejprve byla vyzkoušena 1,0 mmol·dm^{-3} HCl, která tvar píku výrazně zlepšila, ale stále nebyl zcela vyhovující. Chromatogram změřený po přídavku HCl do vodné složky mobilní fáze je uveden na Obr. 6. Poté byla jako vodná složka mobilní fáze vyzkoušena 10,0 mmol·dm^{-3} HCl, která neposkytovala zlepšení tvaru píku, spíše naopak jak je vidět na Obr. 7. Nakonec byla tedy vyzkoušena 5,0 mmol·dm^{-3} HCl. Chromatogram změřený v mobilní fázi složené z acetonitrilu a 5,0 mmol·dm^{-3} HCl je zobrazen na Obr. 8. Toto složení mobilní fáze se při prvním nástřiku vzorku zdálo být vyhovující, ale v dalších nástřicích vzorku se výsledek bohužel nepodařilo zopakovat. Záznam opakovaného nástřiku roztoku tetrachlorozlatitanu je uveden na Obr. 9.



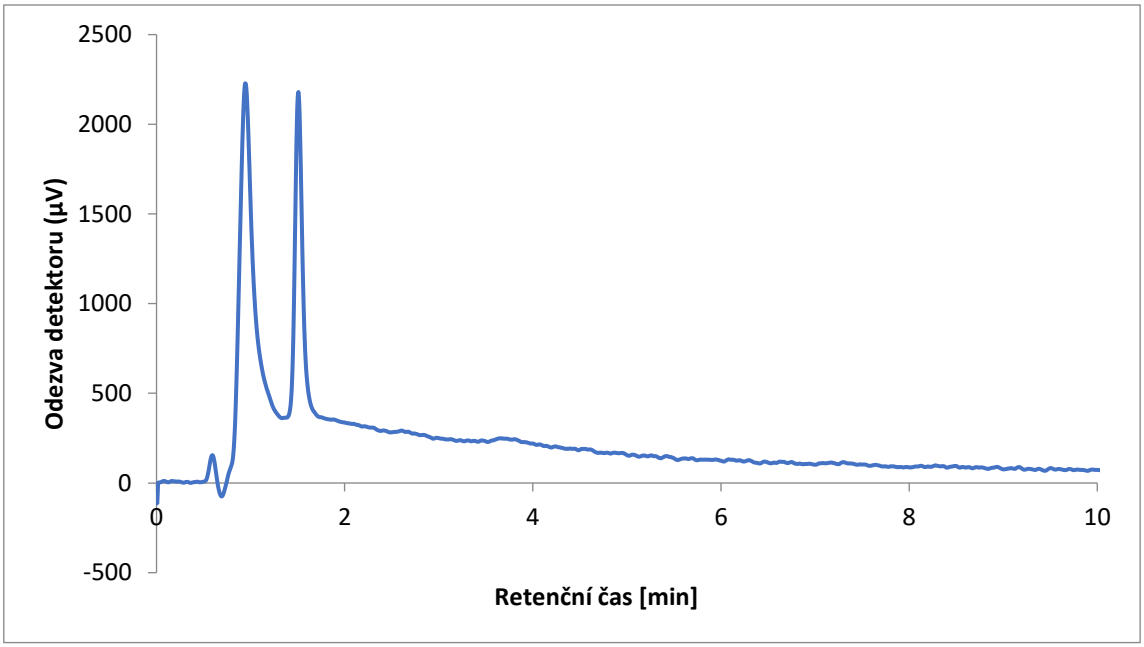
Obr. 5 – Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % voda, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm



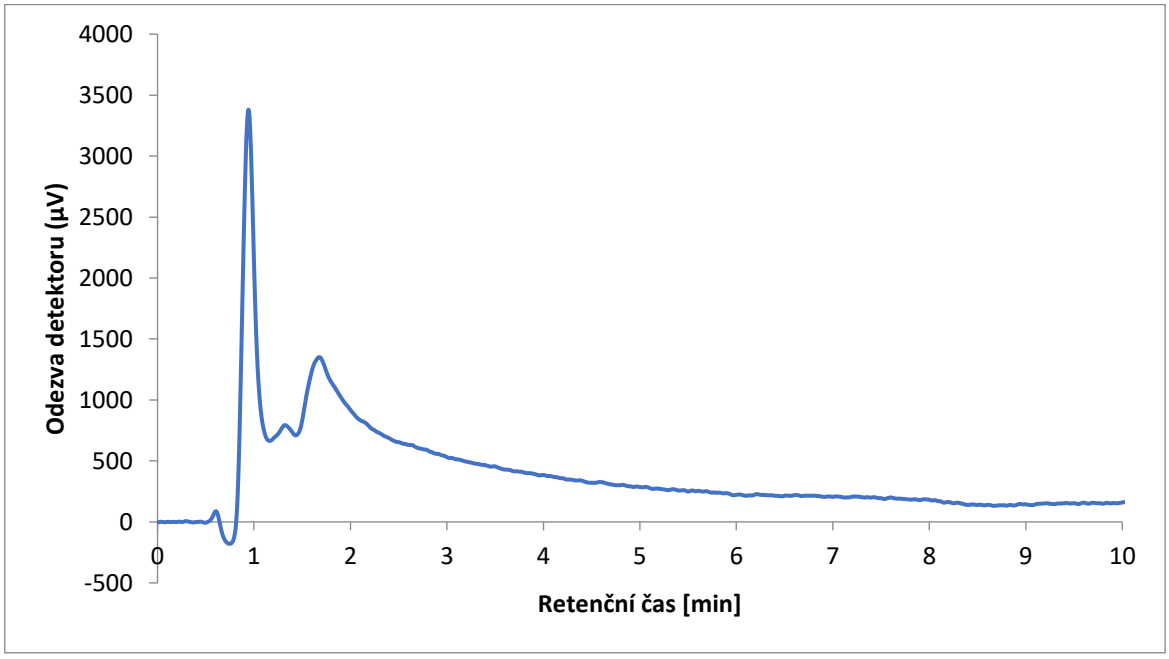
Obr. 6 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 1,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm



Obr. 7 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm



Obr. 8 – Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm - 1.nástřikě



Obr. 9 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm -2.nástřik

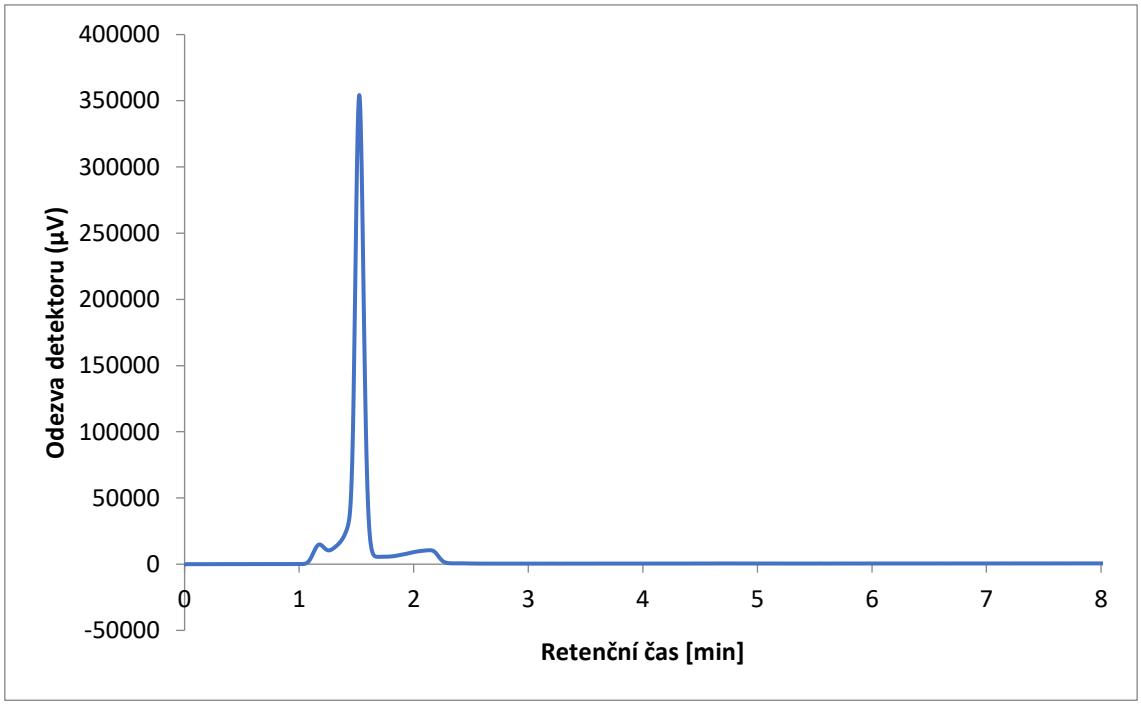
Z chromatogramů na Obr. 5 až 9 je vidět, že tvar píku tetrachlorozlatitanu se při použití kyseliny chlorovodíkové jako vodné složky mobilní fáze oproti deionizované vodě viditelně zlepšil. Nejvhodnější koncentrace kyseliny chlorovodíkové v mobilní fázi se zdála být po prvním pokusu 5,0 mmol·dm^{-3}, ale bohužel se nepodařilo analýzu úspěšně zopakovat. Proto byla pro analýzu tetrachlorozlatitanu vyzkoušená jiná HILIC kolona, a to konkrétně kolona XBridge Amide.

3.2 Amidová kolona XBridge Amide

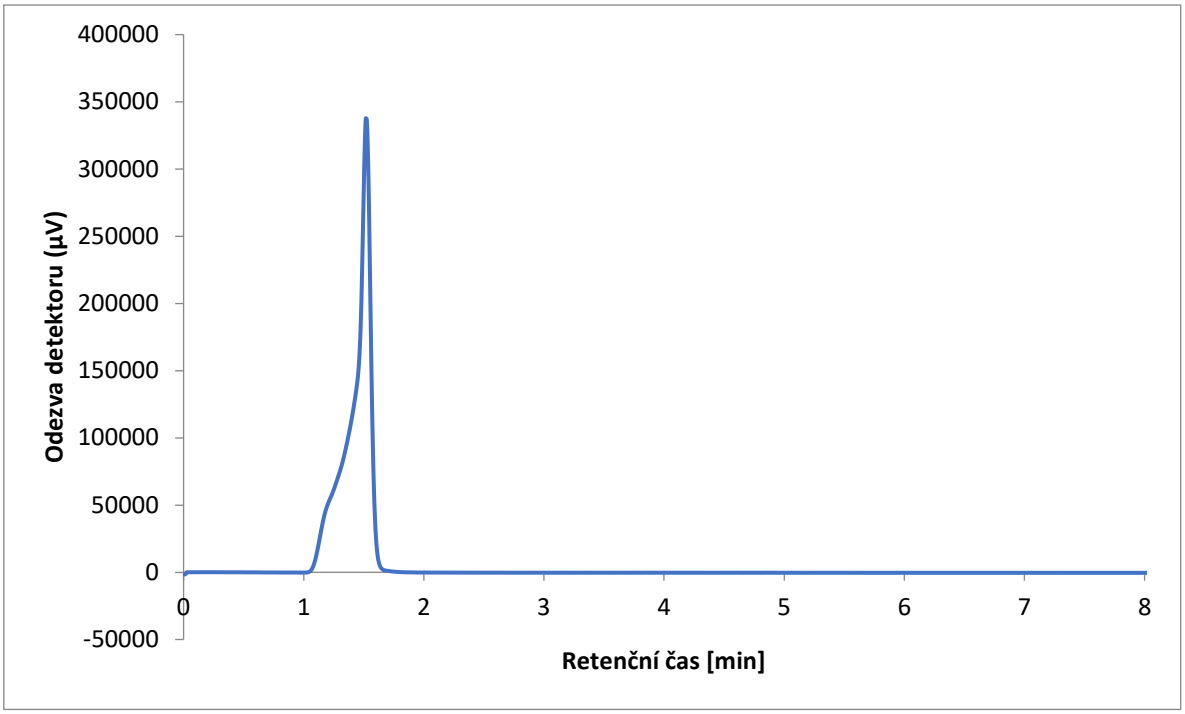
Jako druhá byla pro analýzu tetrachlorozlatitanu draselného vyzkoušena amidová kolona XBridge Amide. Opět byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu a vodné složky v objemových poměrech od 80:20 až k 98:2. Vodná složka mobilní fáze byla tvořena deionizovanou vodou nebo kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 1,0 a 10,0 mmol·dm^{-3}. Jako nejvhodnější poměr organické a vodné složky v mobilní fázi byl zvolen poměr 94:6, stejně jako na koloně Luna NH_2. Chromatogram změřený s použitím mobilní fáze obsahující jako vodnou složku deionizovanou vodu je uveden na Obr. 10. Výsledek této analýzy nebyl uspokojivý, a proto byl jako vodná složka mobilní fáze použit 1,0 mmol·dm^{-3} roztok HCl v deionizované vodě. Chromatogram zaznamenaný s použitím této mobilní fáze je znázorněn na Obr. 11. V chromatogramu je viditelný jeden pík, na jeho vzestupné části je patrný náznak dalšího píku. Proto byla zvýšena koncentrace kyseliny chlorovodíkové ve vodné složce mobilní fáze na 10,0 mmol·dm^{-3}. Při této koncentraci kyseliny chlorovodíkové ve vodné složce mobilní fáze byl okolo 7. minuty detekovaný pík tetrachlorozlatitanu, jak je vidět na Obr. 12. Pík okolo 7. minuty byl zaznamenán kromě detekční vlnové délky 255 nm i při vlnové délce 370 nm, která odpovídá druhému (slabšímu) absorpčnímu maximu v absorpčním spektru tetrachlorozlatitanu (nepublikované výsledky P.Coufal, J.Sobotníková). Pro zlepšení tvaru píku tetrachlorozlatitanu a zkrácení jeho retenčního času byl vzorek nově rozpuštěn ve 100% acetonitrilu, dále byla vyměněna dávkovací smyčka z 5 µl na 2 µl (Obr. 13) a zvýšena průtoková rychlost mobilní fáze z dosavadní rychlosti 0,4 ml·min^{-1} na 0,7 ml·min^{-1}. Chromatogram zaznamenaný za těchto podmínek je uveden na Obr. 14. Následně byla za těchto experimentálních podmínek měřena opakovatelnost dávkování vzorku tetrachlorozlatitanu o koncentraci 1,0 mmol·dm^{-3}. Zaznamenané chromatogramy jsou v přiblíženém pohledu zobrazeny na Obr. 15. Pro 10 opakovaných měření byly vyhodnoceny plochy píku tetrachlorozlatitanu, které jsou s hodnotami směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) shrnuty v Tabulce 4. Z hodnot ploch a RSD v Tabulce 4 a také ze sloupcového

grafu na Obr. 16 je patrné, že naměřené hodnoty vykazovaly značnou variabilitu, RSD dosáhla téměř hodnoty 28 %.

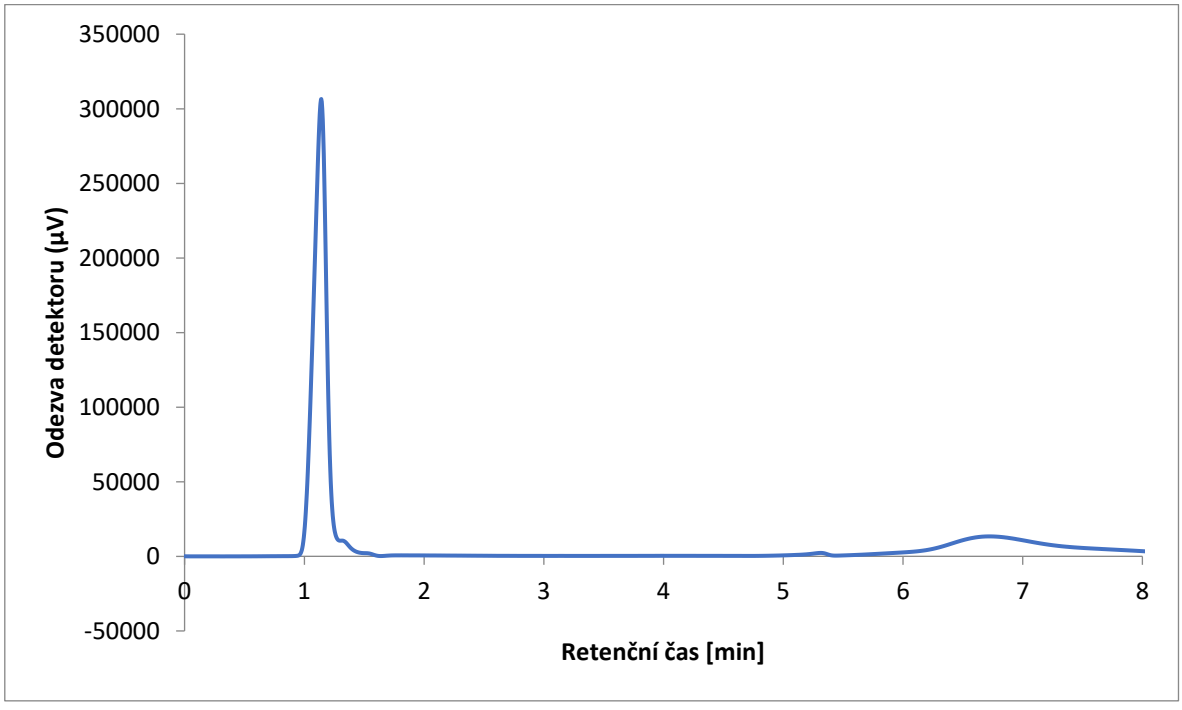
Při hledání důvodu této nízké opakovatelnosti měření byl připraven nový roztok vzorku, avšak tento krok nezlepšil opakovatelnost měření. Následně byla opakovaně dávkována jen mobilní fáze a byly registrovány „píky“ v různých retenčních časech a o různé intenzitě. Proto byla odpojena kolona a ověřena funkčnost dávkovacího ventilu a zkontrolována lampa v detektoru. Po připojení kolony zpět byla kolona promývána mobilní fází bez přítomnosti kyseliny chlorovodíkové, tedy mobilní fází o složení acetonitril a voda v poměru 94:6. Po nadávkování této mobilní fáze na kolonu byl registrován normální průběh základní linie. Následně byla použita mobilní fáze obsahující ve vodné složce 10,0 mmol·dm^{-3} kyselinu chlorovodíkovou. Po nadávkování bez vzorku, tedy po otočení dávkovacím ventilem, byl opět problém s průběhem základní linie, v chromatogramu byly neznámé signály. Pravděpodobně došlo k degradaci kolony vlivem dlouhodobého používání mobilní fáze obsahující kyselinu chlorovodíkovou. Z důvodu nedostatku času se již nestihlo vyměnit kolonu a opakovatelnost naměřit znovu.



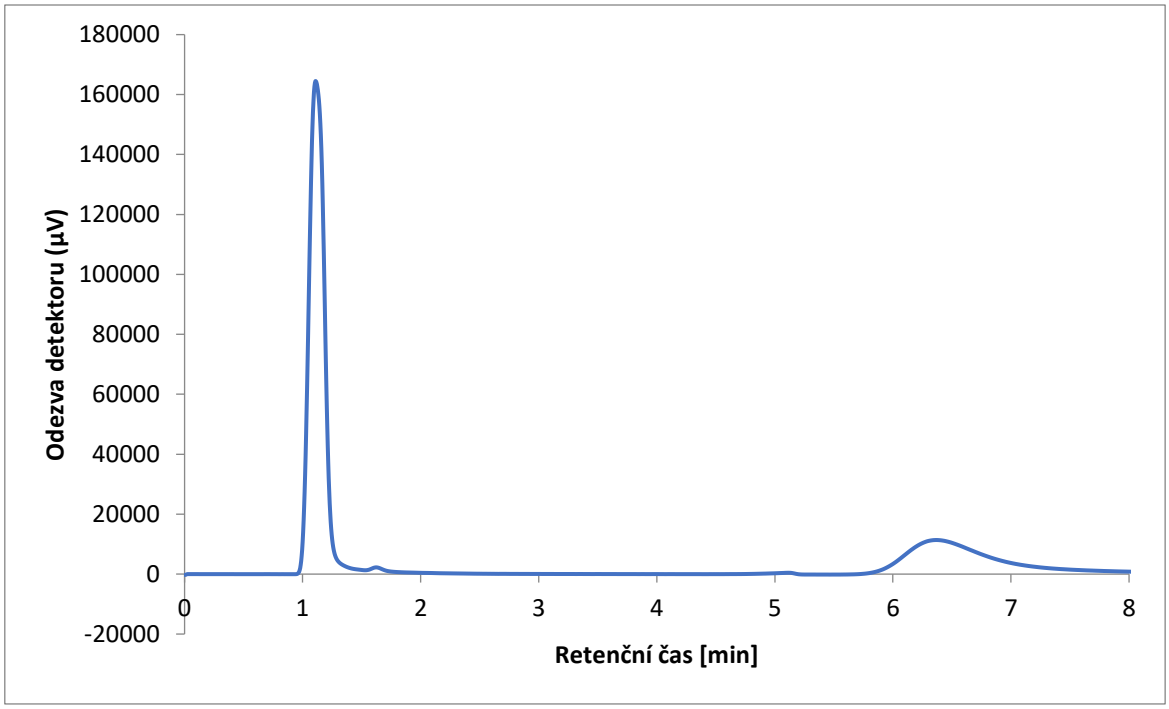
Obr. 10 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % voda, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm



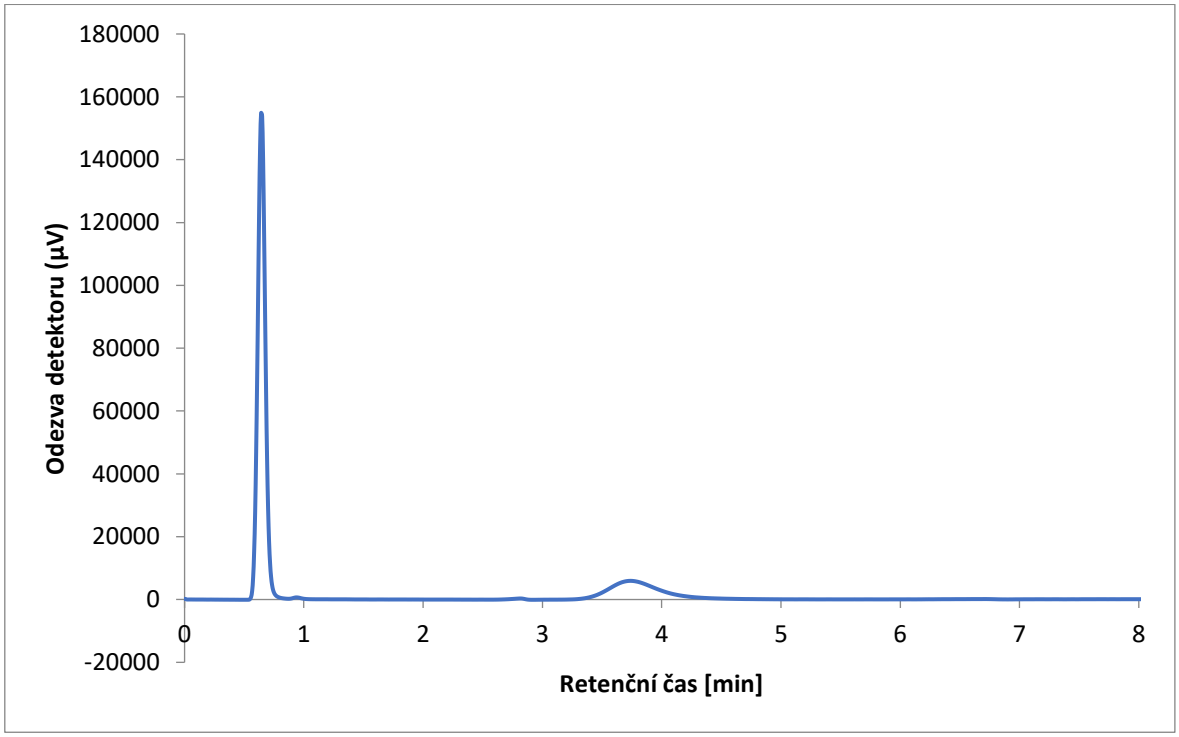
Obr. 11 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 1,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm



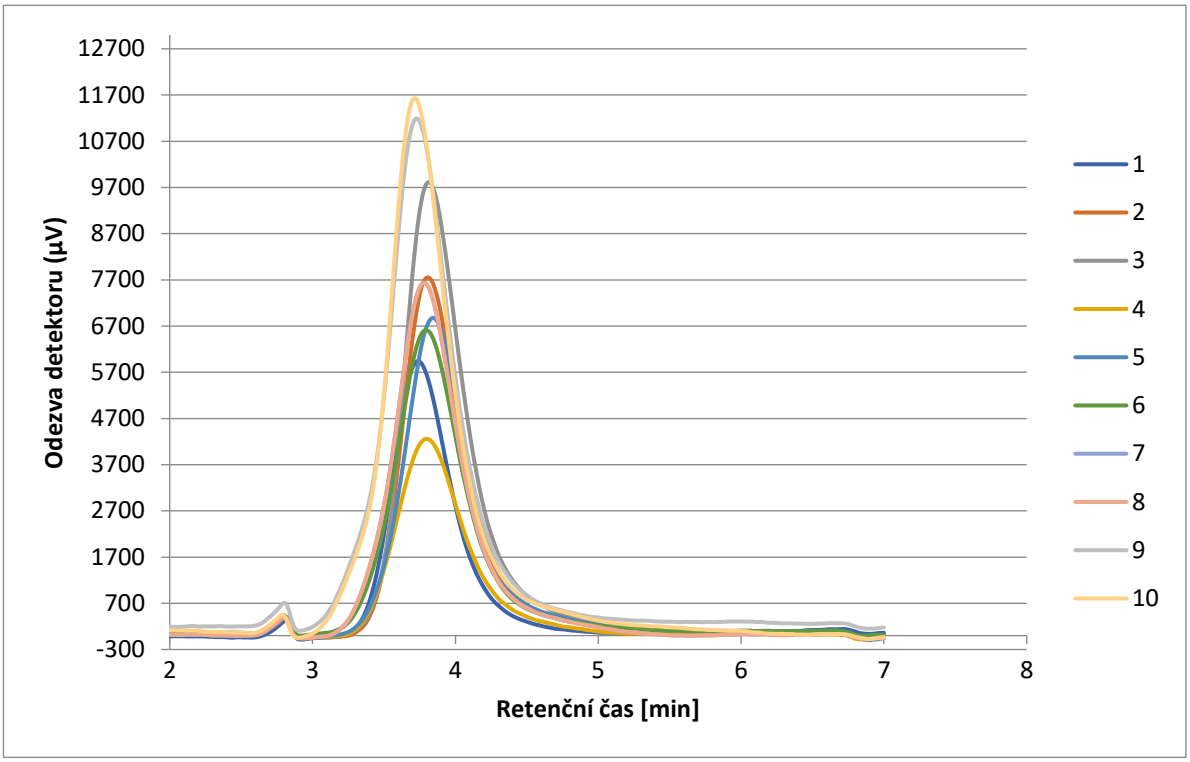
Obr. 12 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (5 µl), detekce při 255 nm



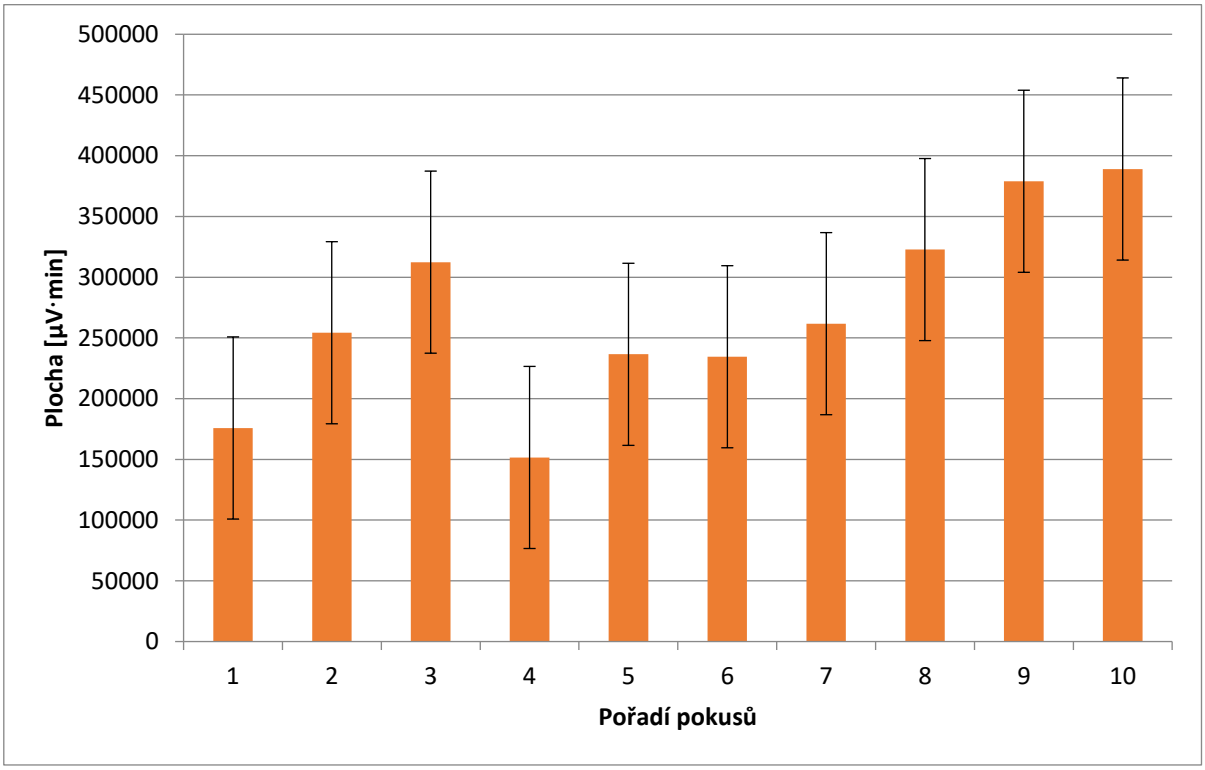
Obr. 13 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} nyní ve 100% ACN (2 µl), detekce při 255 nm



Obr. 14 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,7 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (2 µl), detekce při 255 nm



Obr. 15 - Přiblížený pohled na píky tetrachlorozlatitanu při opakovatelnosti měření (kolona XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,7 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3}– 2 µl, detekce při 255 nm)



Obr. 16 - Sloupcový graf ploch píků při opakovatelnosti měření

V následující Tabulce 4 jsou hodnoty ploch píků z opakovatelnosti měření a vypočtené hodnoty směrodatné odchylky SD a relativní směrodatné odchylky RSD.

Tabulka 4: Plochy píků a vypočtené hodnoty SD a RSD

Opakovatelnost (číslo měření)	**Plocha [µV·min]**
1	175 837
2	254 267
3	312 399
4	151 578
5	236 495
6	234 492
7	261 728
8	322 735
9	378 978
10	389 073
průměr	271 758
SD	74961,41
RSD	27,58

Závěr

V této bakalářské práci byly hledány experimentální podmínky pro stanovení tetrachlorozlatitanu draselného pomocí metody HPLC s využitím varianty HILIC.

Vhodné podmínky byly nalezeny na amidové koloně XBridge Amide a jsou to tedy: složení mobilní fáze 94 % ACN a 6 % 10,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok mobilní fáze 0,7 ml·min^{-1}, dávkovaný objem 2 µl 1,0 mmol·dm^{-3} tetrachlorozlatitanu draselného ve 100% ACN.

Z důvodu degradace kolony a nedostatku času nebylo již možné dále pokračovat a naměřit kalibrační křivku, meze detekce a mez stanovitelnosti.

Ohledně stanovení tetrachlorozlatitanu draselného pomocí HILIC metody nebyly dosud publikované žádné práce, a proto může tato bakalářská práce sloužit jako výchozí zdroj informací pro další zkoumání.

Zdroje

[1] V. Pacáková a K. Štulík. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.

[2] K. Štulík a kolektiv. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.

[3] P. Klouda. *Moderní analytické metody*. 2.vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

[4] D. A. Skoog., D. M. West, F. J. Holler a S. R. Crouch. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.

[5] A. V. Kiselev a J. I. Jašin. *Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1988.

[6] H. Small. *Ion Chromatography*. New York: Plenum Press, 1989. ISBN 978-1-4899-2544-2.

[7] Ch. R. Lowe a P. D. G. Dean. *Afinitní chromatografie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1979.

[8] S. Ahuja. *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. ISBN 0-8412-2116-2.

[9] P. Jandera. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **692**[1-2], 1-25 [cit. 2021-7-24]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.02.047

[10] L. Nováková, M. Douša, F. J. Holler a S. R. Crouch. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

[11] Z. Holzbecher, J. Churáček a kol. *Analytická chemie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1987.

[12] E. Pertile a V. Čablík. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.

[13] S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole a M.-L. Riekkola. *Liquid chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2.vydání. Amsterdam: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-805393-5.

[14] M. W. Dong. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. 2.vydání. NJ, USA: Wiley, 2019. ISBN 978-1-119-31376-2.

[15] S. C. Moldoveanu a V. David. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.

[16] F. Ramos. *Liquid Chromatography : Principles, Technology and Applications*. New York: Nova Science Publishers, 2013. ISBN 978-1-62618-678-1.

[17] Periodická tabulka: Zlato. *Prvky* [online]. 2009 [cit. 2021-7-24]. Dostupné z: http://www.prvky.com/79.html

[18] A. Pallotta, V. Philippe, A. Boudier, P. Leroy a I. Clarot. Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles. *Talanta* [online]. 2018, **179**, 307-311 [cit. 2021-7-24]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.11.016

[19] J. Struž a B. Studýnka. *Zlato: příběh neobyčejného kovu*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0902-3.

[20] What the HILIC is HILIC? Phenomenex blog [online]. USA: Phenomenex, 23.6.2016 [cit. 2021-8-2]. Dostupné z: https://phenomenex.blog/2016/06/23/what-the-hilic-is-hilic/

Seznamy obrázků a tabulek

Seznam obrázků

Obr. 1 – Schéma kapalinového chromatografu 14
Obr. 2 – Schéma chromatogramu 19
Obr. 3 – Schématické znázornění interakcí v HILIC chromatografii. 28
Obr. 4 - Distribuční pH diagram 29
Obr. 5 – Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % voda, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm 30
Obr. 6 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 1,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm 31
Obr. 7 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm 31
Obr. 8 – Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm - 1.nástřikě 32
Obr. 9 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně Luna NH_2 (2 x 250 mm, 5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 5,0 mmol·dm^{-3} HCl, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 10,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm -2.nástřik 32
Obr. 10 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % voda, průtok MF 0,4 ml·min^{-1}, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm 34
Obr. 11 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 1,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (10 µl), detekce při 255 nm 35
Obr. 12 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (5 µl), detekce při 255 nm 35
Obr. 13 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,4 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} nyní ve 100% ACN (2 µl), detekce při 255 nm 36
Obr. 14 - Chromatogram analýzy tetrachlorozlatitanu na koloně XBridge Amide (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), mobilní fáze 94 % ACN – 6 % 10,0 mmol·dm^{-3}, průtok MF 0,7 ml·min $^{-1}$, objem nadávkovaného vzorku 1,0 mmol·dm^{-3} (2 µl), detekce při 255 nm 36
Obr. 15 - Přiblížený pohled na píky tetrachlorozlatitanu při opakovatelnosti měření 37
Obr. 16 - Sloupcový graf ploch píků při opakovatelnosti měření 37

Seznam tabulek

Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti zlata a jeho umístění v periodické soustavě prvků 23
Tabulka 2: Přehled analytických metod kvantifikace zlata 24
Tabulka 3: Přehled použitých chemikálií 25
Tabulka 4: Plochy píků a vypočtené hodnoty SD a RSD 38