

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Lebertová

ANALÝZA TETRACHLOROZLATITANU KAPILÁRNÍ  
ELEKTROFORÉZOU

Analysis of potassium tetrachloroaurate by capillary  
electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.  
Konzultant bakalářské práce: Prof. RNDr. Pavel Coufal, 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 vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. 8. 2021

Lucie Lebertová

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za odborné vedení práce, za ochotu, vstřícnost a trpělivost při jejím vytváření. Zároveň bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Pavlovi Coufalovi, Ph.D. za konzultace, cenné rady a pomoc při řešení problémů v průběhu měření bakalářské práce.

## Abstrakt

V této bakalářské práci je popsána optimalizace podmínek analýzy tetrachlorozlatitanu draselného metodou kapilární zónové elektroforézy se spektrofotometrickou detekcí.

V teoretické části je nejdříve uveden princip kapilární elektroforézy. Dále jsou uvedeny základní informace o zlatu a jeho sloučenině tetrachlorozlatitanu.

V experimentální části je popsán postup optimalizace složení základního elektrolytu a problémy s nestabilitou základní linie. Jako nejvhodnější podmínky pro analýzu tetrachlorozlatitanu byly zvoleny tyto experimentální podmínky: křemenná kapilára o celkové délce 80 cm, efektivní délce 71,6 cm a průměru 50  $\mu\text{m}$ , vložené separační napětí -20 kV se současně aplikovaným tlakem 20 mbar, dávkování tlakem 20 mbar po dobu 20 sec, základní elektrolyt, který obsahoval 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,04 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl a detekce, která byla prováděna při 230 nm. Následně byla za optimalizovaných podmínek ověřena opakovatelnost měření, stabilita zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu, změřena kalibrační závislost a určeny mez detekce a mez stanovitelnosti pro zvolené experimentální podmínky. Určená hodnota LOD byla  $7,49 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  a určená hodnota LOQ byla  $2,49 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ .

### Klíčová slova:

Kapilární zónová elektroforéza, tetrachlorozlatitan draselný

## Abstract

This bachelor thesis describes the optimization of condition for the analysis of potassium tetrachloroaurate by capillary zone electrophoresis with spectrophotometric detection.

The theoretical part at first introduces the principle of capillary electrophoresis. The following are basic information about gold and its tetrachloroaurate compound.

The experimental part at first describes the procedure of optimization the composition of the basic electrolyte and problems with the instability of the base line. As the most suitable conditions for the analysis of tetrachloroaurate, have been chosen the subsequent experimental conditions: fused silica capillary with a total length of 80 cm, effective length 71.6 cm and inner diameter 50  $\mu\text{m}$ ; applied separation voltage -20 kV; applied pressure during analysis 20 mbar; injection with 20 mbar for 20 s; background electrolyte containing 0.01 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl and 0.04 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl; detection wavelength at 230 nm. Subsequently, the repeatability of the measurement, and the stability of the tetrachloroaurate stock solution were evaluated. Also the calibration dependence were measured and the limit of detection and the limit of quantification were determined for the optimized experimental conditions. The value of LOD was  $7.49 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  and the value of LOQ was  $2.49 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ .

### Keywords:

Capillary zone electrophoresis, potassium tetrachloroaurate

## Obsah

|       |   |        |
|-------|---|--------|
| 1.    | Teoretická část .....   | - 9 -  |
| 1.1   | Kapilární elektroforéza .....                                     | - 9 -  |
| 1.1.1 | Kapilární zónová elektroforéza .....                              | - 9 -  |
| 1.2   | Elektroforetická pohyblivost .....                                | - 10 - |
| 1.3   | Elektroosmotický tok .....  | - 11 - |
| 1.4   | Instrumentace CZE .....   | - 12 - |
| 1.5   | Zlato .....   | - 13 - |
| 1.5.1 | Tetrachlorozlatitan draselný .....                                | - 15 - |
| 2.    | Cíl práce .....   | - 17 - |
| 3.    | Experimentální část .....   | - 18 - |
| 3.1   | Použité přístroje .....   | - 18 - |
| 3.2   | Použité chemikálie .....  | - 18 - |
| 3.3   | Příprava základního elektrolytu a standardu .....                 | - 18 - |
| 3.4   | Separční podmínky .....   | - 19 - |
| 3.5   | Výpočty .....   | - 20 - |
| 4.    | Výsledky a diskuse .....  | - 21 - |
| 4.1   | Optimalizace separačních podmínek .....                           | - 21 - |
| 4.2   | Opakovatelnost metody .....                                       | - 26 - |
| 4.3   | Stabilita zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného ..... | - 28 - |
| 4.4   | Kalibrační závislosti .....                                       | - 29 - |
| 4.5   | Mez detekce a mez stanovitelnosti .....                           | - 30 - |
| 5.    | Závěr .....   | - 32 - |
| 6.    | Seznam literatury .....   | - 33 - |

## Seznam použitých zkratek a symbolů

|        |  |
|--------|--|
| AAS    | atomová absorpční spektrometrie ( <i>atomic absorption spectrometry</i> )                                |
| $A_c$  | plocha píku korigovaná migračním časem analytu   |
| AES    | atomová emisní spektrometrie ( <i>atomic emission spectrometry</i> )                                     |
| AuNP   | nanočástice zlata  |
| BGE    | základní elektrolyt ( <i>background electrolyte</i> )  |
| CE     | kapilární elektroforéza ( <i>capillary electrophoresis</i> )   |
| CGE    | kapilární gelová elektroforéza ( <i>capillary gel electrophoresis</i> )                                  |
| CIEF   | kapilární izoelektrická fokusace ( <i>capillary isoelectric focusing</i> )                               |
| CITP   | kapilární izotachoforéza ( <i>capillary isotachopheresis</i> )   |
| CZE    | kapilární zónová elektroforéza ( <i>capillary zone electrophoresis</i> )                                 |
| DAD    | detektor s diodovým polem ( <i>diode array detector</i> )  |
| DNA    | deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleotic acid</i> )  |
| $E$    | intenzita elektrického pole  |
| EOF    | elektroosmotický tok ( <i>electroosmotic flow</i> )  |
| ETAAS  | elektrotermická atomová absorpční spektrometrie ( <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i> ) |
| ETV    | elektrotermická vaporizace ( <i>electrothermal vaporization</i> )  |
| $F$    | elektrostatická síla   |
| $F'$   | třecí síla   |
| FAAS   | plamenová atomová absorpční spektrometrie ( <i>flame atomic absorption spectrometry</i> )                |
| HDC    | hydrodynamická chromatografie ( <i>hydrodynamic chromatography</i> )                                     |
| $h_n$  | šum základní linie   |
| ICP-MS | hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem  |
| $k_n$  | tabelovaný koeficient pro $n$ měření   |
| $L_c$  | délka kapiláry   |
| LC     | kapalinová chromatografie ( <i>liquid chromatography</i> )   |
| LIF    | laserem indukovaná fluorescence ( <i>laser induced fluorescence</i> )                                    |
| LOD    | mez detekce ( <i>limit of detection</i> )  |
| LOQ    | mez stanovitelnosti ( <i>limit of quantification</i> )   |

|               |   |
|---------------|---|
| $m$           | směrnice kalibrační křivky  |
| MECC          | micelární elektrokinetická kapilární chromatografie ( <i>micellar electrokinetic capillary chromatography</i> ) |
| $q$           | náboj iontu   |
| $Q_n$         | kritérium   |
| $R$           | rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty $x$ )  |
| $r$           | poloměr částice   |
| RSD           | relativní směrodatná odchylka ( <i>standard deviation</i> )   |
| SD            | směrodatná odchylka ( <i>relative standard deviation</i> )  |
| $t_m$         | migrační čas  |
| $U$           | napětí  |
| $\mu_{ef,i}$  | elektroforetická pohyblivost iontu  |
| $v_{ef,i}$    | migrační rychlost iontu   |
| $\eta$        | viskozita prostředí   |
| $\zeta$       | zeta potenciál  |
| $\varepsilon$ | dielektrická konstanta  |



## **1. Teoretická část**

### **1.1 Kapilární elektroforéza**

Kapilární elektroforéza je elektromigrační metoda, která se řadí mezi separační techniky. Na rozdíl od klasických chromatografických metod, kde analyty vykazují různou distribuci mezi stacionární a mobilní fází, dochází u kapilární elektroforézy k rozdělení analytů na základě jejich schopnosti se pohybovat ve vodivém roztoku při vloženém napětí, tzv. elektroforetické pohyblivosti, kdy kationty migrují k záporně nabitě elektrodě katodě a anionty ke kladně nabitě elektrodě anodě. Rychlost pohybu nabitých částic je úměrná velikosti jejich náboje a klesá s rostoucí hmotností částice. [1]

Jak už název napovídá, kapilární elektroforéza probíhá v separační kapiláře, avšak existuje i forma elektroforézy, která probíhá na deskovém gelu tzv. gelová elektroforéza. Gelová elektroforéza je důležitou technikou využívanou v biochemii např. pro sekvenování DNA.[1] Kapilární elektroforéza může existovat v různých uspořádáních, podle použitého separačního elektrolytu a samotného mechanismu separace, například: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární izotachoforéza (CITP) [2].

#### **1.1.1 Kapilární zónová elektroforéza**

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší a nejpoužívanější elektromigrační metoda, která umožňuje separaci malých molekul, iontů a biologických materiálů (např. peptidů, proteinů) [3]. Při CZE se používá křemenná kapilára naplněná pouze základním elektrolytem. Separace analytů je založena na rozdílných elektroforetických pohyblivostech. Analyty jsou současně také unášeny elektroosmotickým tokem směrem k detektoru. Je-li na detektorovém konci katoda, doputují k ní jako první kationty, poté neutrální látky a nakonec anionty, které jsou zpožděny migrací k anodě na vstupním konci kapiláry. Neutrální látky k elektrodám nemigrují, pouze jsou unášeny elektroosmotickým tokem. [4]

## 1.2 Elektroforetická pohyblivost

V přítomnosti konstantního elektrického pole je nabitá částice, která je obsažena v separačním elektrolytu v kapiláře, vystavena působení elektrostatické síly  $F$ , kterou lze vyjádřit vztahem:

$$F = q \cdot E \quad (1.1)$$

kde  $q$  je náboj iontu a  $E$  intenzita elektrického pole, která je dána celkovou délkou kapiláry  $L_c$  a napětím  $U$ , které je vloženo na elektrody:

$$E = U/L_c \quad (1.2)$$

Proti síle  $F$ , působí třecí síla  $F'$ , která je dána Stokesovým zákonem:

$$F' = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ef,i} \quad (1.3)$$

kde  $\eta$  je viskozita prostředí,  $r$  je poloměr částice a  $v_i$  je rychlost částice.

V stacionárním stavu, tj. když  $F = F'$ , se nabitě částice pohybují stálou rychlostí. Lze kombinovat rovnice 1.1 a 1.3:

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ef,i} \quad (1.4)$$

a z této kombinace může být následovně vyjádřena migrační rychlost iontu:

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i} \cdot E \quad (1.5)$$

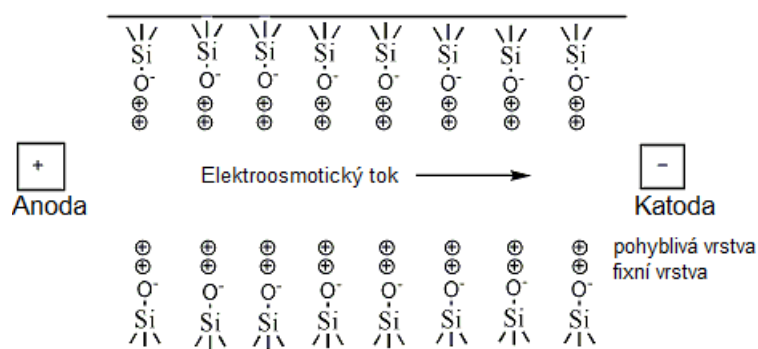
kde  $\mu_{ef,i}$  je elektroforetická pohyblivost iontu, která je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku:

$$\mu_{ef,i} = q_i / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i) \quad (1.6)$$

Elektroforetická pohyblivost závisí na velikosti a náboji iontu, na teplotě, na povaze a koncentraci elektrolytu. V důsledku toho se každý druh iontu pohybuje určitou elektroforetickou rychlostí. [5]

### 1.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok je hlavní tok kapaliny v kapiláře, který vzniká při vložení napětí a následném vytvoření elektrického pole. Kapilára musí být naplněná vhodným elektrolytem. Na vnitřní stěně křemenné kapiláry se nacházejí silanolové skupiny (Si-OH), které při určitém pH podléhají disociaci za vzniku aniontů těchto skupin (Si-O<sup>-</sup>) a tím je vytvořen záporný náboj na vnitřní stěně kapiláry. Uvolněné protony jsou hydratovány a následně přitahovány k záporně nabitě stěně, čímž vzniká stabilní elektrická dvojvrstva. Elektrická dvojvrstva je tvořena difuzní (pohyblivou) vrstvou a fixní vrstvou, která je blíže ke stěně kapiláry. Pokud je na elektrody vloženo napětí, dochází k pohybu hydratovaných protonů z difuzní vrstvy směrem k záporně nabitě elektrodě a tím také k pohybu veškeré kapaliny přítomné v kapiláře směrem k záporně nabitě elektrodě katodě.[2][6] Vznik a průběh elektroosmotického toku je schematicky znázorněn na obrázku 1.



**Obrázek 1: Elektroosmotický tok uvnitř křemenné separační kapiláry.** Převzato z citace [7] a upraveno.

Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit vztahem:

$$\mu_{\text{EOF}} = (\zeta \cdot \varepsilon) / \eta \quad (1.7)$$

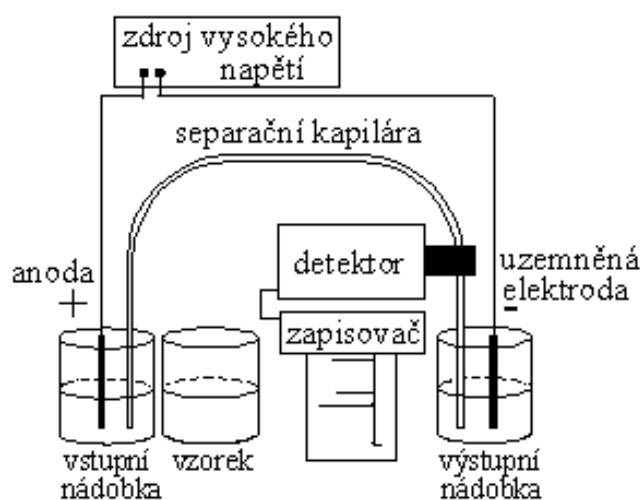
kde  $\zeta$  je zeta potenciál,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta a  $\eta$  je viskozita prostředí.

Potenciál zeta je určen nábojem na vnitřním povrchu kapilární stěny. Náboj na vnitřní stěně kapiláry je dán stupněm disociace silanolových skupin, který závisí na pH roztoku obsaženém v separační kapiláře, na tomto pH taktéž silně závisí i velikost elektroosmotického toku. Při vysokém pH jsou silanolové skupiny plně disociovány a EOF je nejsilnější, naopak při nižších hodnotách pH je disociována jen malá část silanolových skupin a EOF je nestabilní. [8]

Při výrazném snížení pH základního elektrolytu ( $\text{pH} < 2$ ) dochází k potlačení EOF a analyty se separují jen na základě jejich elektroforetických pohyblivostí. V takové situaci nemohou být detekovány neutrální molekuly, protože všechny neutrální látky se pohybují jen rychlostí EOF. Pokud jsou na vnitřní stěně kapiláry obsaženy pouze silanolové skupiny je EOF směřován od anodického konce ke katodickému konci kapiláry. Přídavkem vhodné látky do roztoku základního elektrolytu např. alkylamoniové soli, dojde ke změně náboje vnitřní stěny kapiláry a EOF je obrácen. Obecně lze elektroosmotický tok regulovat změnou několika experimentálních podmínek, mezi které patří pH základního elektrolytu (jak už bylo řečeno pH ovlivňuje disociaci silanolových skupin), iontová síla (ovlivňující zeta potenciál), organická rozpouštědla (působící, jak na zeta potenciál, tak na viskozitu roztoku elektrolytu) a různé přísady jako např. povrchově aktivní látky nebo polyakrylamid. [1][4]

#### 1.4 Instrumentace CZE

Schématické uspořádání přístroje pro CZE je zobrazeno na obrázku 2. Přístroj obsahuje separační kapiláru, která je naplněna základním elektrolytem. Dále je přítomna soustava dvou elektrod, na které je vkládáno stejnosměrné napětí v rozsahu od -30 až 30 kV. Konce kapiláry bývají ponořeny ve vstupní a výstupní nádobě, ve kterých je obsažen základní elektrolyt. Analyzovaný vzorek se dává z vlastní nádoby pro vzorek. Přístroj obsahuje vhodný detektor napojený na registrační zařízení, v současné době na počítač s ovládacím a vyhodnocovacím softwarem.



Obrázek 2: Schéma přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu. Převzato z citace [2]

V CZE probíhají separace nejčastěji v křemenné kapiláře. Křemen je nejpoužívanější materiál pro výrobu kapilár hlavně proto, že je chemicky a elektricky inertní a také umožňuje transparentnost pro UV-VIS záření. [3] Křemenné kapiláry jsou velice křehké, proto bývají pokryty vnější vrstvičkou polyimidu, který kapiláře dodává pružnost a zajišťuje lepší manipulaci s kapilárou. V místě detekce (tzv. detekčním okénku) je vrstvička polyimidu odstraněna. Obvyklá délka kapiláry je 25-100 cm s vnitřním průměrem nejčastěji 25-75  $\mu\text{m}$ . [6]

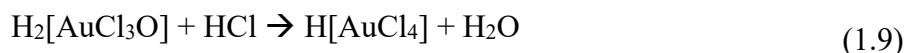
Dávkování vzorku probíhá z nádoby se vzorkem, kdy je vzorek nadávkován na začátek separační kapiláry. Dávkování lze provádět několika způsoby např. dávkování rozdílem hladin, elektrokinetické dávkování nebo dávkování tlakem (tzv. hydrodynamické dávkování). Hydrodynamické dávkování je v CZE nejpoužívanější a je provedeno zvýšením tlaku nad roztokem vzorku, nejčastěji je dávkováno tlakem 20 až 100 mbar po dobu 0,5 až 20 s. [9]

Detekce v CZE je ovlivněna velikostí kapiláry, jelikož se používají kapiláry malých rozměrů, tak použitý detektor musí být velmi citlivý. Nejběžnější používaná detekce v CZE je detekce fotometrická, která je založena na absorpci záření v UV-VIS oblasti. Nejcitlivější detektor používaný v CZE je fluorescenční, zejména pak detektor s laserově indukovanou fluorescencí (*Laser induced fluorescence, LIF*), nevýhodou tohoto detektoru je jeho vysoká cena. Další typy detektorů v CZE jsou například amperometrický detektor, vodivostní detektor, detektor s diodovým polem, a nebo hmotnostní spektrometr.[6][3] Záznam z odezvy detektoru na časovém průběhu se nazývá elektroferogram. Na elektroferogramu poskytuje analyzovaný vzorek pík neboli zónu, ze které lze zjistit kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Kvantitativní informace se získá z plochy píku, kdy je plocha píku přímo úměrná množství analytu v zóně. Kvalitativní informace je charakterizována migračním časem analytu. [8]

## 1.5 Zlato

Zlato je prvek 6. periody, skupiny I.B. Je řazeno mezi přechodné kovy s elektronovou konfigurací  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$ . Zlato je vysoce odolné vůči vzdušnému kyslíku, proto se řadí mezi ušlechtilé kovy. Nejstabilnější oxidační stav, který zaujímá zlato ve sloučeninách, je +III, může však také existovat v oxidačním stavu +I a méně často v oxidačním stavu +V. Vazby přítomné ve sloučeninách zlata s oxidačním stavem +I a +III jsou převážně kovalentní. Koordinační číslo pro  $\text{Au}^{+I}$  je obvykle dvě a pro  $\text{Au}^{+III}$  čtyři až šest. [10]

Zlato v oxidačním stavu +III se nachází např. v chloridu zlatitém, který může reagovat s vodou za vzniku červenohnědého roztoku komplexní kyseliny. S kyselinou chlorovodíkovou běží reakce dál za vzniku zlatožlutého roztoku kyseliny tetrachlorozlatité. Kyselinu tetrachlorozlatitou lze připravit taktéž rozpouštěním zlata v lučavce královské. [11]



Zlato v kovovém stavu ( $\text{Au}^0$ ) vykazuje nízkou reaktivitu s kyslíkem, sírou nebo koncentrovanými kyselinami a zásadami, díky tomu lze zlato použít v lékařství např. jako zubní protézy nebo zubní implantáty. Zlato snadno reaguje s halogeny. Díky specifické reakci zlata s vysoce kyselým roztokem, který obsahuje chloridové anionty, dochází k rozpuštění zlata a vzniku roztoku kyseliny tetrachlorozlatité. Popsanou reakcí vzniká biologicky aktivní roztok zlata, který je možné využít v lékařství např. při léčbě revmatoidní artritidy nebo různých druhů rakoviny. Kyselina tetrachlorozlatitá v přítomnosti silného redukčního činidla má schopnost tvořit nanočástice zlata ( $\text{AuNP}$ ,  $\text{Au}^0$ ), které lze také využít pro různé biomedicínské účely. [12]

Zlato ať už v jeho iontové podobě nebo ve formě nanočástic lze kvantifikovat různými metodami. Nejjednodušší z metod kvantifikace zlata je spektrofotometrie ve viditelné oblasti, hlavní nevýhodou této metody je její nízká citlivost. Ostatní metody pro kvantifikaci zlata jsou velmi citlivé a specifické, ale vyžadují speciální uspořádání přístroje, například jsou to metody: hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), atomová absorpční spektrometrie (AAS) nebo atomová emisní spektrometrie (AES). Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je referenční metoda, avšak vykazuje řadu nevýhod, například nemá dostatečnou reprodukovatelnost výsledků získaných v biologických médiích. ICP-MS může být navíc ještě spojena se separačními metodami, jako je kapalinová chromatografie (LC-ICP-MS) nebo kapilární elektroforéza (CE-ICP-MS). [12] V tabulce 1 jsou uvedeny metody stanovení zlata.

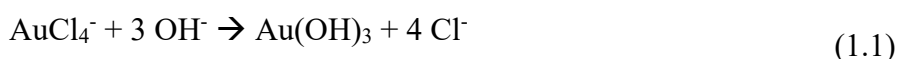
**Tabulka 1:** Přehled metod pro stanovení zlata (iontová podoba, AuNP) a mez detekce (LOD) pro danou metodu. Převzato z citace [12]

| Metoda            | LOD ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) | Aplikace / médium                        |
|-------------------|---------------------------------|--|
| Spektrofotometrie | 90,00                           | AuNP ve vodném médiu                     |
| Fluorimetrie      | $1,52 \cdot 10^{-2}$            | Zlatá sůl ve vodovodní nebo jezerní vodě |
| LA-ICP-MS         | 0,14                            | AuNP v buňkách                           |
| LC-ICP-MS         | $2,60 \cdot 10^{-4}$            |  |
| CE-ICP-MS         | $5,00 \cdot 10^{-2}$            | AuNP v lidském séru                      |
| HDC-ICP           | $1,10 \cdot 10^{-5}$            | AuNP ve vodném médiu                     |
| AAS               | 0,61                            | Zlatá sůl ve vodě a půdě                 |
| FAAS              | $9,20 \cdot 10^{-3}$            |  |
| ETAAS             | $4,30 \cdot 10^{-5}$            |  |
| ETV-ICP-AES       | $3,80 \cdot 10^{-2}$            |  |

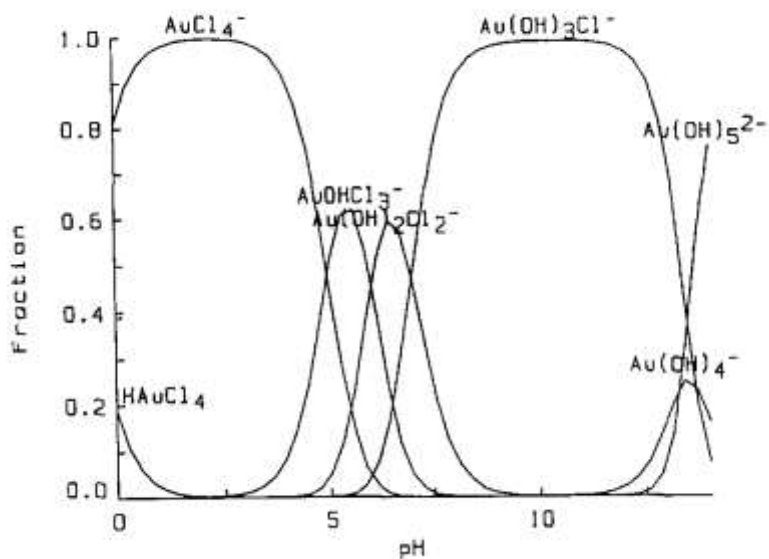
AAS: atomová absorpční spektrometrie, AES: atomová emisní spektrometrie, CE kapilární zonová elektroforéza, ETAAS: elektrotermická atomová absorpční spektrometrie, ETV: elektrotermická vaporizace, FAAS: plamenová atomová spektrometrie, HDC: hydrodynamická chromatografie, ICP: indukčně vázaná plazma, LA: laserová ablace, LC: kapalinová chromatografie, LOD: mez detekce, MS: hmotnostní spektrometrie

### 1.5.1 Tetrachlorozlatitan draselný

Tetrachlorozlatitan draselný  $\text{K}[\text{AuCl}_4]$  se používá při syntéze nanočástic zlata [13]. Reakcí roztoku tetrachlorozlatitanu s alkalickým hydroxidem lze získat žlutohnědou sraženinu hydroxidu zlatitého [11].



Tetrachlorozlatitan v závislosti na pH a koncentraci chloridových iontů tvoří smíšené chloridové a hydroxidové komplexy. Stabilita komplexu  $[\text{AuCl}_4]^-$  závisí na pH, na obrázku 3 je zobrazen distribuční diagram tetrachlorozlatitanu a příslušných hydroxokomplexů. Z diagramu lze vyčíst, že komplex tetrachlorozlatitanu je možné separovat pouze v kyselém prostředí (pH 2-3), protože při zvyšujícím se pH dochází k náhradě chloridového aniontu za aniont hydroxidový, přičemž vznikají různé hydroxidové komplexy, kde nejstálější je komplex  $\text{Au}(\text{OH})_3\text{Cl}^-$  při pH 10.



Obrázek 3: Distribuční diagram tetrachlorozlatitanu, závislost na pH. Převzato z citace [14]

Téměř jediná publikace, která se zabývá analýzou tetrachlorozlatitanu metodou kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí je uvedena autory Baraj et al. [14] v Journal of Chromatography A. K analýze tetrachlorozlatitanu metodou CZE autoři použili tyto experimentální podmínky: kapiláru o celkové délce 70 cm (efektivní délce 50 cm) s průměrem 50  $\mu\text{m}$ ; vložené separační napětí -7 kV; detekční vlnovou délku 220 nm a základní elektrolyt obsahující 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,4 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl.

Autoři zjistili, že při jejich experimentálních podmínkách je nejlepší analyzovat roztok tetrachlorozlatitanu s 10% podílem základního elektrolytu, při tomto podílu BGE v roztoku vzorku získali pík o nejvyšší intenzitě.



## **2. Cíl práce**

Cílem práce je optimalizace metody kapilární elektroforézy se spektrofotometrickou detekcí pro analýzu tetrachlorozlatitanu draselného.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité přístroje

- HD<sup>3D</sup> Capillary Electrophoresis s UV-Vis detektorem s diodovým polem (Agilent Technologies, Německo)
- Analytické váhy ADAM Nimbus (Velká Británie)
- Pipety 1-10  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$

#### Software pro zpracování a interpretaci dat

- MS Office Excel (Microsoft, USA)
- MS Office Word (Microsoft, USA)
- Agilent 3D-CE ChemStation (Agilent Technologies, Německo)

#### 3.2 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda Millipore 0,18  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a (LachNer)  $M_r = 36,46 \text{ g mol}^{-1}$
- Chlorid sodný p.a (LachNer, Česká republika)  $M_r = 58,44 \text{ g mol}^{-1}$
- Tetrachlorozatitan draselný 99,995 % (Sigma Aldrich)  $M_r = 377,88 \text{ g mol}^{-1}$

#### 3.3 Příprava základního elektrolytu a standardu

##### *Roztok NaCl*

Byl připraven roztok chloridu sodného o koncentraci 0,8  $\text{mol dm}^{-3}$ . Navážka 2,338 g chloridu sodného byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky a rozpuštěna v deionizované vodě. Po důkladném rozpuštění byl tento roztok přefiltrován přes membránový filtr Millipore Millex-LCR 0,45 $\mu\text{m}$ . Roztok byl skladován v lednici při teplotě 6-8  $^{\circ}\text{C}$ .

##### *Roztok HCl*

Byl připraven roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,2  $\text{mol dm}^{-3}$ . Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo pipetováno 0,8828 ml 35% HCl a odměrná baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Po důkladném promíchání byl roztok kyseliny chlorovodíkové přefiltrován přes membránový filtr Millipore Millex-LCR 0,45 $\mu\text{m}$ . Roztok byl skladován v lednici při teplotě 6-8  $^{\circ}\text{C}$ .

Základní elektrolyt používaný při analýzách byl připravován ředěním zásobních roztoků kyseliny chlorovodíkové a chloridu sodného na výsledné koncentrace  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl.

#### *Roztok standardu tetrachlorozlatitanu draselného*

Byl připraven zásobní roztok tetrachlorozatitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Navážka 0,01889 g  $\text{K}[\text{AuCl}_4]$  byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky a rozpuštěna v deionizované vodě. Roztok byl uchovávan v lednici při teplotě 6-8°C. Pracovní roztoky tetrachlorozlatitanu o koncentracích používaných při analýzách byly získány ředěním zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného.

### **3.4 Separační podmínky**

Měření byla prováděna na přístroji HP<sup>3D</sup> CE (Agilent Technologies, Německo) za použití UV-VIS detektoru s diodovým polem (DAD) v rozsahu vlnových délek 190-600 nm. Tetrachlorozlatitan draselný byl detekován při vlnové délce 230 nm. Pro vlastní analýzu vzorku byla použita křemenná kapilára pokrytá vnější vrstvou polyimidu s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , celkovou délkou 80 cm a efektivní délkou 71,6 cm. Kapilára byla temperována na 25 °C. Vložené napětí při separaci bylo -20 kV, současně s ním byl aplikován tlak 20 mbar. Základní elektrolyt obsahoval  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl. Vzorky tetrachlorozlatitanu draselného byly připravovány s 20% podílem základního elektrolytu.

Vždy před první analýzou byla kapilára promyta základním elektrolytem po dobu 40 min, poté bylo vloženo separační napětí po dobu 2-3 min pro stabilizaci podmínek v kapiláře. Během měření byly vždy po třech analýzách vyměněny vialky se základním elektrolytem. Po skončení měření byla kapilára promyta 10 min základním elektrolytem a konce kapiláry byly přes noc uchovávané ve vialkách s BGE. Mezi měřeními byla kapilára promývána 4 min BGE. Dávkování vzorku bylo prováděno tlakem 20 mbar po dobu 20 sec.

### 3.5 Výpočty

**Mez detekce** (LOD, limit of detection) odpovídá koncentraci látky, při které se signál statisticky významně liší od šumu a vypočítá se ze vztahu:

$$LOD = 3 \cdot h_n / m \quad (3.1)$$

kde  $m$  je směrnice kalibrační křivky (pro výšku píku) a  $h_n$  šum základní linie.

**Mez stanovitelnosti** (LOQ, limit of quantification) je množství analytu, které lze s definovanou přesností stanovit a vypočítá se ze vztahu:

$$LOQ = 10 \cdot h_n / m \quad (3.2)$$

kde  $m$  je směrnice kalibrační křivky (pro výšku píku) a  $h_n$  šum základní linie.

LOD a LOQ byly navíc počítány z regresní statistiky. Při tomto způsobu výpočtu LOD a LOQ byly použity upravené vztahy (3.1) a (3.2), kde místo hodnoty výšky šumu byla dosazena chyba střední hodnoty z regresní statistiky lineární kalibrační závislosti a na místo směrnice kalibrační křivky pro výšku píku byla dosazena směrnice kalibrační křivky pro korigovanou plochu píku.

**Směrodatná odchylka** (SD) pro menší počet stanovení ( $n < 7$ ) se vypočítá podle vztahu:

$$s = k_n \cdot R \quad (3.3)$$

kde  $k_n$  je tabelovaný koeficient pro  $n$  měření a  $R$  je rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty  $x$ ).

**Relativní směrodatná odchylka** (RSD) vztahuje přesnost měření k velikosti střední hodnoty (k mediánu nebo aritmetickému průměru) a vypočítá se podle vztahu:

$$s_r = 100 \cdot (s / \tilde{x}) \quad (3.4)$$

$$s_r = 100 \cdot (s / \bar{x}) \quad (3.5)$$

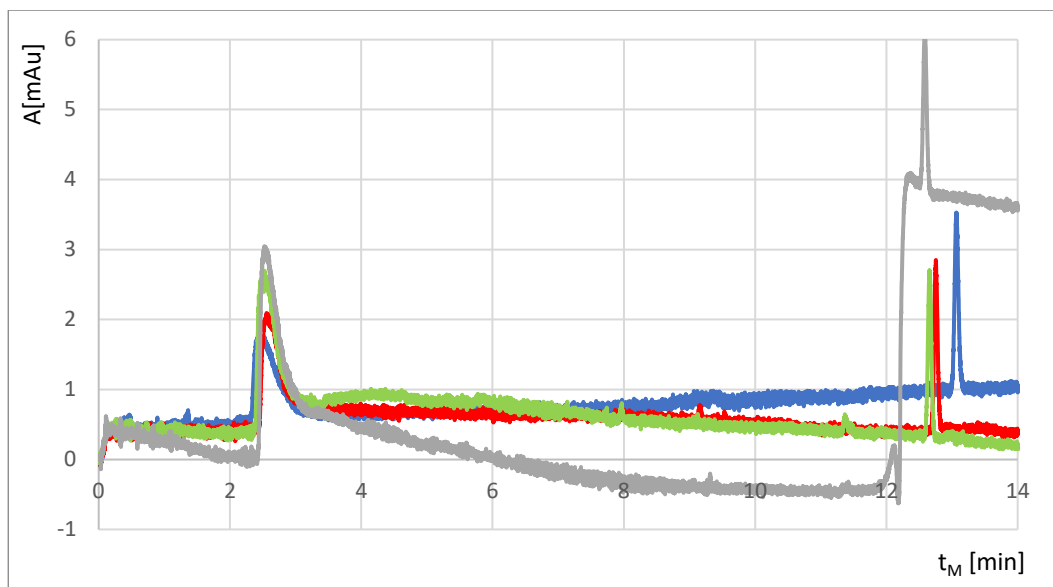
kde  $s$  je směrodatná odchylka,  $\tilde{x}$  je aritmetický průměr a  $\bar{x}$  je medián. RSD je vyjadřována v procentech.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Optimalizace separačních podmínek

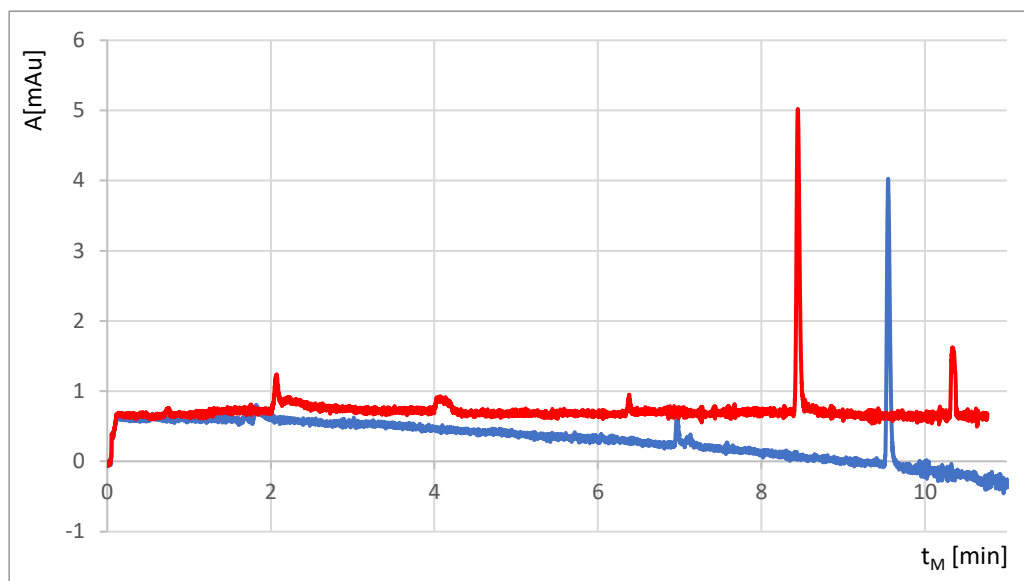
Při vývoji elektroforetické metody pro analýzu tetrachlorozlatitanu byly využity informace publikované v článku [14]. Autoři zde pracují v křemenné kapiláře o celkové délce 70 cm (k detektoru 50 cm) a průměru 50  $\mu\text{m}$  s vloženým napětím -7 kV a se základním elektrolytem, který obsahoval 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,4 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl. Při vyzkoušení elektrolytu o tomto složení byl v našem experimentálním uspořádání (kapilára 80/71,6 cm, 50  $\mu\text{m}$ ) naměřen příliš velký procházející proud, což by vedlo ke generaci Joulova tepla a kapalina v kapiláře by se zahřívala. Proto byl použit základní elektrolyt o složení 0,005 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl, který umožnil aplikaci separačního napětí -16 kV. Za těchto podmínek byla provedena optimalizace rozpouštědla vzorku.

Při vývoji elektroforetické metody byla provedena optimalizace rozpouštědla vzorku, která je zobrazena na obrázku 4. Byly provedeny analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  s různými podíly základního elektrolytu ve vzorku. Na obrázku 4 modrý elektroferogram odpovídá roztoku tetrachlorozlatitanu ředěného pouze deionizovanou vodou, červený elektroferogram odpovídá roztoku tetrachlorozlatitanu s 10% podílem BGE, zelený elektroferogram odpovídá roztoku tetrachlorozlatitanu s 30% podílem BGE a šedý elektroferogram odpovídá roztoku tetrachlorozlatitanu s 60% BGE. Při analýze roztoku tetrachlorozlatitanu s 60% podílem BGE se vždy na elektroferogramu zobrazil nežádoucí skok na základní linii. U analýz roztoku tetrachlorozlatitanu s vodou, s 10% podílem BGE a s 30% podílem BGE byly srovnatelné velikosti ploch (9,1; 9,0 a 8,8 mAUs), výšek píků (2,46; 2,48 a 2,40 mAU) i symetrie píků (1,056; 1,105 a 1,057). Analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu s 10% a s 30% podílem elektrolytu byly rychlejší než analýza roztoku tetrachlorozlatitanu bez podílu BGE. Pro další analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu byl zvolen 20% podíl základního elektrolytu.



**Obrázek 4: Optimalizace rozpouštědla vzorku.** Analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a průměru  $50 \mu\text{m}$ ; dávkování vzorků tlakem 20 mbar po dobu 10 sec; detekční vlnová délka 220 nm; vložené separační napětí -16 kV; základní elektrolyt o složení  $0,005 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  a  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ . Modrý elektroferogram odpovídá analýze tetrachlorozlatitanu rozpuštěného pouze v deionizované vodě, červený elektroferogram odpovídá analýze tetrachlorozlatitanu s 10% podílem BGE, zelený elektroferogram odpovídá analýze tetrachlorozlatitanu s 30% podílem BGE a šedý elektroferogram odpovídá analýze tetrachlorozlatitanu s 60% podílem BGE.

Následně byl použit základní elektrolyt o desetkrát nižší koncentraci kyseliny chlorovodíkové a chloridu sodného oproti publikovanému článku [14], tedy  $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ . Po této úpravě koncentrace základního elektrolytu, systémem protékal nižší proud a bylo možné vložit separační napětí až -20 kV. Později byl do elektroforetické metody pro analýzu tetrachlorozlatitanu navíc přidán tlak, který byl aplikován současně s vloženým napětím. Na obrázku 5 je zobrazen modrý elektroferogram při aplikaci tlaku 5 mbar a červený elektroferogram při aplikaci tlaku 20 mbar. Aplikace tlaku měla pozitivní vliv na stabilitu základní linie a při aplikaci 20 mbar došlo navíc ke zrychlení analýzy. Pro další analýzy byl následně zvolen tlak 20 mbar.



**Obrázek 5: Aplikace tlaku při analýze.** Analýza roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a průměru 50  $\mu\text{m}$ ; dávkování vzorků tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; detekční vlnová délka 230 nm; vložené separační napětí -20 kV; základní elektrolyt o složení 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,04 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl. Modrý elektroferogram zobrazuje analýzu roztoku tetrachlorozlatitanu s aplikovaným tlakem 5 mbar. Červený elektroferogram zobrazuje analýzu roztoku tetrachlorozlatitanu s aplikovaným tlakem 20 mbar.

Snížením separačního napětí z -16 kV na -20 kV a vložením tlaku 20 mbar byla doba analýzy výrazně zkrácena a pík tetrachlorozlatitanu byl registrován kolem deváté minuty.

Tetrachlorozlatitan tvoří komplexy s chloridovými a hydroxidovými ionty v závislosti na pH a koncentraci chloridů [14]. Z obrázku 3 na straně 16 je zřejmé, že aby nedocházelo k hydrolyze tetrachlorozlatitanu musí být pH základního elektrolytu udržováno okolo hodnoty 2-3. To bylo docíleno použitím základního elektrolytu, který obsahoval kyselinu chlorovodíkovou o koncentraci 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Teoretické pH základního elektrolytu bylo tedy 2. Dalším důvodem, proč byla nutná přítomnost kyseliny v základním elektrolytu, bylo potlačení EOF. Díky kyselému prostředí byl elektroosmotický tok téměř nulový a aniont  $[\text{AuCl}_4]^-$  se pohyboval jen na základě své elektroforetické pohyblivosti směrem k anodě.

Roztoky tetrachlorozlatitanu byly při vývoji elektroforetické metody nejprve měřeny při 220 nm, při stejné detekční vlnové délce jako používali v publikaci [14]. Posledním krokem optimalizace experimentálních podmínek byla optimalizace detekční vlnové délky. Bylo proměřeno absorpční spektrum roztoku tetrachlorozlatitanu, které je zobrazeno na obrázku 6. Tetrachlorozlatitan vykazuje absorpční maximum při 230 nm, proto byla tato vlnová délka dále používána při detekci tetrachlorozlatitanu draselného. V tabulce 2 jsou shrnuty optimalizované experimentální podmínky.

**Tabulka 2:** Shrnutí optimalizované podmínky pro měření roztoku tetrachlorozlatitanu

|   |  |
|---|--|
| <b>Koncentrace základního elektrolytu</b> | 0,01 mol dm <sup>-3</sup> HCl a 0,04 mol dm <sup>-3</sup> NaCl                 |
| <b>Teplota</b>                            | 25 °C  |
| <b>Separáční napětí</b>                   | -20 kV   |
| <b>Vložený tlak</b>                       | 20 mbar  |
| <b>Dávkování (tlak, čas)</b>              | 20 mbar, 20 sec  |
| <b>Detekce</b>                            | UV při 230 nm  |
| <b>Kapilára</b>                           | Křemenn kapilára: celkové délka 80 cm, efektivní délka 71,6 cm, prměr 50 μm |

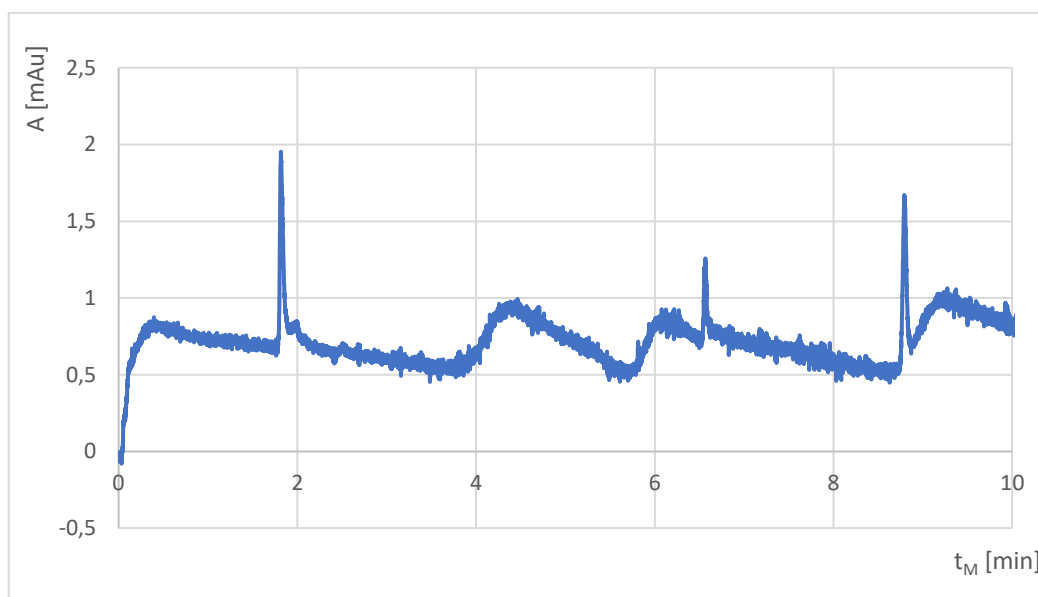


**Obrázek 6: Optimalizace detekční vlnov délky.** Absorpční spektrum tetrachlorozlatitanu s absorpčním maximem 230 nm. Měřeno během analýzy tetrachlorozlatitanu o koncentraci 5·10<sup>-5</sup> mol dm<sup>-3</sup> s 20% podilem elektrolytu; použit křemenn kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a prměru 50 μm; dávkování vzorku tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; vložené separační napětí -20 kV; aplikovan tlak 20 mbar; základní elektrolyt o složení 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl a 0,04 mol dm<sup>-3</sup> NaCl.

Během vývoje elektroforeticky metody byl problém se základní linií, na které byly zobrazovány neželdoucí jevy. V prbĕhu měření, pibližn po šesti analýzách, se na základní linii začaly objevovat pravideln nerovnosti (obrazek 7). Nejdříve byl tento problém řešen zařazenm promývacího kroku. Kapilára byla promyta po dobu 40 min základním elektrolytem, stejn jako na zaatku každého dne. Po promyt kapiláry se základní linie vžd ustálila, avšak tento problém, po změřen dalších několika analýz, dále přetrvával. Z tohoto důvodu byly z pstroje vyjmuty elektrody, které byly nsledn dkladn očišteny v ultrazvuku a vloženy zpět do pstroje. Ani tento čistící krok nepomohl

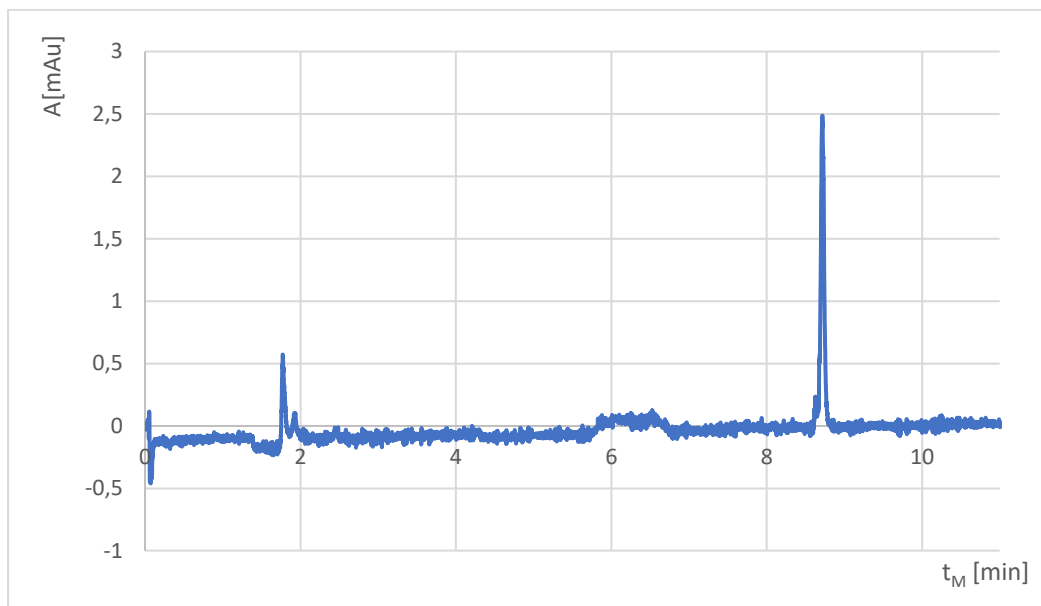


vyřešit problémy se stabilitou základní linie. Jako další řešení byla vyměněna deuteriová výbojka v detektoru.



**Obrázek 7: Elektroferogram analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu draselného ukazující problém s nestabilitou základní linie.**

Po výměně deuteriové výbojky byl problém s nestabilní základní linií vyřešen a na zaznamenaných elektroferogramech nebyly pozorovány žádné nerovnosti, které by ovlivňovaly vyhodnocení píku. Elektroferogram s normální základní linií je zobrazen na obrázku 8.



**Obrázek 8: Elektroferogram analýzy  $K[AuCl_4]$ .** Analýza roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a průměru  $50 \mu\text{m}$ ; dávkování vzorku tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; detekční vlnová délka 230 nm; vložené separační napětí -20 kV; aplikovaný tlak 20 mbar; základní elektrolyt o složení  $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

#### 4.2 Opakovatelnost metody

Pro určení opakovatelnosti metody bylo provedeno deset analýz roztoku tetrachlorozlatitanu draselného o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s 20% podílem základního elektrolytu. Byla sledována opakovatelnost ploch píků  $K[AuCl_4]$ . Pro přesnější hodnoty byly z ploch píků vypočteny korigované plochy.

Při detekci v CZE procházejí analyty detektorem různou rychlostí a jejich plocha závisí na délce pobytu v detekčním okénku. Analyty, které se pohybují rychleji, projdou detekčním okénkem dříve a poskytnou menší plochu než analyty pohybující se pomaleji. [15] Proto se plochy píků korigují migračním časem, podle vztahu:

$$A_c = A / t_M \quad (4.1)$$

kde  $A$  je plocha píku [mAU.s] a  $t_M$  je migrační čas [s].

Pro výpočet směrodatné odchylky SD a relativní směrodatné odchylky RSD migračních časů a ploch, respektive korigovaných ploch píků, byly použity vztahy (3.3) a (3.4). Hodnoty vypočítaných RSD pro migrační časy byly 1,26 %, pro plochy píků 12,12 %

a pro korigované plochy píků 12,59 %, jak je vidět z tabulky 3. Z korigovaných ploch v rámci jednotlivých opakovaných měření byl vytvořen graf, který je zobrazen na obrázku 9.

**Tabulka 3:** Opakovatelnost metody podle migračních časů  $t$  [min], podle ploch píků  $A$  [mAU.s] a podle korigovaných ploch  $A_c$  [mAU]

| Opakování         | Migrační čas<br>[min] | Opakování            | Plocha píku<br>[mAU.s] | Korigované plochy<br>[mAU] |
|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|
| 1                 | 8,87                  | 1                    | 7,38                   | $13,87 \cdot 10^{-3}$      |
| 2                 | 8,57                  | 2                    | 6,58                   | $12,79 \cdot 10^{-3}$      |
| 3                 | 8,82                  | 3                    | 7,47                   | $14,12 \cdot 10^{-3}$      |
| 4                 | 8,74                  | 4                    | 8,70                   | $16,59 \cdot 10^{-3}$      |
| 5                 | 8,72                  | 5                    | 7,97                   | $15,24 \cdot 10^{-3}$      |
| 6                 | 8,54                  | 6                    | 6,47                   | $12,63 \cdot 10^{-3}$      |
| 7                 | 8,88                  | 7                    | 5,95                   | $11,16 \cdot 10^{-3}$      |
| 8                 | 8,87                  | 8                    | 8,05                   | $15,13 \cdot 10^{-3}$      |
| 9                 | 8,88                  | 9                    | 7,93                   | $14,88 \cdot 10^{-3}$      |
| 10                | 8,86                  | 10                   | 7,25                   | $13,65 \cdot 10^{-3}$      |
| $\tilde{x}$ [min] | 8,78                  | $\tilde{x}$ [mAU .s] | 7,37                   | $14,01 \cdot 10^{-3}$      |
| SD [min]          | 0,11                  | SD [mAU .s]          | 0,89                   | $1,76 \cdot 10^{-3}$       |
| RSD [%]           | 1,26                  | RSD [%]              | 12,12                  | 12,59                      |

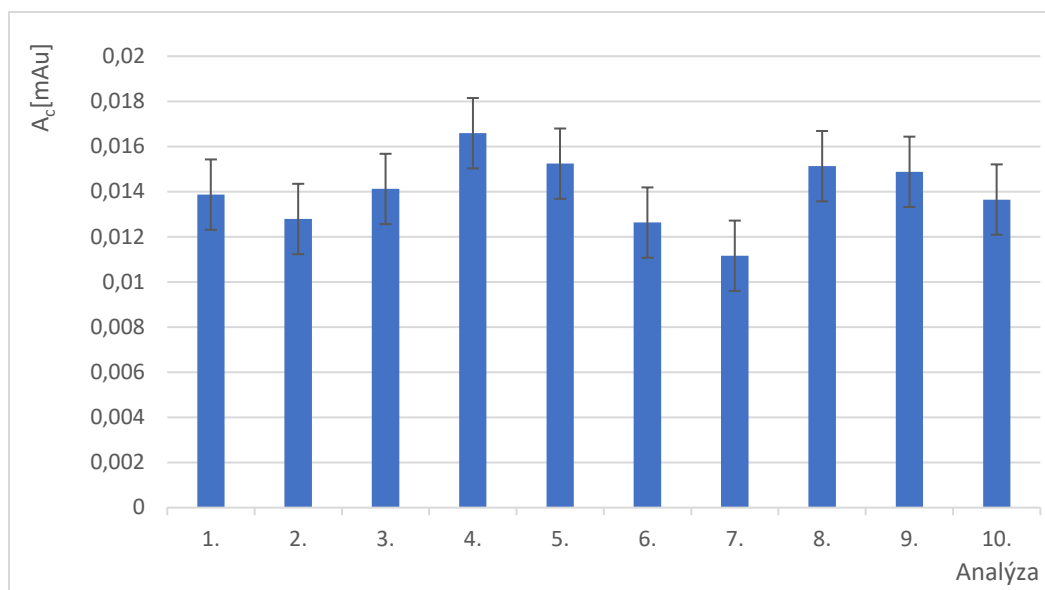
Kvůli vysoké variabilitě ploch píků byl proveden Deanův-Dixonův test odlehlosti, podle vztahu:

$$Q_n = (x_n - x_{n-1}) / R \quad (4.2)$$

kde  $Q_n$  je kritérium a  $R$  je rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty  $x$ ).

Hodnota  $Q_n$  byla porovnána s tabelovanou hodnotou  $Q_k$  pro daný počet výsledků  $n$  v souboru. Podle tohoto testu nebyl zjištěn ani vyloučen žádný odlehlý výsledek, který by byl zatížen hrubou chybou.

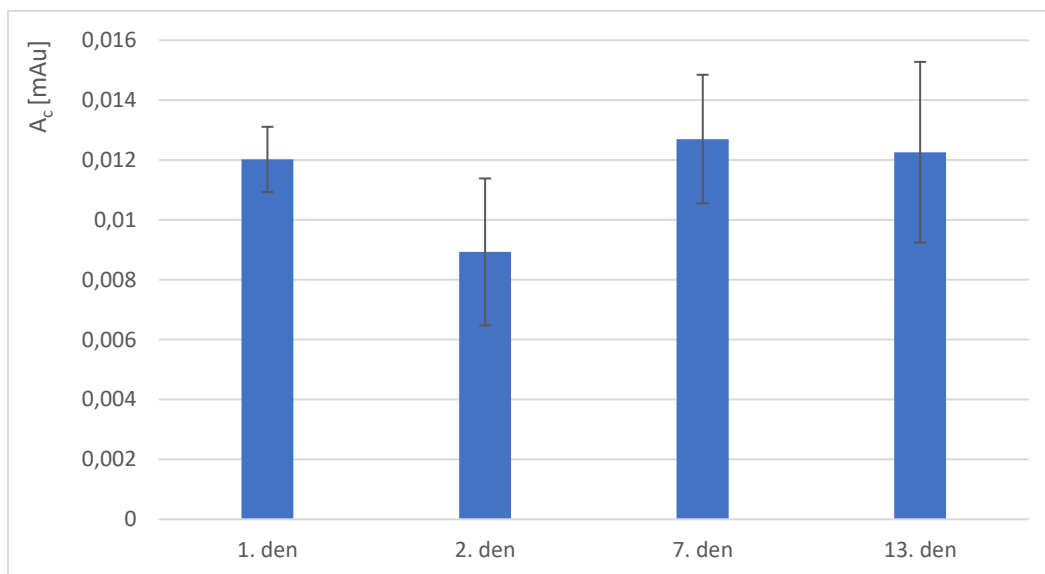
Variabilita naměřených ploch může být způsobena změnou složení základního elektrolytu během experimentu, kdy dochází ke změně jeho složení v důsledku elektrolýzy. Používaný základní elektrolyt neobsahuje pufr, je to směs kyseliny chlorovodíkové a chloridu sodného. Změna složení základního elektrolytu, především změna pH, následně může ovlivnit tvorbu hydroxokomplexů (viz obrázek 3, strana 16), které mohou odlišně absorbovat při zvolené detekční vlnové délce v porovnání s tetrachlorozlatitanem.



**Obrázek 9: Opakovatelnost metody podle korigovaných ploch píků.** Analýzy roztoku tetrachlorozlatitanu draselného o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm, efektivní délce 71,6 cm a průměru 50  $\mu\text{m}$ ; dávkování vzorků tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; detekční vlnová délka 230 nm; vložené separační napětí -20 kV; aplikovaný tlak 20 mbar; základní elektrolyt o složení 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl a 0,04 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl.

### 4.3 Stabilita zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného

V rozmezí dvou týdnů byla sledována stabilita zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu draselného. První den byl připraven zásobní roztok standardu  $\text{K}[\text{AuCl}_4]$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  v deionizované vodě. Tento zásobní roztok byl skladován v lednici při teplotě 6-8 °C. K samotné analýze byl zásobní roztok standardu naředěn na koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  s 20% podílem elektrolytu. Daný den bylo měření roztoku tetrachlorozlatitanu prováděno šestkrát a naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány. Získané plochy píků byly korigovány migračním časem a z těchto korigovaných hodnot byly vypočteny chybové úsečky. Následně byl vytvořen graf, který zobrazuje medián hodnoty korigované plochy v rámci jednotlivých dnů (obrázek 10).



**Obrázek 10: Stabilita  $K[AuCl_4]$  po dobu 13 dnů.** Analýza roztoku tetrachlorozlatitanu draselného o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm, efektivní délce 71,6 cm a průměru  $50 \mu\text{m}$ ; dávkování vzorku tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; detekční vlnová délka 230 nm; vložené separační napětí -20 kV; aplikovaný tlak 20 mbar; základní elektrolyt o složení  $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

Při sledování stability tetrachlorozlatitanu draselného byla pozorována jistá variabilita korigovaných ploch, ale při zohlednění chybových úseček lze prohlásit, že zásobní roztok tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , připravený v deionizované vodě a skladovaný v lednici při  $6-8 \text{ }^\circ\text{C}$ , je v rozmezí dvou týdnů stabilní.

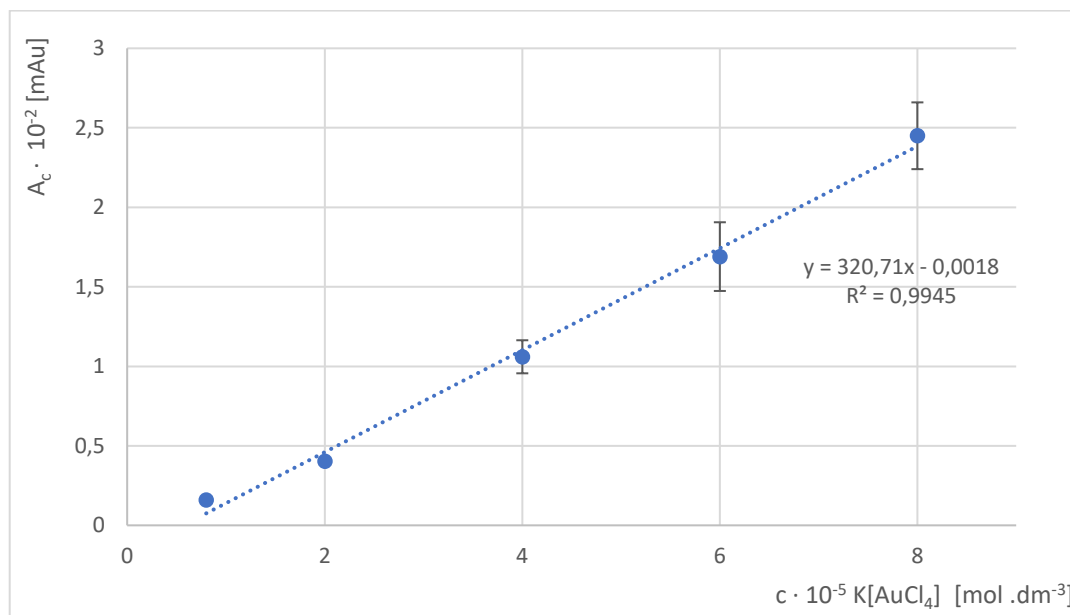
#### 4.4 Kalibrační závislosti

Analýzou pěti koncentračních hladin roztoku standardu tetrachlorozlatitanu draselného byla změřena kalibrační závislost. U každé koncentrační hladiny byla provedena tři opakovaná měření.

Naměřené hodnoty ploch byly statisticky vyhodnoceny a plochy píku byly korigovány podle vztahu (4.1). Výsledné hodnoty korigovaných ploch jsou uvedeny v tabulce 4. Dále byl sestaven kalibrační graf závislosti korigované plochy píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu v roztoku, který je zobrazen na obrázku 11. Jednotlivými body kalibrační závislosti byla proložena regresní přímka a byl vypočítán koeficient determinace. Rovnice regresní přímky společně s koeficientem determinace jsou uvedeny na obrázku 11. Koeficient determinace má hodnotu 0,9945, korigované plochy píku tetrachlorozlatitanu závisí lineárně na jeho koncentraci v měřeném rozsahu koncentrací.

**Tabulka 4:** Korigované plochy píků, směrodatná a relativní směrodatná odchylka měření

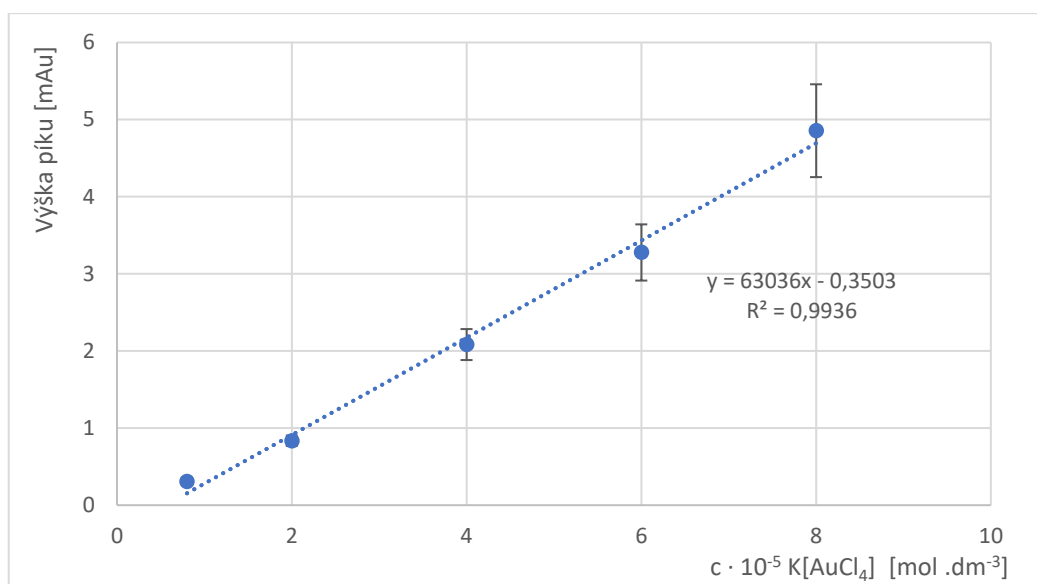
| Koncentrace<br>[mol dm <sup>-3</sup> ] | Korigované plochy $A_c$ [mAu] |                      |                      | Medián<br>[mAu]      | SD<br>[mAu]          | RSD<br>[%] |
|--|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------|
|  | 1.měření                      | 2.měření             | 3.měření             |                      |                      |            |
| $8,00 \cdot 10^{-6}$                   | $1,40 \cdot 10^{-3}$          | $1,70 \cdot 10^{-3}$ | $1,60 \cdot 10^{-3}$ | $1,60 \cdot 10^{-3}$ | $1,77 \cdot 10^{-4}$ | 11,06      |
| $2,00 \cdot 10^{-5}$                   | $3,99 \cdot 10^{-3}$          | $4,12 \cdot 10^{-3}$ | $4,03 \cdot 10^{-3}$ | $4,03 \cdot 10^{-3}$ | $7,68 \cdot 10^{-5}$ | 1,91       |
| $4,00 \cdot 10^{-5}$                   | 0,0123                        | 0,0106               | 0,0104               | 0,0106               | $1,12 \cdot 10^{-3}$ | 10,57      |
| $6,00 \cdot 10^{-5}$                   | 0,0203                        | 0,0163               | 0,0169               | 0,0169               | $2,36 \cdot 10^{-3}$ | 13,96      |
| $8,00 \cdot 10^{-5}$                   | 0,0226                        | 0,0268               | 0,0245               | 0,0245               | $2,48 \cdot 10^{-3}$ | 10,12      |



**Obrázek 11: Kalibrační graf - závislost korigované plochy píku na koncentraci roztoku tetrachlorozlatitanu draselného.** Kalibrační roztoky tetrachlorozlatitanu byly připravovány s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a průměru 50  $\mu$ m, dávkování vzorku tlakem 20 mbar po dobu 20 sec, detekční vlnová délka 230 nm, separační napětí -20 kV, vložený tlak 20 mbar, základní elektrolyt o složení 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl a 0,04 mol dm<sup>-3</sup> NaCl.

#### 4.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro určení LOD a LOQ byl z elektroferogramu odečten šum základní linie, který činil 0,16 mAU. Pro výpočet LOD a LOQ byly použity vztahy (3.1) a (3.2). Byl sestaven graf závislosti výšky píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu draselného v roztoku v rozsahu  $8 \cdot 10^{-6}$  -  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>, který je zobrazen na obrázku 12. Jednotlivými body byla proložena regresní přímka a směrnice této přímky byla použita pro výpočet LOD a LOQ. Pro druhý způsob výpočtu LOD a LOQ byla použita směrnice kalibrační závislosti korigované plochy píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu a chyba střední hodnoty z regresní statistiky této závislosti. V tabulce 5 jsou shrnuty vypočítané hodnoty LOD a LOQ.



**Obrázek 12: Graf závislosti výšky píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu draselného v roztoku.** Roztoky tetrachlorozlatitanu byly připravovány s 20% podílem elektrolytu; použitá křemenná kapilára o celkové délce 80 cm (efektivní délce 71,6 cm) a průměru 50  $\mu\text{m}$ ; dávkování vzorku tlakem 20 mbar po dobu 20 sec; detekční vlnová délka 230 nm; vložené separační napětí -20 kV; aplikovaný tlak 20 mbar; základní elektrolyt o složení 0,01  $\text{mol dm}^{-3}$  HCl a 0,04  $\text{mol dm}^{-3}$  NaCl.

**Tabulka 5:** Hodnoty LOD a LOQ vypočtené ze směrnice závislosti výšky píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu a šumu základní linie a dále z chyby střední hodnoty závislosti korigované plochy píku na koncentraci tetrachlorozlatitanu a směrnice této závislosti.

|                         | [mAu] | LOD<br>[ $\text{mol dm}^{-3}$ ] | LOQ<br>[ $\text{mol dm}^{-3}$ ] |
|-------------------------|-------|---------------------------------|---------------------------------|
| Z šumu                  | 0,16  | $7,61 \cdot 10^{-6}$            | $2,54 \cdot 10^{-5}$            |
| Z chyby střední hodnoty |       | $7,49 \cdot 10^{-6}$            | $2,49 \cdot 10^{-5}$            |

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci nejnižšího měřeného kalibračního roztoku  $\text{K[AuCl}_4\text{]}$ , která mohla být ještě detekována, tedy  $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Při nadávkování roztoku tetrachlorozlatitanu draselného o koncentraci  $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , již nebyl pík tetrachlorozlatitanu detekován.

## 5. Závěr

V této bakalářské práci byla optimalizována elektroforetická metoda pro analýzu tetrachlorozlatitanu draselného. Bylo optimalizováno složení základního elektrolytu, jako nejvhodnější bylo zvoleno složení  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl a  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl. Dále byl optimalizován podíl základního elektrolytu v rozpouštědle vzorku. Pík o největší intenzitě a se symetrickým tvarem byl naměřen v 10% až 30% základním elektrolytu jako rozpouštědle vzorku, pro další práci byl zvolen 20% základní elektrolyt jako rozpouštědlo vzorku. Při optimalizaci detekční vlnové délky bylo proměřeno absorpční spektrum  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku tetrachlorozlatitanu v 20% základním elektrolytu a byla zvolena vlnová délka 230 nm, která odpovídala absorpčnímu maximu.

Opakovatelnost měření byla ověřena deseti opakovanými analýzami roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s 20% podílem základního elektrolytu.

V časovém intervalu 14 dní byla sledována stabilita zásobního roztoku standardu tetrachlorozlatitanu opakovaným vyhodnocováním naměřených ploch píku tetrachlorozlatitanu. Připravený zásobní roztok tetrachlorozlatitanu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  skladovaný v lednici při 6-8 °C byl v rámci časového intervalu 14 dní stabilní.

Dále byla proměřena kalibrační závislost a určena mez detekce a mez stanovitelnosti, vypočítaná hodnota LOD byla  $7,49 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  a vypočítaná hodnota LOQ byla  $2,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .



## 6. Seznam literatury

1. Harvey, D. (2000) *Modern Analytical Chemistry* (McGraw-Hill) 1.vydání.
2. Štulík, K. (2004) *Analytické separační metody* (Praha: Karolinum).
3. Heiger, D. (2009) *High performance capillary electrophoresis* (Agilent Technologies, Germany).
4. Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F.P. (1998) A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92, 75–88.
5. Marina, M.L., Rios, A., Valcarcel, M. (2005) *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis* (Elsevier Amsterdam, Elsevier B. V.).
6. Klouda, P. (2003) *Moderní analytické metody* (Ostrava: Pavel Klouda).
7. Wikipedia (2021) *Capillary electrophoresis*. Dostupné z:  
[https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Capillary\\_electrophoresis&oldid=1015696493](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Capillary_electrophoresis&oldid=1015696493)  
[Viděno červen 27, 2021].
8. Kašička, V. (1997) Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy* 91, 320–329.
9. Kadlecová, T., Opekar, F., Tůma, P. (2013) Usnadněné hydrodynamické dávkování vzorku do separační kapiláry v laboratorních elektroforetických aparaturách. *Chemické listy* 107, 486–490.
10. Housecroft, C.E., Sharpe, A.G. (2014) *Anorganická chemie* (Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze).
11. Kameníček, J., Přírodovědecká fakulta (2006) *Anorganická chemie* (Olomouc: Univerzita Palackého).
12. Pallotta, A., Philippe, V., Boudier, A., Leroy, P., Clarot, I. (2018) Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles. *Talanta* 179, 307–311.
13. Simon, S., Clarke, O.J.R., Burgess, I.J. (2020) On the ligand exchange, redox, and disproportionation processes of tetrachloroaurate in the presence of a pyridine derivative. *Electrochimica Acta* 363, 137-213.

14. Baraj, B., Sastre, A., Merkoçi, A., Martínez, M. (1995) Determination of chloride complex of Au(III) by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Chromatography A* 718, 227–232.
15. Altria, K.D. (1993) Essential peak area normalisation for quantitative impurity content determination by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 35, 177–182.