

PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Pavel Zachař, David Sýkora

Obecné základy

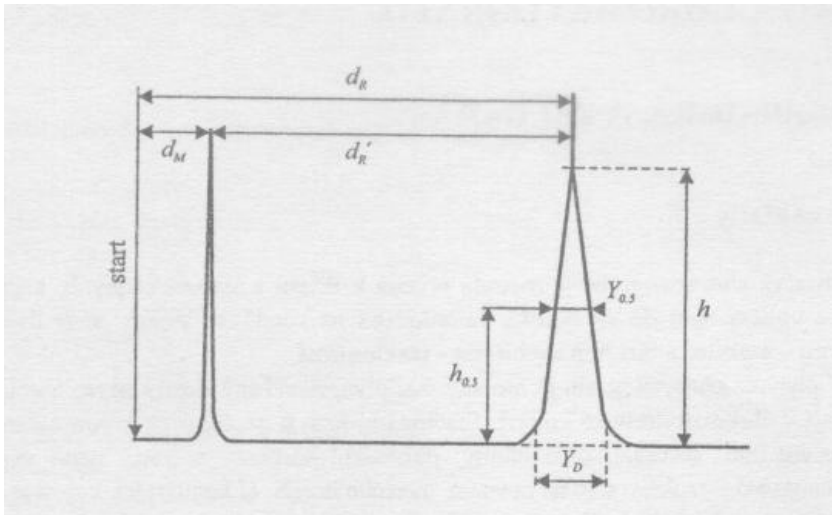
Plynová chromatografie je metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin i látek pevných s bodem varu do cca 400 °C. Metoda je založena na rozdělávání složek mezi dvě fáze, fází **pohyblivou - mobilní** a fází **nepohyblivou - stacionární**.

V plynové chromatografii je mobilní fází plyn, nazývaný **nosný plyn**. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Stacionární fáze u náplňových kolon může být pevná látka (aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý, polymerní sorbenty apod.) nebo vysokovroucí kapalina nanesená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanesená v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry.

Princip separace látek plynovou chromatografií je následující. Kolonou se stacionární fází prochází stále nosný plyn. Vzorek se vnese (nastříkne) do vyhřívaného bloku - **nástřikové komory (injektoru)**, kde se odpaří a ve formě par je unášen nosným plynem do kolony. Složky ze vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně k konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Každá složka ze vzorku postupuje kolonou svou vlastní rychlostí závislou na **distribuční konstantě** složky $K_D = c_s/c_m$, kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace složky ve stacionární a v mobilní fázi. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru. Detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru je vhodně upraven a plynule se registruje. Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá **chromatogram**. Popsaná chromatografická technika se označuje jako eluční.

Dojde-li na chromatografické koloně k rozdělení - separaci všech n -složek analyzovaného vzorku, obsahuje chromatogram n -elučních křivek - **píků** těchto složek. Podle polohy píku lze vyslovit předpoklad o identitě látky. Plocha píku je úměrná množství látky ve vzorku.

U chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x délkové jednotky nebo čas. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar GAUSSovy křivky a je popsán třemi parametry: retenční vzdáleností d_R , výškou píku h a šířkou píku měřenou buď na základní linii Y_d nebo v polovině výšky píku $Y_{0.5}$ (**obr. 1**).



Obr. 1: Retenční parametry

Retenční vzdálenost d_R [cm] je vzdálenost vrcholu píku od počátku chromatogramu, tj. od nástřiku vzorku na kolonu. Z retenční vzdálenosti lze jednoduchým způsobem spočítat retenční čas a retenční objem.

Retenční čas t_R [min] je doba průchodu látky kolonou, tj. doba od nástřiku vzorku na kolonu k dosažení vrcholu píku. Retenční čas se může vypočítat z retenční vzdálenosti d_R a rychlosti posunu registračního papíru s [cm min^{-1}], pokud se používá zapisovač.

$$t_R = \frac{d_R}{s} \quad (1)$$

Retenční objem V_R [ml] je objem nosného plynu prošlý kolonou za dobu t_R při objemovém průtoku nosného plynu F_m [ml min^{-1}]

$$V_R = F_m t_R \quad (2)$$

Mrtvé retenční parametry jsou retenční parametry složky, která se za daných podmínek na koloně nezadržuje, tzn., že její distribuční konstanta $K_D = 0$. Tyto parametry se značí

d_M - mrtvá retenční vzdálenost

t_M - mrtvý retenční čas

V_M - mrtvý retenční objem

a počítají se podobně jako retenční parametry ostatních látek. Jako nezadržovaná složka se v plynové chromatografii obvykle používá methan.

Redukované retenční parametry d'_R , t'_R , V'_R získáme, jestliže od retenčních parametrů odečteme příslušný mrtvý retenční parametr, tedy

$$d'_R = d_R - d_M \quad (3)$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad (4)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (5)$$

Účinnost chromatografické kolony

Čím je separační účinnost chromatografické kolony větší, tím méně je rozmývána zóna separované látky při průchodu kolonou a pík v chromatogramu je užší. Mírou účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických pater n .

Počet teoretických pater n se nejčastěji počítá ze vztahu

$$n = 5,54 \left(t_R / Y_{0.5} \right)^2 \quad (6)$$

kde t_R [min] je retenční čas, $Y_{0.5}$ [min] je šířka píku v polovině výšky.

Jestliže známe délku kolony L [cm], můžeme vypočítat i **výškový ekvivalent teoretického patra** H [cm]

$$H = \frac{L}{n} \quad (7)$$

Kvalitativní analýza

Základem pro identifikaci látek při plynově chromatografické analýze je shoda hodnot d_R , t_R nebo V_R neznámé látky a standardu za předpokladu, že obě hodnoty byly naměřeny za přesně stejných experimentálních podmínek. Kromě těchto parametrů se používají pro identifikaci další charakteristiky, které jsou méně závislé na experimentálních podmínkách.

Obecnou veličinou, charakteristickou pro danou látku a stacionární fázi, vhodnou k tabelování a identifikaci látek z chromatografických dat, je retenční index I . Je to relativní retenční charakteristika, vztažená ke stupnici retenčních charakteristik zvolených standardů. Vyjadřuje polohu píku identifikované látky v chromatogramu vzhledem k poloze píků řady standardů. Jako standardní látky se pro stanovení retenčních indexů v plynové chromatografii používají n-alkany, pro které platí, že logaritmy jejich redukovaných retenčních časů jsou lineárně závislé na počtu uhlíků

v molekule. Stupnice retenčních indexů n-alkanů je zvolena tak, že pro n-alkan, který má z atomů uhlíků v molekule platí $I_z = 100z$. Retenční index neznámé látky I_x se vypočítá ze vztahu

$$I_x = 100z + 100 \frac{\log t'_x - \log t'_z}{\log t'_{z+1} - \log t'_z} \quad (8)$$

kde t'_x , t'_z , t'_{z+1} jsou redukované retenční časy neznámé látky, n-alkanu se z uhlíky a z+1 uhlíky v molekule. Vzorec platí obecně pro každou dvojici z a z+1, i když nevhodnější je volit takovou dvojici standardů, aby se retenční čas sledované látky příliš nelišil od retenčních časů zvolených standardů. Optimální je případ, kdy $t'_z < t'_x < t'_{z+1}$. Do vztahu (8) pro výpočet retenčního indexu je možné místo retenčních časů dosazovat i retenční vzdálenosti d_R . Záleží, která z veličin je pro měření přístupnější.

Identifikace látek v analyzovaném vzorku se provede porovnáním vypočtených hodnot I s hodnotami tabelovanými. V některých případech jsou hodnoty stanovených retenčních indexů látek blízké, takže tímto způsobem nelze provést jednoznačnou identifikaci.

Nejspolehlivější způsob kvalitativního vyhodnocení v plynové chromatografii je použití hmotnostního spektrometru jako detektoru (MSD). Tento detektor poskytne pro každý pík tzv. **hmotnostní spektrum**. Každá analyzovaná látka dává obvykle při elektronové ionizaci ion-radikál odpovídající ionizované molekule (M^+) a fragmentové ionty odpovídající částem rozpadající se molekuly. Hmotnosti a množství vznikajících iontů jsou pro danou látku charakteristické. Získaná spektra se porovnají se spektry tabelovanými a látka je ve většině případů jednoznačně určena.

Kvantitativní analýza

Množství separované látky vystupující z kolony se měří detektory. Obvykle používané detektory indikují okamžitou koncentraci látky na výstupu z kolony. V tomto případě je celkové množství látky úměrné ploše píku. Automaticky se velikost plochy určuje s využitím datastanice, která bývá součástí plynového chromatografu. Není-li přístroj vybaven datastanicí, lze velmi zhruba odhadnout plochy píku výpočtem

$$A = h Y_{0.5} \quad (9)$$

A - plocha píku, h - výška píku, $Y_{0.5}$ - šířka píku v polovině výšky.

V případě úzkých a symetrických píků lze pro kvantitativní vyhodnocení využít i výšku píku.

Vztah mezi plochou, resp. výškou píku a koncentrací (hmotností) složky lze vyjádřit obvykle lineární závislostí, která platí většinou v rozsahu několika řádů koncentrací stanovované látky. Ke kvantitativnímu stanovení je možno využít některý z řady osvědčených způsobů, např. metodu standardního přídatku, metodu vnitřního standardu, metodu vnějšího standardu.

Metoda vnitřního standardu je relativní (nepřímá) metoda, založená na přidání známého množství jedné látky – **vnitřního standardu (IS)** – ke vzorku. Jako vnitřní standard je volena látka, která neinterferuje s ostatními píky ve stanovovaném vzorku a má přibližně stejnou odezvu. Výhodou této metody je, že není nutno dávkovat do plynového chromatografu přesný objem vzorku.

Pro stanovovanou složku platí

$$A_x = k_x \cdot m_x \quad (10)$$

a pro vnitřní standard

$$A_S = k_S \cdot m_S \quad (11)$$

Pro poměr ploch jejich píků

$$\frac{A_S}{A_x} = \frac{k_S \cdot m_S}{k_x \cdot m_x} = f \frac{m_S}{m_x} = f \frac{\rho_S V_S}{\rho_x V_x} \quad (12)$$

A_x , A_S – plochy píků složky a standardu, k_x , k_S – konstanty úměrnosti, m_x , m_S – hmotnosti složky a standardu, ρ_x , ρ_S - hmotnostní koncentrace složky a standardu, V_x , V_S – objemy roztoků složky a standardu.

Při kvantitativním stanovení složky ve vzorku metodou přímého srovnání se nejprve z analýzy kalibrační směsi o známé koncentraci (hmotnosti) vnitřního standardu a složky vypočítá hodnota poměru k_S/k_x , která se nazývá **odezvo­vý faktor** f

$$f = \frac{m_x \cdot A_S}{m_S \cdot A_x} \quad (13)$$

a následně z analýzy vzorku s přidaným IS se vypočítá koncentrace (hmotnost) stanovované složky.

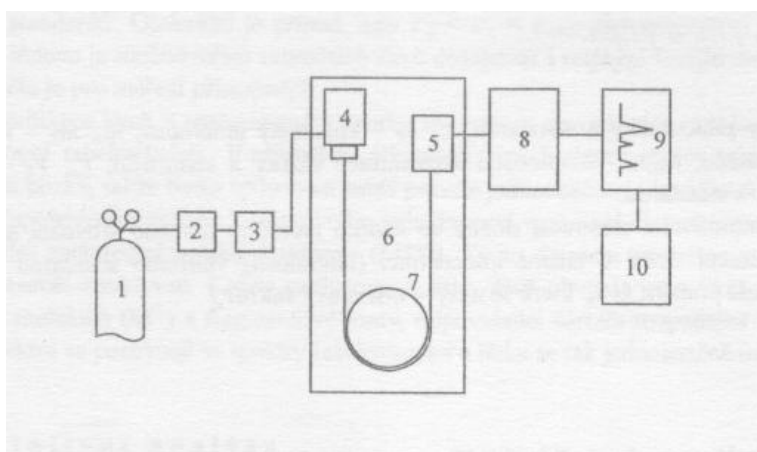
Plynový chromatograf

Schéma plynového chromatografu je uvedeno na **obr. 2**. Nosný plyn je odebírán z tlakové láhve 1 přes redukční ventil. Po průchodu regulátory tlaku a průtoky 2 a 3 přichází nosný plyn do nástřikové komory - injektoru 4. Do injektoru do proudu nosného plynu se dávkuje vzorek speciální stříkačkou. Injektor je vyhříván

na takovou teplotu, aby v něm došlo k okamžitému zplynění vzorku. Z injektoru jsou páry vzorku unášeny nosným plynem na kolonu 7, umístěnou v termostatu 6. V koloně dochází k separaci jednotlivých složek vzorku na základě dříve popsaného principu. Nosný plyn z kolony vstupuje do detektoru 5. Signál z detektoru je veden na zesilovač 8, registrován zapisovačem 9 a zpracován integrátorem 10.

Pokud jsou v přístroji používány kapilární kolony, které mají podstatně nižší kapacitu než kolony náplňové, je injektor opatřen děličem toku nosného plynu. V děliči toku je větší část nosného plynu včetně par vzorku odpouštěna do atmosféry, menší část do kolony. Poměr obou toků lze nastavit podle potřeby. Dělič toku tak umožňuje nadávkování malého množství vzorku, které by se jinak nedalo přesně odměřit.

Nejrozšířenějším detektorem používaným v plynové chromatografii je **plamenově ionizační detektor (FID)**. Je to detektor schopný detekovat téměř všechny organické látky a to v širokém rozmezí koncentrací. Jeho princip spočívá v měření změny elektrické vodivosti vodíkového plamene způsobené přítomností eluované organické látky. Detektor tvoří hořáček, opatřený na spodní části přívodem nosného plynu vystupujícího z kolony, přídavného inertního plynu (dusíku) a vodíku. Tyto plyny se smísí před vstupem do trysky hořáčku. Vzduch jako oxidant se přivádí do spodní části detektoru. V detektoru jsou dvě elektrody, na které je vloženo stálé stejnosměrné napětí. Přichází-li do plamene pouze nosný plyn, vzniká v plameni nepatrné množství iontů, vodivost plamene je minimální a detektor vykazuje malý konstantní proudový signál. Vstoupí-li do detektoru s nosným plynem látka spalitelná ve vodíkovém plameni, vznikají při jejím hoření iontové fragmenty a elektrony, které zvýší elektrickou vodivost plamene, a tím se zvýší i ionizační proud. Odezva detektoru je přímo úměrná koncentraci stanovované látky v nosném plynu, závisí však na její struktuře.



Obr. 2: Schéma plynového chromatografu

1 - tlaková láhev s nosným plynem; 2, 3 - regulátory tlaku a průtoku; 4 - injektor; 5 - detektor; 6 - termostat; 7 - kolona; 8 - zesilovač; 9+10 - datastanice s monitorem.

Návod laboratorní práce

Analýza směsi rozpouštědel plynovou chromatografií

Úkoly

1. Stanovte retenční indexy I složek ve vzorku A a složky identifikujte.
2. Stanovte hmotnostní zlomek (% hm.) p -xylynu v technické směsi aromatických uhlovodíků (vzorek B).
3. Určete počet teoretických pater n a výškový ekvivalent teoretického patra kolony H pro n -nonan.
4. Vyhodnoťte výsledky.

Přístroje

V laboratoři jsou používány plynové chromatografy Varian 3350 s plamenově ionizačním detektorem a kapilární kolonou. Přístroj je vybaven pamětí pro uchování 4 pracovních metod. Signál z plynového chromatografu je zaznamenáván na datastanici (PC) vybavené programem Clarity.

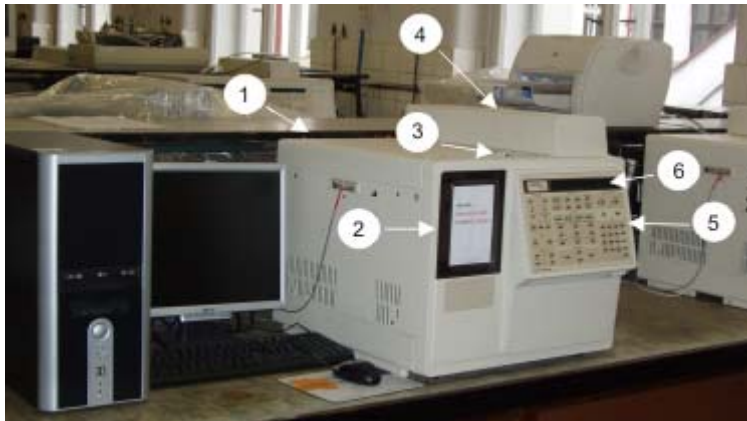
Kolona

V přístroji je použita křemenná kapilární kolona ND5 (f. Nordion) s nepolární stacionární fází, délka kolony je 25 m, vnitřní průměr 320 μm a síla filmu stacionární fáze 0,25 μm .

Plynový chromatograf a jeho ovládání

Popis přístroje

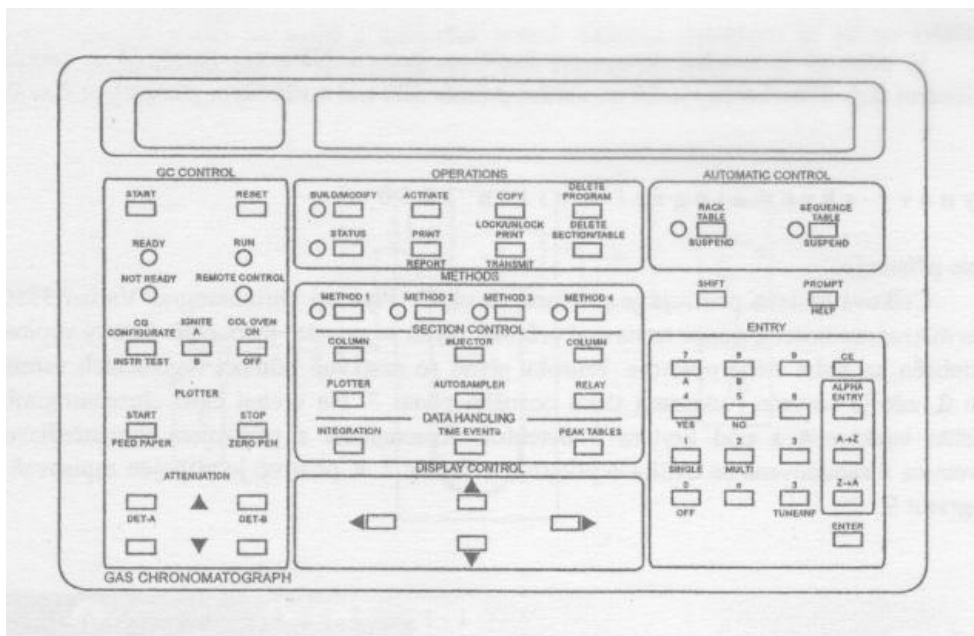
Celková sestava přístroje je uvedena na **obr. 3**. Plynový chromatograf Varian 3350 je řízen mikroprocesorem, pouze nastavení průtoků plynů se provádí manuálně. Síťový vypínač 1 je umístěn na zadní stěně přístroje. Průtoky plynů se nastavují pomocí regulačních ventilů v části 2, zde je umístěn i ukazatel tlaku nosného plynu. Na horní části chromatografu je umístěn injektor 3 a pod krytem 4 detektor. Komunikaci s přístrojem zprostředkovává klávesnice 5 zabudovaná na dveřích přístroje a display 6. K přístroji je připojena datastanice určená pro sběr a vyhodnocení dat z plynového chromatografu s nainstalovaným programem Clarity.



Obr. 3: Plynový chromatograf Varian 3350

1 - síťový vypínač; 2 - část s regulátory průtoků a tlaku; 3 - injektor; 4 - kryt detektoru; 5 - ovládací klávesnice ;6 – display

Klávesnice, **obr. 4**, je rozdělena do sekcí **GC CONTROL**, **OPERATIONS**, **METHODS**, **DISPLAY CONTROL**, **AUTOMATIC CONTROL**, **ENTRY**. Každá sekce zahrnuje řadu příkazových kláves, případně kontrolní světelné diody. Po stisknutí příkazové klávesy se na display objeví pokyn k zadávání hodnot nebo k výběru další klávesy. Dále budou vysvětleny pouze funkce těch kláves a diod, které budou používány při laboratorní práci.



Obr. 4: Ovládací klávesnice

GC CONTROL:

READY	- dioda svítí zeleně - přístroj je připraven k analýze
NOT READY	- dioda svítí červeně - přístroj není připraven k analýze
RUN	- dioda svítí zeleně - běží analýza
RESET	- klávesa k zastavení analýzy

OPERATION:

BUILD/MODIFY	- vytvoření nebo modifikování metody
ACTIVATE	- aktivování metody
DELETE SECTION	- vymazání parametrů ve zvoleném oddílu metody
STATUS	- zjištění aktuálního stavu (teploty kolony; teploty injektoru; teploty, citlivosti a rozsahu detektoru)

Současné operace BUILD/MODIFY a STATUS se vylučují, aktivní operace je označena žlutě svítící diodou u příslušného příkazu.

METHODS:

METHOD 1-4	- metody uložené v paměti, resp. místo pro uložení nových metod, aktivní metoda je signalizována žlutě svítící diodou
COLUMN	- oddíl pro zadání nebo kontrolu podmínek pro kolonu, zahrnuje zadání izotermního režimu nebo teplotního programu kolony
INJECTOR	- oddíl pro zadání nebo kontrolu podmínek pro injektor
DETECTOR	- oddíl pro zadání nebo kontrolu podmínek pro detektor, zahrnuje teplotu detektoru, rozsah snímaného signálu RANGE a citlivost ATTENUATION (lze nastavit pouze hodnoty 2^0 - 2^{10})

DISPLAY CONTROL:

Sekce umožňuje pohyb po řádcích displeje.

ENTRY:

Sekce slouží k zadávání dat. Obsahuje číselné klávesy, klávesu YES, NO, CE k vymazání dat a odesílací klávesu ENTER.

Měření na přístroji

Vzhledem k časové náročnosti ustálení pracovních podmínek je již před zahájením práce studentem přístroj uveden do chodu asistentem, tzn. že jsou již nastaveny průtoky všech plynů na požadovanou hodnotu, zaktivována METODA 4, která umožní ustálení tepelného režimu nástřikové komory, kolony i detektoru a je zapálen plamínek detektoru.

Měření na plynovém chromatografu má tři fáze:

Vytvoření metody

Vytvoření metody se skládá ze zadání hodnot pro požadovanou teplotu kolony, resp. teplotní program kolony do oddílu COLUMN, teploty injektoru do oddílu INJECTOR, teploty, citlivosti a rozsahu detektoru do oddílu DETECTOR. Podrobně bude rozpis vytvoření metody uveden v jednotlivých bodech postupu práce.

Aktivace metody

Stisknutím kláves **ACTIVATE - METHOD** metodu aktivujeme a zvolené parametry se začnou realizovat. Ustálení požadovaných parametrů je signalizováno rozsvícením zelené diody **READY**. Tehdy je přístroj připraven k analýze.

Analýza

Pokud je přístroj ve stavu **READY**, připraví se k měření datastanice a nadávkuje se vzorek. Při nástřiku je automaticky spuštěn nastavený program a sběr dat datastanicí. Analýzu není nutno ukončovat, po realizaci zvoleného teplotního programu přístroj přejde automaticky do stavu **NOT READY**, po ustavení počátečních podmínek pro analýzu a signalizaci stavu **READY** je možno provést další analýzu.

Počítačové zpracování dat

Chromatografická datastanice Clarity pracuje pod operačním systémem Windows. Nejprve převádí digitálně-analogovým převodníkem výstupní napětí z detektoru na číselné údaje, které ukládá se zvolenou frekvencí do souboru na disk počítače. Před zahájením analýzy operátor vyplní potřebné informace jako je označení vzorku, pracovní podmínky apod.. Uložené datové soubory mohou být kdykoliv vyvolány a dále zpracovány tak, aby se získaly např. informace o retenčních časech, výškách píků, plochách píků nebo o účinnosti kolony. Při kvantitativní chromatografické analýze je možno vytvořit kalibrační soubory, s jejichž pomocí se získají údaje o obsahu stanovované složky v nastříkovaném roztoku. V této práci bude využita jen malá část možností, které datastanice poskytuje.

Příprava datastanice Clarity před měřením

Zapneme síťový vypínač na počítači. Automaticky začne běžet spouštění programu Windows a na obrazovce se objeví požadavek *“Přihlášení k systému Windows”*. Uživatelské jméno bude automaticky předvyplněno (*“Student”*) a položku

“Heslo“ vyplníme také “Student”. Na ploše spustíme dvojklikem program Clarity. Objeví se nové okno se symbolem přikrytého chromatografu. Klikneme na něj, otevře se další okno s požadavkem “Enter user name”, ponecháme okno beze změn, nic tedy nevyplňujeme, a stiskneme tlačítko “OK”. Po tomto kroku se objeví symbol odkrytého chromatografu. Kliknutím na tento symbol otevřeme nové okno, ve kterém bude zobrazeno formou ikon celé schéma chromatografického systému. Klikáním na ikony je pak možno přistupovat k jednotlivým částem/modulům GC systému. Zkontrolujeme, že nahoře na liště okna je zobrazeno “Method C:\Clarity\GCmethod”, pokud tomu tak není, požádáme o pomoc asistenta. Nyní je třeba ověřit funkčnost komunikace mezi GC systémem a počítačem, proto klikneme na symbol obrazovky počítače v otevřeném okně (“Data Acquisition”). Otevře se další (třetí) okno a v něm je zobrazován aktuální signál z detektoru. Sledujeme průběh signálu asi 2 minuty, a pokud je základní linie stabilní, uzavřeme toto okno kliknutím na křížek v jeho pravém horním rohu. Nyní klikneme na symbol vialky s mikrostříkačkou ve schématu GC, otevře se okno umožňující přiřazení jména chromatogramu, který bude následně vznikat. Vyplníme pouze položku nadepsanou “Chromatogram File Name”, způsob tvorby jmen chromatogramů bude popsán níže v **Pracovním návodu**. Ostatní položky mohou zůstat nevyplněny, uzavřeme toto okno. Ověříme, že v otevřeném okně se schématem HPLC je v dolní části nápis “Waiting”. Tím je systém připraven k provedení prvního nástřiku.

Dávkování kapalného vzorku

Kapaliny dávkujeme injekční mikrostříkačkou o objemu 10 µl. Mikrostříkačku několikrát vypláchneme dávkovanou kapalinou. Poté nasajeme do mikrostříkačky požadovaný objem. Nikdy neatíráme ústí jehly, abychom kapalinu nevysáli. Jehlou opatrně (ale rychle) propíchneme silikonové těsnění nástřikové komory, jehlu zasuneme do nástřiku co nejdále, rychle vystříkneme obsah mikrostříkačky a jehlu z nástřiku vytáhneme.

Pracovní návod

1. Stanovení retenčních indexů / složek vzorku A a jejich identifikace

a) Vytvoření metody

Po postupném stisknutí kláves BUILD/MODIFY - METHOD 1- COLUMN doplníme požadované hodnoty parametrů do hesel na display. Každou zadanou hodnotu potvrdíme klávesou ENTER:

INITIAL COLUMN TEMP	45
INITIAL COL HOLD TIME	0.0
PRGM 1 FINAL COL TEMP	80
PRGM 1 COL RATE IN °/MIN	5
PRGM 1 COL HOLD TIME	1.0
ADD NEXT COLUMN PROGRAM?	NO

V oddílech INJECTOR a DETECTOR postupným potvrzením klávesou ENTER pouze zkontrolujeme tyto parametry:

INJECTOR:

INITIAL INJECTOR TEMP	200
INITIAL INJ HOLD TIME	0.0
TEMP PROGRAM INJECTOR?	NO

DETECTOR:

DETECTOR TEMP	200
FID A INITIAL ATTEN	32
FID A INITIAL RANGE	11
FID A AUTOZERO ON?	YES
PRGM 1 FID A TIME IN MIN	0.01
PRGM 1 FID A ATTEN	32
PRGM 1 FID A RANGE	10
PRGM 1 FID A AUTOZERO ON?	NO
PRGM 2 FID A TIME IN MIN	0.02
PRGM 2 FID A ATTEN	128
PRGM 2 FID A RANGE	11
PRGM 1 FID A AUTOZERO ON?	NO
ADD NEXT FID A PROGRAM?	NO

Další oddíly v metodě nejsou využívány, proto je nenastavujte ani neměňte žádné další parametry.

b) Aktivace metody ACTIVATE - METHOD 1

c) Vyčkání signalizace stavu READY

d) Příprava datastanice Clarity ke sběru signálu z plynového chromatografu. Popis spuštění datastanice byl uveden na konci části **Příprava datastanice Clarity před měřením**. Pokud se jedná o tvorbu jmen chromatogramů/souborů je třeba uvést, že obecná struktura jmen chromatografických souborů (File Names) je jednotná pro všechny nastříkované látky, a to:

datum_ iniciály jména studenta _označení nastříkované kapaliny_ číslo nástřiku

Označení nastříkovaných kapalin je přitom následující:

Roztok n-alkanů (hexan, heptan, oktan, nonan v pentanu) => **STD**

Vzorek A na kvalitativní analýzu

AX (kde X je číslo konkrétního vzorku A) =>

AX

Směs roztoků n-alkanů a vzorku AX =>

STDAX

Příklady tvorby jmen chromatografických souborů:

1. příklad

Dne **10.2.2008** byl nastříknut studentem **Karlem Novákem** roztok **standardu** n-alkanů. Nástřik byl toho dne proveden **poprvé**.

Jméno souboru bude následující (na základě výše uvedených informací):

1002_KN_STD_1

2. příklad

Dne **11.2.2008** byl studentem **Janem Voskou** nastříknut **vzorek A2**. Nástřik vzorku byl proveden toho dne **podruhé**.

Jméno souboru bude následující:

1102_JV_A2_2

Důležité: NEZAPOMÍNEJTE na konci jména souboru uvést číslo nástřiku!

e) *Dávkování vzorku*

Postupně provedeme následující analýzy:

- analýza 1µl směsi n-alkanů (1% směs hexanu, heptanu, oktanu a nonanu v pentanu)
- analýza 1µl vzorku A, který obsahuje 4 neznámé složky v pentanu

- analýza 1 μ l směsi n-alkanů a vzorku A

Směs se připraví takto: do mikrostříkačky nasajeme 0,5 μ l vzorku A a poté 0,5 μ l směsi n-alkanů. Tím získáme přímo ve stříkačce směs, kterou okamžitě dávkujeme.

Každou analýzu **provedeme 2x**. Záznam signálů je snímán datastaničí.

2. Stanovení hmot. zlomku (% hm.) *p*-xylynu v technické směsi aromatických uhlovodíků (vzorek B).

Stanovení provedeme metodou vnitřního standardu (internal standard, IS). Jako vnitřní standard bude sloužit toluen. Ke kvantitativnímu vyhodnocení budou využity plochy píků.

a) Příprava kalibračního roztoku

Do předem zvážené suché vialky nadávkujeme stříkačkou cca 20 μ l *p*-xylynu a vialku zvážíme. Pak přidáme cca 20 μ l toluenu (IS) a vialku znova zvážíme. Ke směsi ve vialce přidáme pipetou 1 ml hexanu a roztok po uzavření vialky dobře promícháme. Tím je připraven kalibrační roztok, který obsahuje v 1 ml m_{x1} g *p*-xylynu a m_{S1} g toluenu a bude použit k výpočtu odezvového faktoru *f*.

b) Příprava roztoku vzorku s přidavkem IS

Do předem zvážené suché vialky z jedné z vialek označených B1-8 odměříme stříkačkou cca 20 μ l koncentrované směsi aromatických uhlovodíků a vialku zvážíme. Dále přidáme cca 20 μ l toluenu a znova vialku zvážíme. Ke směsi přidáme pipetou 1 ml hexanu a roztok dobře promícháme. Tím je připraven roztok vzorku obsahující m_{S2} g toluenu a m_{VZ} g vzorku (navážka).

c) Úprava GC metody pro kvantifikaci

Postupujeme stejným způsobem jako v předchozí úloze, změny provedeme jen v oddílu COLUMN:BUILD/MODIFY - METHOD 1- COLUMN a zadáme následující teplotní program kolony:

INITIAL COLUMN TEMP	45
INITIAL COL HOLD TIME	2.0
PRGM 1 FINAL COL TEMP	80
PRGM 1 COL RATE IN °/MIN	7
PRGM 1 COL HOLD TIME	0.0
ADD NEXT COLUMN PROGRAM?	NO

Ostatní sekce neměníme.

Další postup je shodný s bodem b) - e) v úloze 1. Jména chromatogramů jsou tvořena obdobně jako v úloze 1.

Kalibrační roztok je označen=> **KALX**

Roztok ke kvantifikaci=> **BX**

Postupně provedeme následující analýzy:

- analýza 1 μ l kalibračního roztoku
- analýza 1 μ l roztoku vzorku B

Po první analýze kalibračního roztoku a kvantifikovaného vzorku B je nejprve především potřeba identifikovat pík toluenu (IS) a *p*-xylenu. **Nástřík kalibrační směsi i vzorku B provedeme minimálně 2x.**

3. Stanovení účinnosti chromatografické kolony

Tento úkol nepředstavuje další experimentální měření, pro výpočet se využijí data naměřená v rámci úkolu 1.

Po skončení uvedených úkolů se provede čišění kolony. Za tím účelem se zaktivuje již vytvořená METODA 2, zahrnující potřebný teplotní program kolony 50° - 200°C rychlostí 20°/min. Po dosažení stavu READY se nadávkuje 1 μ l hexanu. Chromatogram není nutno registrovat. Práce na plynovém chromatografu je tím ukončena. Vypnutí přístroje provádí výhradně asistent nebo laborant.

4. Vyhodnocení výsledků

Úkol 1.

Z chromatogramů *n*-alkanů a vzorku A odečteme retenční časy jednotlivých píků včetně píku rozpouštědla. Na základě odečtených hodnot v chromatogramu směsi *n*-alkanů se vzorkem A jednotlivé píky přiřadíme standardům (hexan, heptan, oktan, nonan) a složkám vzorku a provedeme výpočet retenčních indexů *I*. K výpočtu použijeme průměrné hodnoty t_R získané z analýz směsi *n*-alkanů a vzorku A. K určení mrtvého času t_M slouží jako nezadržovaná složka počátek píku rozpouštědla (pentanu) na každém chromatogramu. Vypočtené retenční indexy porovnáme s tabelovanými daty, která jsou k dispozici v laboratoři a složky identifikujeme. Správnost identifikace potvrdíme porovnáním hmotnostních spekter složek vzorku A (k dispozici v laboratoři pro všechny vzorky) s hmotnostními spektry v katalogu spekter (katalog k dispozici v laboratoři).

Úkol 2.

V chromatogramu kalibračního roztoku odečteme plochy píků (Area) toluenu (A_{S1}) a *p*-xylenu (A_{X1}) a z těchto ploch a známých hmotností toluenu a *p*-xylenu vypočteme pro každé jednotlivé stanovení odezvodový faktor *f* a následně vypočítáme jejich průměrnou hodnotu.

Z chromatogramu vzorku B (po identifikaci píků toluenu a *p*-xylynu) odečteme příslušné plochy (A_{S2} a A_{x2}) a ze známé hodnoty faktoru f (viz výše) a hmotnosti IS (toluenu) přidaného ke vzorku (m_{S2}) vypočteme hmotnost *p*-xylynu ve vzorku B a následně z navážky vzorku B vypočteme %hm *p*-xylynu ve vzorku B. Tento výpočet provedeme pro každé jednotlivé stanovení a celkový výsledek uvedeme jako aritmetický průměr ze všech měření (nejméně dvou).

Úkol 3.

Z chromatogramu směsi *n*-alkanů, získaného v úkolu 1 odečteme retenční čas t_R a šířku píku v polovině výšky $Y_{0,5}$ (v datastanici označeno $w_{0,5}$) pro *n*-nonan, spočítáme počet teoretických pater n podle vztahu (6) a výškový ekvivalent teoretického patra H podle vztahu (7). Do výsledků uvedeme průměrné hodnoty ze dvou výpočtů.

Kontrolní otázky

1. Co je stacionární a mobilní fáze v plynové chromatografii?
2. Vyjmenujte hlavní části plynového chromatografu.
3. Na jakém principu pracuje plamenový ionizační detektor (FID)?
4. Pro detekci kterých látek je FID určen?
5. Co je to chromatogram?
6. Které parametry charakterizují chromatografický pík?
7. Definujte retenční vzdálenost, retenční čas a retenční objem.
8. Jak se tyto veličiny vzájemně přepočítávají?
9. Co jsou redukované retenční parametry?
10. Co je to mrtvá retenční vzdálenost a která látka se používá k jejímu stanovení?
11. Které veličiny charakterizují účinnost chromatografického systému?
12. Který údaj, odečtený v chromatogramu, slouží jako výchozí veličina pro identifikaci látek?
13. Které látky se používají jako standardy při stanovení retenčních indexů?
14. Jak se určuje kvantitativní složení vzorku?

Pro zpracování kapitoly byla použita skripta:

1. Krofta a kolektiv: *Návody pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II.* VŠCHT, Praha 1997, J. Podehradská, Z. Vozňáková: *Plynová chromatografie.*
2. Krofta a kolektiv: *Návody pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II.* VŠCHT, Praha 2001, J. Podehradská, P. Zachař: *Plynová chromatografie.*