



VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE

Fakulta chemické technologie

Ústav organické technologie

LABORATOŘ OBORU

D

Vyhodnocování chromatografických (GC) dat

Vedoucí práce: Ing. Martin Zapletal, Ph.D.

Umístění práce: laboratoř S31

1. ÚVOD

Chromatografií rozumíme soubor separačních metod, při kterých dochází k rovno-
vážnému rozdělování molekul složek analyzované směsi mezi dvě fáze a to fázi **stacionární**
(nepohyblivou) a fázi **mobilní** (pohyblivou). Chromatografické metody lze rozlišovat podle
celé řady kritérií:

- **skupenství fází:** kapalinová (l-l nebo l-s) a plynová (g-l nebo g-s),
- **separační mechanismus:** adsorpční, rozdělovací, afinitní a ionexový,
- **vnesení vzorku do systému:** eluční, vytěšňovací a frontální,
- **technika provedení:** sloupcová nebo v plošném uspořádání.

Chromatografické techniky jsou nejvýznamnějšími metodami separace látek ze směsí,
které jsou surovinami pro petrochemii, paliva a energetiku, chemické speciality, farmacii atd.

2. TEORETICKÉ ZÁKLADY PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

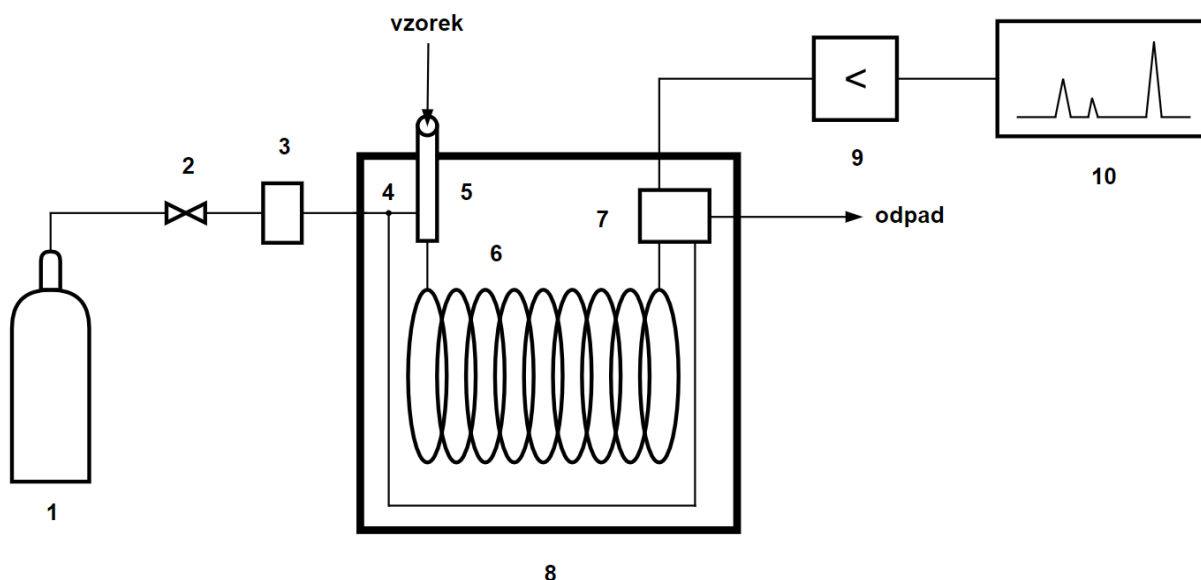
Plynová chromatografie (GC) je analytickou, separační metodou používanou k analýze
těkavých látek. Předností metody je její jednoduchost, nenáročnost na čas a množství vzorku
(max. 1-3 μ l při aplikaci kapilární kolony). Nedostatkem GC metody je nutnost převedení
analyzovaného vzorku do plynného stavu bez jeho rozkladu. Nelze proto analyzovat látky
termolabilní a látky netěkavé (například makromolekulární).

Postup separace a detekce složek v analyzované směsi technikou plynové chromato-
grafie je následující. Vzorek směsi je nastříkovan do vyhřívané komory, tzv. **injektoru**, kterým
prochází nosný plyn a unáší analyzovaný vzorek do kolony se stacionární fází. Součástí
injektoru je **liner**, válcovitý segment s náplní (liner je většinou skleněný, náplň bývá
z křemenné vaty; pro některé speciální metody např. při nástřiku plynných vzorků nebo při
použití SPME /solid phase micro extraction/ je přítomnost náplně nežádoucí), který omezuje
kontakt analyzovaného vzorku s vyhřívaným povrchem a eliminuje riziko jeho rozkladu. **Liner**
zajišťuje dokonalé zplynění všech složek vzorku a slouží k zachytu netěkavých složek, které
by mohly kontaminovat stacionární fázi chromatografické kolony. Mezi injektorem a kolonou
je dělič toku, tzv. **splitter**. Ten, v závislosti na volbě splitovacího poměru, propouští zpravidla
jen menší část odpařeného vzorku do kolony. V chromatografické koloně dochází k adsorpci
složek vzorku na stacionární fázi a následně postupné desorpci těchto složek, které procházejí
s nosným plynem celou délkou kolony. Každá složka analyzované směsi se pohybuje rozdílnou

rychlostí v závislosti na distribuční (rozdělovací) konstantě K_D , která je definována poměrem aktivit dané složky ve stacionární (a_s) a mobilní (a_m) fázi.

$$K_D = \frac{a_s}{a_m} \quad (1)$$

Výstup (eluze) složek analyzované směsi z kolony je indikován **detektorem**. Jeho signál je po zesílení a úpravě v RC převodníku zaznamenán na displeji. Detektor indikuje okamžité koncentrace separovaných složek v nosném plynu. Výsledkem analýzy je grafický záznam, tzv. **chromatogram**, který prezentuje časovou závislost odezvy detektoru, ve formě elučních křivek (píků) pro každou detekovanou složku. Metoda plynové chromatografie je nejen v organické chemii nepostradatelnou instrumentální technikou pro kvalitativní i kvantitativní analýzu.



Obrázek 1: Zjednodušené schéma plynového chromatografu.

Legenda k obrázku 1:

1	tlaková láhev s nosným plynem	6	chromatografická kolona
2	regulátor tlaku nosného plynu	7	detektor
3	regulátor průtoku nosného plynu	8	temperovaný prostor
4	dělič toku (splitter)	9	zesilovač signálu
5	injektor	10	datastanice s displejem

2.1 Mobilní a stacionární fáze

Mobilní fází v plynové chromatografii je nosný plyn, který pouze unáší složky matrice a neinteraguje s nimi. Nejčastěji se při analýze organických látek s plamenově ionizačním detektorem (FID) používá helium, dusík, nebo argon. Při užití tepelně vodivostního detektoru (TCD) se s výhodou užívá helium a vodík, při detekci látek s vysokou tepelnou vodivostí je nosným plynem argon. Kyslík nelze použít, protože by mohlo při vyšších teplotách docházet k oxidaci jak analytů, tak stacionární fáze. Nelze použít ani uhlovodíkové směsi, jelikož by mohly ovlivňovat funkci detektoru. Kritéria pro výběr nosného plynu jsou: „nereaktivita“ se složkami analytu, typ detektoru, čistota plynu (min. 99,99 %), viskozita a bezpečnost. Stopové nečistoty, které jsou obsaženy v plynu, se dají odstraňovat následujícím způsobem:

- **vlhkost:** pomocí molekulových sít,
- **kyslík:** katalyticky, buď Cu nebo Pt katalyzátory,
- **organické nečistoty:** sorpce na aktivním uhlí či kat. spalování na CO₂ a sorpce.

Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně, které rozdělujeme na **náplňové** a **kapilární**. Náplňové kolony jsou vyráběny ze skla či kovového materiálu (nerezová ocel) a obsahují porézní, inertní nosič (aluminosilikáty), na kterém je zakotveno 5 až 40 hmotn. % chromatografické fáze. Ta slouží k modifikaci polarit, popř. dalších chemických vlastností. Kapilární kolony jsou vyráběny z křemenného skla a jsou potahovány filmem polyimidu. Stacionární fáze je umístěna na vnitřní straně kapiláry. Kapilární kolony vyrábí řada firem, které ze širokého portfolia produktů nabídnou pro danou směs analytů optimální chr. kolonu, včetně pracovních podmínek. Pro nákup chromatografické kolony je třeba specifikovat:

- typ chromatografické fáze,
- vnitřní průměr kapilární kolony,
- tloušťku filmu stacionární fáze, typ uložení: WCOT, SCOT a PLOT,
- délku kolony.

Nejčastěji se užívají nepolární (alkylpolysiloxany) stacionární fáze, kde pořadí eluce složek je dáno jejich těkavostí (tenze par). Pokles kvality dělení složek analyzovaného vzorku může být způsoben poškozením stacionární fáze:

- **tepelné poškození:** dochází k depolymerizaci polysiloxanového řetězce,
- **chemické poškození:** kyslíkem a silnými kyselinami (HCl, H₂SO₄, CF₃COOH).

2.2 Detektory

Detektory pro techniku plynové chromatografie musí splňovat následující podmínky. Teplota detektoru musí být vyšší než teplota látek vycházejících z kolony, aby nedocházelo ke kondenzaci těchto látek na stěnách detektoru. Signál detektoru musí být reprodukovatelný, stabilní a mít co nejmenší úroveň šumu. V neposlední řadě by měl poskytovat lineární závislost koncentrace (hmotn. %) složky na odezvu koncentrace (citlivost) v co nejširším rozsahu. Mezi nejčastěji užívané detektory patří:

- 1) Plamenově ionizační detektor (FID):** je nejrozšířenějším detektorem. Jeho detekce je založena na měření změn ionizačního proudu, vyvolaných tvorbou nabitých částic (ionty a elektrony) chemionizačními reakcemi ve vodíkovém plamenu. S růstem koncentrace ionizovaných částic klesá odpor, a tudíž roste proud mezi dvěma polarizovanými elektrodami. Citlivost FI-detektoru, v porovnání s TC-detektorem, je o 2 až 3 řády vyšší. Detekuje téměř všechny organické sloučeniny, především je citlivý na uhlovodíky, jejichž odezva je úměrná počtu uhlíků v molekule. Nedává však odezvu na vodu, anorganické plyny a některé organické látky jako HCOOH , HCHO a CCl_4 .
- 2) Tepelně vodivostní detektor (TCD):** je univerzálním detektorem. Detekce analytů je založena na měření změn elektrického proudu, vyvolaných teplotní závislostí ohmického odporu elektricky vyhřívaného odporového vlákna TC-detektoru. Ke změnám teploty vlákna dochází vlivem změn tepelné vodivosti mobilní fáze v závislosti na koncentraci a kvalitě v chr. koloně separovaných analytů. TCD je detektor, který poskytuje odezvu všech látek. Jeho nevýhodou je, v porovnání s FI-detektorem výrazně nižší citlivost a dynamický rozsah.
- 3) Hmotnostně spektrometrický detektor (MS):** umožňuje detekci analytu včetně jeho identifikace na základě hmotnostního spektra.
- 4) Detektor elektronového zachytu (ECD):** jedná se o selektivní detektor především pro stanovení sloučenin obsahujících halogeny. Je to vhodný detektor pro stopovou analýzu pesticidních látek.
- 5) Plamenový fotometrický detektor (FPD):** selektivní detektor, který umožňuje detekovat látky se specifickým prvkem, nejčastěji se využívá pro látky obsahující síru nebo fosfor. Funguje obdobně jako FID, neměří se ale proud mezi elektrodami. V těle ionizační komory je otvor, za ním úzkopásmový filtr, který vymezuje specifické vlnové délky záření z ionizace a za filtrem je fotonásobič pro detekci tohoto záření.

2.3 Retenční parametry

Chromatogram je dvojrozměrný záznam chromatografické analýzy směsi složek, ve kterém jsou na ose y odezvy detektoru (většinou v mV) a na ose x čas (nejčastěji minuty) nebo délkové jednotky. Axiální souřadnice, počet i tvar jednotlivých odezev (píků) je závislý na pracovních podmínkách analýzy a užití chromatografické koloně. Samotný záznam neposkytuje žádné informace o kvalitativním ani kvantitativním složení analyzovaného vzorku. Za definovaných podmínek GC analýzy je poloha píku, jeho retenční čas (t_r), pro daný analyt KONSTANTOU.

- 1) **Retenční čas (t_r):** doba od nástřiku analytu do injektoru po dosažení maxima jeho eluční křivky. Hodnota zmíněného parametru úzce souvisí s pracovními podmínkami, tj. závisí na teplotě, tlaku, průtokové rychlosti nosného plynu a typu stacionární fáze. Retenční čas je složen z tzv. retenčního času mrtvého (t_M) a redukovaného (t_r').
- 2) **Mrtvý retenční čas (t_M):** retenční čas analytu, který je unášen nosným plynem a neinteraguje se stacionární fází. Je určován analytem, jehož hodnota K_D je rovna nule.
- 3) **Redukovaný retenční čas (t_r'):** retenční čas analytu, který interaguje se stacionární fází, tedy je přímo úměrný hodnotě K_D .

$$t_r = t_M + t_r' \quad (2)$$

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato laboratorní úloha si klade za cíl rekapitulaci teoretického základu plynové chromatografie, seznámení s možnostmi metody GC především v oblasti kvantitativní analýzy a osvojení samostatné práce s plynovým chromatografem.

3.1 Zadání a úkoly

S přidělenými vzorky modelových reakční směsí, řešit následující úkoly:

- 1) Diskutovat s vedoucím práce možné složení předložených vzorků směsí.
- 2) Vybrat optimální teplotní program pro GC kolonu a vhodnou teplotu injektoru.
- 3) Zvolit vhodnou metodu pro kvantitativní analýzu vzorku, stanovení korekčních faktorů.
- 4) Určit hmotnostní složení vzorků.
- 5) Zjistit přítomnost složek, popř. kvalitativní složení modelové směsi.

3.2 Kvantitativní analýza

Tato laboratorní úloha klade důraz na vyhodnocovací metody kvantitativní analýzy v plynové chromatografii. Nutným předpokladem exaktní analýzy je **linearita odezvy detektoru** v dané koncentrační oblasti, kdy výška píku, lépe jeho plocha, je přímo úměrná koncentraci (hmotn. %) analytu. Pro stanovení koncentrace, obsahu analytu v matrici je ale nutné odezvu detektoru kalibrovat. Výsledkem je kalibrační přímka, jejíž rovnice **(3)** popisuje závislost plochy (odezvy) píku y na koncentraci standardu x .

$$y = a + b \cdot x \quad (3)$$

3.2.1 Metody kvantitativní analýzy

V chromatografické praxi kvantitativní analýzou rozumíme stanovení koncentrace jednotlivých složek analyzovaného vzorku. V plynové chromatografii, při aplikaci kapilárních kolon, se koncentrace analytů ve vzorcích může pohybovat v oblasti nanogramů až pikogramů. Pro exaktnost analýzy je proto klíčový již odběr vzorku, jeho ředění, popř. homogenizace, způsob a velikost dávkování, nebo jeho derivatizace. Pro úspěšné řešení daného analytického problému je možné zvolit některý z následujících postupů:

Metoda vnitřní normalizace^[1, 3]

Předpokladem pro použití této metody je, že všechny komponenty reakční směsi jsou známy, tj. dochází k eluci a detekci všech jejích složek. Koncentrace analytu se stanoví dle následujícího vztahu:

$$w_i = \frac{m_i}{\sum_{j=1}^n m_j} = \frac{k_i \cdot A_i}{\sum_{j=1}^n k_j \cdot A_j} \quad (4)$$

Pokud zvolíme jednu sloučeninu za referenční s korekčním faktorem (k_k) rovným jedné, pak je možné vypočítat ostatní korekční faktory vzhledem k této látce. Korekční faktory je nutné experimentálně stanovit, tedy navázat kalibrační směsi, podrobit chromatografické analýze a ze získaných ploch píků, vypočítat korekční faktory dle vztahu:

$$k_i = \frac{m_i \cdot A_k}{m_k \cdot A_i} \cdot k_k \quad k_k = 1 \quad (5)$$

Výhodou metody vnitřní normalizace je, že ji lze použít tam, kde nemůžeme nebo nejsme schopni zjistit přesný objem nástřiku (např. při použití děliče toku).

Metoda vnitřního standardu^[1, 3]

Tato metoda je založena na přidavku určitého množství známé látky (vnitřního standardu) do vzorku. Tato látka nesmí být přítomna ve vzorku, dále nesmí reagovat s žádnou jeho složkou, nesmí docházet ke koincidenci retenčního času vnitřního standardu s ret. časy

jednotlivých složek směsi. Ke známému množství analyzovaného vzorku přidáme přesně známé množství standardu m_{st} a po určení plochy jeho píku A_{st} a píku stanovované složky A_i počítáme hmotnosti hledané složky dle vztahu:

$$m_i = m_{st} \cdot \frac{k_i \cdot A_i}{k_{st} \cdot A_{st}} \quad k_{st} = 1 \quad (6)$$

$$w_i = \frac{m_i}{m_{\text{vzorku (bez standardu)}}} \quad (7)$$

Korekční faktory vzhledem k vnitřnímu standardu je nutno experimentálně stanovit předem. To znamená přesně navážít kalibrační směsi (standard + jednotlivé složky), ty podrobit chromatografické analýze, zjistit plochy píků a vypočítat korekční faktory (k_i) vyjádřením ze vztahu (6). Výhodou této metody je, že není třeba znát přesný objem dávkovaného vzorku a možnost stanovení chromatograficky nedekovatelných podílů ve směsi (např. reakční vodu). Metoda vnitřního standardu eliminuje i vliv změn pracovních podmínek, neboť stanovovaná látka a vnitřní standard jsou těmito změnami stejně ovlivněny.

Metoda absolutní kalibrace (vnějšího standardu)^[1, 3]

Metoda se zakládá na stanovení absolutní koncentrace látky pomocí kalibrační závislosti. Jedná se o univerzální metodu, kde je klíčový objem nástřiku vzorku. Metoda závisí na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů, výhodou je práce s autosamplerem.

Metoda standardního přídavku^[1, 2, 3]

Postup je podobný jako při metodě vnitřního standardu jen s tím rozdílem, že zde se přidává již složka (standard), která je obsažená ve vzorku. Základním rysem této techniky je provedení dvou nástřiků, zpravidla nástřiku původního vzorku a vzorku s přidáním známým množstvím čisté stanovované složky. Do kolony se dávákuje definovaný objem vzorku o neznámé koncentraci stanovované složky c_i kdy výstupem je plocha píku A_i . K definovanému objemu vzorku se přidá definované množství složky i jako standardu ($c_{i,s}$). Do kolony se nadávákuje stejný objem vzniklé směsi a výstupem je zvětšená plocha píku $A_{i,s}$. Za předpokladu,

že přidání objemu roztoku standardu nezpůsobí významnou změnu objemu vzorku, můžeme určit neznámou koncentraci i -té složky c_i ze vztahu:

$$c_i = \frac{c_{i,s} \cdot A_i}{A_{i,s} - A_i} \quad (8)$$

Opět jako v případě metody absolutní kalibrace, metoda závisí na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů.

3.3 Zadaný modelový systém

V rámci tohoto laboratorního úkolu budou analyzovány vzorky modelových směsí.

Tabulka 1: Teploty varu složek reakční směsi z hydrogenace anilinu.

<i>Látka</i>	<i>Teplota varu [°C]*</i>
methanol	64,7
ethanol	78,3
1-propanol	97,1
isopropanol	82,3
n-butanol	117,7
aceton	56,5

*Teploty varu jsou převzaty z literatury.

3.4 Pracovní postup a zpracování protokolu

- 1) Přezkoušení teoretických základů z plynové chromatografie a seznámení s praktickou manipulací s GC chromatografem.
- 2) Nastavit vhodnou teplotu injektoru (viz **tab. 1**) a pozorovat vliv pracovní teploty na dělení složek směsi na dané kapilární koloně. Určit při jaké pracovní teplotě kolony je

dělení nejlepší. Vyzkoušejte teploty v tomto pořadí 100, 60 a 40 °C. S vedoucím práce diskutujte zaznamenané píky, tj. kterým hlavním složkám systému náleží.

- 3) Na základě informací o systému zvolte jednu z metod pro kvantitativní analýzu a vysvětlete proč.
- 4) U vybrané metody určete korekční faktory k referenční látce (tj. k jedné složek přítomné ve směsích či ke standardu).
- 5) V případě, že budete uvažovat o metodě vnitřního standardu, zvolte po diskusi s vedoucím vhodnou látku z nabídky standardů.
- 6) Pomocí zvolené metody určete složení vzorku reálných směsí (v hmotn. %).

Protokol vypracujte a zašlete vedoucímu práce nejlépe do příštího týdne. Pro úspěšné absolvování této typové práce musí protokol obsahovat tyto body:

- 1) **Úvod:** velmi stručně popsat metodu plynové chromatografie.
- 2) **Cíl práce:** jasně vymezit cíle této typové úlohy.
- 3) **Experimentální část:** uvést použité chemikálie, přístroje, specifikovat experimentální a vyhodnocovací postupy včetně příslušných vztahů.
- 4) **Výsledky a diskuze:** v tomto oddíle zdůvodnit veškerá rozhodnutí (při hledání optimálních podmínek analýz a výběr vyhodnocovací metody), uvést hodnoty korekčních faktorů, kvantifikovat složení vzorků reakčních směsí (pokud vzorky obsahují Vám neznámé látky, uveďte i jejich koncentraci), příklady výpočtů. Získaná data prezentovat formou tabulek.
- 5) **Závěr:** stručně shrnout získané výsledky.

3.5 Specifikace chromatografu

Tabulka 2: Specifikace plynového chromatografu SHIMADZU GC-2010.

Integrátor	Chromatografická datastanice Clarity
Detektor	FID
Kolona	Kapilární, Rxi-624Sil MS, Restek
Délka kolony	30 m
Vnitřní průměr kolony	0,25 mm

Tloušťka filmu	1,4 μm
Teplota kolony	80 $^{\circ}\text{C}$
Teplota injektoru	250 $^{\circ}\text{C}$
Split	93
Tlak plynu - vzduch	65 kPa
Tlak plynu - helium	75 kPa
Tlak plynu - vodík	80 kPa
Nástřik vzorku	0,2 μl
Maximální pracovní teplota kolony	340 $^{\circ}\text{C}$

4. DOPLŇUJÍCÍ LITERATURA

1. Kolektiv Autorů: *Laboratoř oboru - organická technologie*; SNTL: Praha, 1985.
2. Novák, J. Kvantitativní analýza plynovou chromatografií. *Chem. Listy* **1968**, 62, 1281.
3. Volka, K. *Analytická chemie II*; VŠCHT Praha, 1995.
4. Záruba K. a spol. *Analytická chemie 1. díl*, 1st ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.

5. TIPY A OTÁZKY

- Veškeré vzorky řed'te před analýzou vhodným ředidlem v přibližném objemovém poměru 1:1. K analýzám používejte jen malá množství vzorků, cca 0,5-1 ml vzorku reakční směsi převed'te ze zásobní láhve do lékovky a nařed'te..
- Při práci používejte ochranné pomůcky, tj. laboratorní plášť, brýle a rukavice.
- Pro jaké účely je metoda plynové chromatografie (GC) používána? Stručný popis techniky plynové chromatografie?
- Proč nelze použít kyslík jako nosný plyn? Jaká jsou kritéria výběru nosného plynu?
- Možné příčiny poklesu kvality dělení složek analyzovaného vzorku?
- Jaký je rozdíl mezi FI- a TC-detektorem (z pohledu rozdílů co ne/mohou detekovat)?
- Definice retenčního času a na čem tento parametr závisí?
- Co znamená oblast linearit odezvy detektoru na množství stanovované látky? Proč je důležité ji znát při použití metody vnitřní normalizace nebo vnitřního standardu?

- Co je předpokladem pro použití metody vnitřní normalizace? Přednost této metody?
- Jaké podmínky musí splňovat vnitřní standard? Výhoda metody vnitřního standardu?
- Na čem závisí metoda absolutní kalibrace a standardního přídatku?