

# Plynová chromatografie

## Teoretická část

### 1. Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýzou vzorku rozumíme určení složení vzorku, neboli zjištění, ze kterých složek se vzorek skládá. Základním parametrem, kterým lze popsat složku v plynové chromatografii (dále jen GC), je její retenční čas, resp. redukovaný retenční čas. Jelikož tyto veličiny jsou závislé na experimentálních podmínkách (rozměry kolony, průtoková rychlost nosného plynu, teplota kolony, tlakový spád na koloně), nelze srovnávat výsledky získané za různých experimentálních podmínek. Aby byla retenční data obecně srovnatelná, bylo navrženo užívat buď specifických retenčních objemů, nebo vyjadřovat retenci relativně ke standardům.

Nejrozšířenějším způsobem je užití relativních retenčních dat, kdy je retence sledované látky srovnávána se standardem, který je součástí vzorku, nebo je alespoň chromatografován za stejných podmínek. Relativní retenci vzorku lze navíc určit přímo z chromatogramu. Nejjednodušším způsobem vyjádření *relativní retence* je poměr korigovaných retenčních časů  $t_R'$ :

$$r_{12} = \frac{t'_{R_1}}{t'_{R_2}} \quad (1.)$$

Vyjádřením retence relativně ke standardu se vyloučí chyby vzniklé nepřesným měřením pracovních podmínek i parametrů kolony.

Pro určení redukovaných veličin je nezbytné znát hodnotu *mrtvého retenčního času*  $t_M$ . Mrtvý retenční čas se obvykle určuje jako retenční čas látky, která není v koloně zadržována. Při obvyklých teplotách používaných v GC měříme  $t_M$  jako retenční čas inertního plynu. Ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem (FID) však nelze inertní plyn použít, neboť neposkytuje signál, a proto se běžně určuje  $t_M$  jako retenční čas metanu.

### **1.1 Retenční shoda se standardem**

Jestliže mají standard a stanovovaná látka rozdílné retenční chování, pak lze jednoznačně tvrdit, že jde o různá chemická individua. Naopak shoda retenčních dat ještě není důkazem identity standardu a sledované látky. Teprve opětovná shoda retenčních dat, ale tentokrát na jiné stacionární fázi, svědčí o vysoké pravděpodobnosti totožnosti obou látek. Někdy lze identifikovat látky na základě shody retenčních dat s hodnotami publikovanými v literatuře.

## **2. Kvantitativní analýza**

Kvantitativní analýzou rozumíme určení množství nebo koncentrací jednotlivých složek ve vzorku. Veličinou charakterizující množství vzorku prošlého detektorem je plocha píku (za předpokladu práce v lineární části závislosti signálu detektoru na množství či koncentraci vzorku). Určování ploch píků je proto důležitým krokem kvantitativní chromatografické analýzy. Použitím digitálních integrátorů a počítačů se tento krok podstatně zjednodušil. Je ovšem třeba mít alespoň základní znalosti o funkci a činnosti integrátorů, aby bylo možno kriticky posoudit jimi poskytované výsledky a včas tak odhalit možnou poruchu. Důležitým parametrem určování ploch píků je také správné určení průběhu základní linie. Mnohdy nevhodně nastavené parametry integrátoru pro základní linii způsobí velkou chybu stanovení plochy. Plynová chromatografie, zvláště pak kapilární, pracuje s množstvími vzorku běžně v nanogramové a pikogramové oblasti. Proto se zvláště kritickými kroky staly příprava a dávkování vzorků. Pod přípravou vzorku je rozuměna řada kroků od odběru reprezentativního vzorku, přes případnou derivatizaci až po ředění vzorku před nástřikem. Jakákoliv chyba během kteréhokoliv z uvedených kroků vnese samozřejmě chybu do konečného výsledku stanovení. Rozbor chyb, pojmy reprodukovatelnost, správnost a přesnost v GC najdou posluchači v odborné literatuře.

## **3. Pracovní techniky kvantitativní analýzy v GC**

V tomto odstavci je uveden výčet metod používaných v kvantitativních měřeních v GC.

### **a) *Metoda absolutní kalibrace***

- 1) Technika přímého srovnání
- 2) Technika kalibrační křivky

**b) *Metoda vnitřního standardu***

- 1) Technika přímého srovnání
- 2) Technika kalibrační křivky

**c) *Metoda standardního přídatku***

- 1) Technika přímého měření dávkovaného vzorku
- 2) Technika využívající pomocného standardu přítomného v původním vzorku
- 3) Technika používající přídatku pomocné referenční látky

**d) *Metoda vnitřní normalizace***

**e) *Metoda kontrolované vnitřní normalizace***

Metoda standardního přídatku s pomocnou referenční látkou přítomnou v původním vzorku (c2) je obměnou metody vnitřního standardu s tím rozdílem, že zde jako vnitřní standard slouží přímo stanovovaná látka. Proto musí být provedeny minimálně dvě analýzy - jedna originálního vzorku a druhá vzorku s přidaným standardem. Jako pomocná referenční látka je využita jakákoliv látka přítomná v původním vzorku, která je za daných pracovních podmínek dostatečně rozlišena od stanovované látky. Je výhodné využít takovou referenční látku, jejíž plocha píku je srovnatelná s plochou píku stanovované látky. Principem metody je postup, kdy po analýze původního vzorku, která poskytne plochu píku  $A_i$  stanovované látky, se ke známému množství resp. objemu tohoto vzorku přidá přesně známé množství stanovované látky, která slouží jako standard, a analýzou tohoto směsného vzorku obdržíme plochu  $A_i'$ , která odpovídá sumě námi přidaného množství a původního množství látky. Současně s přidáním standardu dojde k naředění původního vzorku. Toto naředění se projeví poklesem plochy pomocné referenční látky  $A_p$ . V metodě standardního přídatku s použitím pomocné referenční látky přítomné v původním vzorku se ke sledování ředění užívá právě této pomocné složky. Pokud totiž budeme do vztahů dosazovat místo absolutních hodnot ploch piků (a kdy bychom také museli přesně znát dávkované objemy vzorků) relativní hodnoty ploch piků vztažených na uvedenou pomocnou látku (kdy nezáleží na dávkovaném objemu vzorku), nemusíme brát ředění na zřetel. Prvním krokem je nástřik původního vzorku. Pokud vzorek obsahuje komponentu,

která je za daných experimentálních podmínek dostatečně oddělena od ostatních složek, lze tuto látku použít jako pomocný standard. K vyjadřování složení vzorku můžeme použít následující veličiny: hmotnostní koncentraci  $c_m(i)$  (g/ml), hmotnostní zlomek  $x_m(i)$ , molární koncentraci  $c(i)$  (mol/l) nebo molární zlomek  $x(i)$ . Potom základní vztah mezi plochou píku a odpovídajícím množstvím stanovované látky lze vyjádřit vztahem:

$$A_i \cdot f_i = C \cdot m_i \quad (4.)$$

kde  $A_i$  je plocha píku,  $f_i$  je převrácená hodnota relativní specifické odezvy detektoru ke složce  $i$ ,  $C$  je konstanta nezávislá na množství a druhu dávkovaného vzorku a  $m_i$  je hmotnost vzorku  $i$  přítomného v nadávkovaném objemu  $v(i)$ . V konstantě  $C$  je zahrnut i faktor snížení citlivosti detektoru (attenuation, ATT) respektive jeho nastaveného rozsahu (range).

Druhou variantou stejné metody je grafické určení  $x_{m,i}$ . Při této metodě vynášíme podíl ploch  $A_i$  a  $A_p$  pro jednotlivé přídavky standardu oproti koncentraci standardu ve vzorku. Nevýhodou této metody je, že výsledek musí být získán extrapolací kalibrační křivky do průsečíku s osou  $x$ . Proto je obzvláště kritické správně rozvrhnout jednotlivé přídavky standardu, abychom maximálně zvýšili přesnost stanovení.

## Poděkování

Základ tohoto studijního materiálu byl převzat z katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## Praktická část

### 4. Úkoly

- 1) Zapnout plynový chromatograf, počítač a nastavit optimální pracovní podmínky podle pokynů pedagogického dozoru.
- 2) U zadaných čistých sloučenin proměřit orientačně jejich retenční časy.
- 3) U připravené směsi proměřit  $t_R$  všech složek a zjistit tak její složení.