

PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

P. ZACHAŘ, D. SÝKORA

Obecné základy

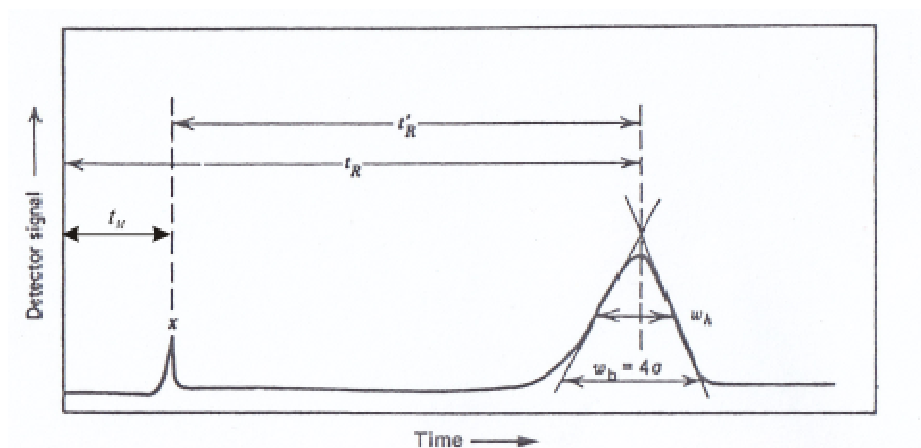
Plynová chromatografie je metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. Metoda je založena na rozdělování složek mezi dvě fáze, fázi **pohyblivou - mobilní** a fázi **nepohyblivou - stacionární**.

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 nanosená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanosená 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 - **nástříkové 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 přicházejícím nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Každá složka 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 (a jeho výška) je úměrná množství látky ve vzorku.

V chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x čas. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar Gaussovy distribuce a je popsán třemi parametry: retenčním časem t_R , výškou píku h a šířkou píku měřenou buď na základní linii w_d nebo v polovině výšky píku w_h (obr. 1).



Obr.1. Retenční parametry chromatografického píku

Retenční čas t_R [min] je doba průchodu látky kolonou, tj. doba od nástřiku vzorku na kolonu k dosažení vrcholu píku na detektoru.

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]

$$V_R = F_m t_R \quad (1)$$

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

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 t'_R , V'_R lze získat tak, že se odečte mrtvý čas, resp. objem, od retenčního času, resp. objemu, složky, tedy

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (3)$$

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

$$n = 5.545 (t_R/w_h)^2 \quad (4)$$

kde t_R [min] je retenční čas, w_h [min] je šířka píku v polovině výšky.

Jestliže známe délku kolony L [cm], můžeme vypočítat i **výšku patra** H [cm]

$$H = \frac{L}{n} \quad (5)$$

Kvalitativní analýza

Základem pro identifikaci látek při plynově chromatografické analýze je shoda hodnot 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

$$I_x = 100z + 100 \frac{\log t'_x - \log t'_z}{\log t'_{z+1} - \log t'_z} \quad (6)$$

kde t'_x , t'_z , t'_{z+1} jsou redukované retenční časy neznámé látky x , n -alkanu se z uhlíky a $z+1$ uhlíky v molekule. Vzorec platí obecně pro každou dvojici z a $z+1$, i když nejvhodnější je volit takovou dvojici standardů, aby se retenční čas sledované látky příliš nelišil od retenčních časů zvolených standardů. Optimální je případ, kdy $t'_z < t'_x < t'_{z+1}$.

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 v chromatogramu současně tzv. **hmotnostní spektrum**. Pokud jsou k ionizaci použity elektrony (tzv. elektronová ionizace, EI) poskytuje analyzovaná látka obvykle ion-radikál, odpovídající ionizované molekule ($M^{+\cdot}$) a fragmentové ionty, odpovídající částem rozpadající se molekuly. Získaná spektra se porovnají se spektry tabelovanými a látka může být 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.

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 (interního 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

$$A_x = k_x \cdot m_x \quad (7)$$

kde A_x je plocha píku složky x , k_x je konstanta úměrnosti pro danou látku x , a m_x je hmotnost látky x ,

pro vnitřní standard platí podobně

$$A_S = k_S \cdot m_S \quad (8)$$

kde A_S je plocha píku složky interního standardu, k_S je konstanta úměrnosti pro interní standard, a m_S je hmotnost interního standardu,

Pro poměr ploch jejich píků lze psát

$$A_S/A_X = k_S \cdot m_S / k_X \cdot m_X = f \cdot (m_S/m_X) \quad (9)$$

Při kvantitativním stanovení složky ve vzorku metodou interního standardu se nejprve z analýzy kalibrační směsi o známých hmotnostech vnitřního standardu a složky vypočítá hodnota poměru k_S/k_X , která se nazývá **odezvodový faktor f** . Následně se z analýzy vzorku s neznámým obsahem složky a s přidáním IS vypočítá hmotnost analytu ve vzorku s využitím odezvodového faktoru f a navažky IS. Nakonec se množství složky ve vzorku vyjádří formou hmotnostního zlomku stanovované složky.

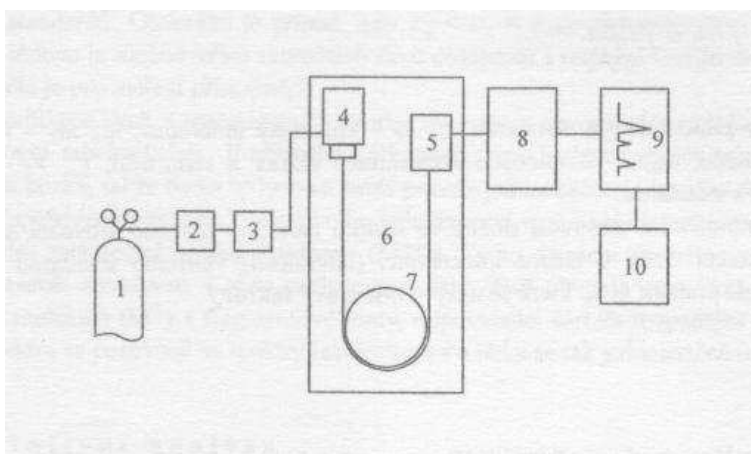
Plynový chromatograf

Schéma plynového chromatografu je uvedeno na obr. 2. Nosný plyn je odebírán z tlakové láhve nebo generátoru nosného plynu (1) přes redukční ventil. Po průchodu elektronicky nastavitelnými regulátory tlaku (2 a 3) přichází nosný plyn do injektoru (4). V injektoru se do proudu nosného plynu dává vzorek speciální mikrostříkačkou. Injektor je vyhříván na takovou teplotu, aby v něm došlo k okamžitému zplynění vzorku. Teplota injektoru ale nesmí být příliš vysoká, aby nedošlo k rozkladu analyzovaných látek. Obvyklá teplota na injektoru se pohybuje v rozmezí asi 150-350 °C. 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 datastanicí s monitorem (9+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 pokračuje 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, tzv. make-up gas, (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 stanovené látky v nosném plynu, závisí však na její struktuře.



Obr.2. Schema plynového chromatografu

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

N á v o d l a b o r a t o r n í p r á c e :

Analýza směsi látek plynovou chromatografií

Úkoly

1. Stanovte retenční indexy *I* složek ve vzorku A a složky identifikujte.
2. Stanovte hmotnostní zlomek (% hm.) *p*-xyleny v technické směsi aromatických uhlovodíků (vzorek B).

3. Určete počet teoretických pater n a výšku patra kolony H pro n-nonan.
4. Zhodnoťte výsledky.

Přístroje

V laboratoři jsou používány plynové chromatografy Scion 436-GC s plamenově ionizačním detektorem a kapilární kolonou. Datastanice je vybavena SW Compass CDS s možností ukládání pracovních metod. Signál z plynového chromatografu je zaznamenáván také pomocí datastanice.

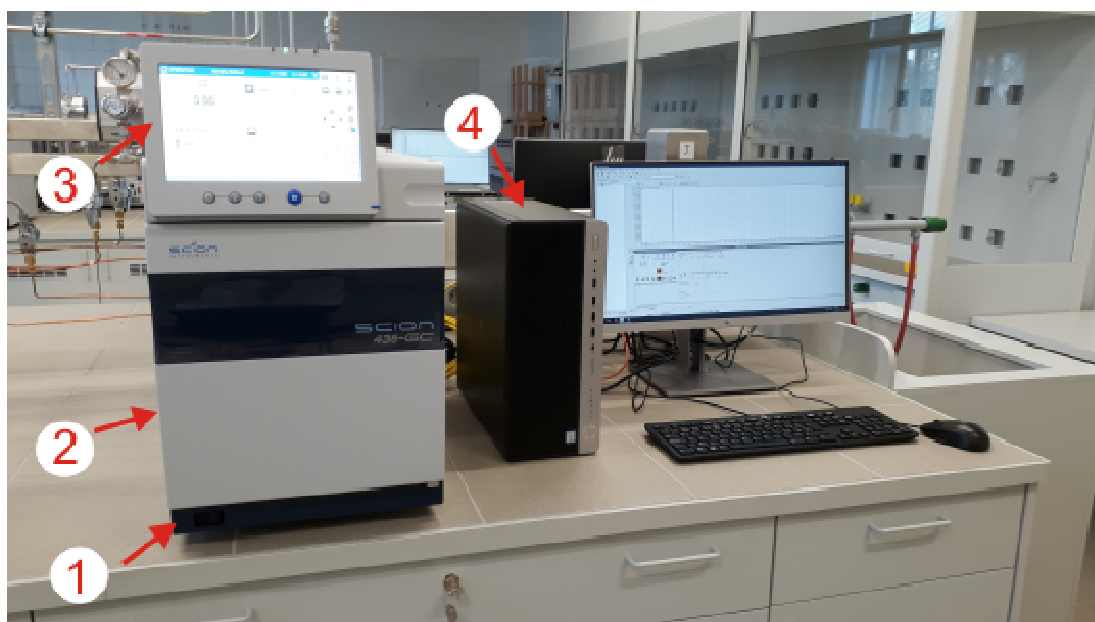
Kolona

V přístroji je použita křemenná kapilární kolona Scion-1MS s nepolární stacionární fází, délka kolony je 15 m, vnitřní průměr 250 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 Scion 436-GC je vybaven plně elektronickým nastavením tlaků a průtoků plynů. Síťový vypínač (1) je umístěn vlevo dole na přední straně instrumentu. Průtoky plynů se nastavují v rámci metod na datastanici. Na horní části chromatografu je umístěn injektor a pod krytem detektor. Komunikaci s přístrojem zprostředkovává buď dotykový displej (3) nebo datastanice (4). Datastanice zajišťuje obousměrnou komunikaci s plynovým chromatografem prostřednictvím SW Compass CDS.



Obr.3. Plynový chromatograf Scion 436-GC

1 - síťový vypínač; 2 - plynový chromatograf; 3 - dotykový displej; 4 - datastanice

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, spuštěná metoda **Startup-FID**, která umožní ustálení tepelného režimu injektoru, kolony i detektoru a je zapálen plamínek detektoru.

Dávkování kapalného vzorku

Kapaliny dávkuje injekční mikrostříkačkou o objemu 10 μ l. Mikrostříkačku několikrát vypláchneme dávkovanou kapalinou. Poté nasajeme do mikrostříkačky požadovaný objem (1 μ l). 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. Úloha 1 - Stanovení retenčních indexů / složek vzorku A a jejich identifikace

a) Kontrola a nastavení metody **GC_Method_1**

Metoda **GC_Method_1** obsahuje požadované parametry instrumentu, tedy teplotu injektoru, dělicí poměr na nástřiku, teplotu kolony, teplotní program na koloně, parametry na detektoru atd.

Vlevo nahoře v hlavním menu ovládacího programu klikněte na *File* a pak vyberte *Open* a následně *Open Method* a vyberte metodu nazvanou **GC_Method_1.meth**. Dole vlevo se objeví množství položek a klikněte hned na první *control*. V hlavní části obrazovky se objeví schematické zobrazení GC systému a kliknutím na jednotlivé ikony částí GC lze procházet nastavené parametry na jednotlivých částech GC a případně je upravovat podle potřeby. Postupně je třeba zkontrolovat, případně přenastavit následující parametry:

Na injektoru je třeba zaškrtnout položku *Heater (On)*, *Set point* musí být nastaven na **200 °C**, *Split state* musí být nastaven na **ON**, *Split ratio* na **100**. Vzorek tedy bude při nástřiku v injektoru dělen mezi kolonu a odpad v poměru 1:100.

Dále klikněte na položku *Oven* a upravte parametry teplotního gradientu následovně, položka *Heater (On)* musí být zaškrtnuta, výchozí (počáteční) teplotu kolony nastavte na **40 °C**, ve sloupečku *Time* vložte číslo **5**, na druhý řádek tabulky do položky *Rate* vložte číslo **7** a do sloupečku *Temperature* **80** a do sloupce *Time* **0**. Takto zadané parametry znamenají, že počáteční teplota na koloně v okamžiku nástřiku bude 40 °C, a pak se na této teplotě bude držet ještě 5 minut, následně se bude zvyšovat rychlostí 7 °C za minutu až do 80 °C. Po dosažení teploty 80 °C bude snížena zpět na počáteční hodnotu 40 °C.

Dále klikněte na položku *Column pneumatic*, zkontrolujte, že je zaškrtnutá položka *Enabled (ON)*, dále že je vybráno *Constant flow*, a průtok nastaven na **1 ml min⁻¹**, a dále, že položka *Pressure pulse* není zaškrtnutá. Tím je nastaveno, že během separace je využívána elektronická kontrola tlaku a průtoku plynů a že se pracuje při konstantním průtoku 1 ml min⁻¹ nezávisle na tlaku na koloně. Případný tlakový pulz při nástřiku na kolonu není aplikován.

Pak otevřete sekci nazvanou *Detectors* a zkontrolujte, že je zaškrtnutá položka *Heater (On)*, *Setpoint* je nastaven na **200 °C**, položka *Electronics (On)* musí být zaškrtnutá a *Time constant* je zvolena *Slow*. Dále v prvním řádku tabulky musí být ve sloupci *Range* vloženo číslo **12** a ve sloupečku *Autozero* nastaveno **Yes**. Číslo 12 znamená, že se bude měřit s maximální citlivostí instrumentu. Při nástřiku bude provedeno vynulování základní linie chromatogramu. **Zkontrolovanou a upravenou metodu je třeba uložit kliknutím na *File, Save, Save Method*.**

V horní části dále vyberte položku *Acquisition* a zvolte *Quick Start*. Objeví se položka ukazující jméno systému a nabídka metod, které mohou být použity pro následnou analýzu. Vyberte metodu *GC_Method_1.meth*. Objeví se nová obrazovka, ve které je potřeba vyplnit název budoucího chromatogramu v položce označené *Run Name*.

Název chromatogramu utvořte následovně:

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 názvu uvést číslo nástřiku, protože někdy je třeba nástřik opakovat.

b) Nástřik vzorku

Počkejte až na dispeji GC instrumentu začne svítit zelená LED, následně můžete nastříkovat vzorek.

Postupně proveďte 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 naberte 0,5 μ l směsi n-alkanů a pak 0,5 μ l vzorku A. Tím získáte přímo ve stříkačce směs, kterou okamžitě dávkuje.

Analýzu směsi n-alkanů a vzorku A proveďte jen jednou, a analýzu směsi **proved'te 2x**.

2. Vyhodnocení výsledků úlohy 1

Z chromatogramů n-alkanů a vzorku A odečtěte retenční časy jednotlivých píků včetně píku rozpouštědla. To proveďte následujícím postupem. Vlevo dole klikněte na záložku označenou *Data*. Následně klikněte postupně vlevo nahoře na *File*, *Open*, *Open Chromatogram* a vyberte příslušný chromatogram z naměřených dat. Pak v levé horní části pod názvem chromatogramu kliknete na *results*. Rozbalí se tabulka s výsledky obsahující vybrané parametry zintegrovaných píků včetně jejich retenčních časů, ploch (potřebných pro výpočet kvantity v následující úloze 2) a šířek v polovině výšky (pro výpočet účinnosti). Potřebné hodnoty si запиšte a použijte v protokolu.

Na základě odečtených hodnot v chromatogramu směsi n-alkanů se vzorkem A jednotlivé píky přiřadte standardům (hexan, heptan, oktan, nonan) a složkám vzorku a proveďte výpočet retenčních indexů *I*. K určení mrtvého času t_M slouží retenční čas prvního (malého) píku v chromatogramu předcházejícího největšímu, tzv. solventovému píku. Vypočtené retenční indexy porovnejte s tabelovanými daty, která jsou k dispozici v laboratoři a složky identifikujte. Správnost identifikace potvrďte porovnáním hmotnostních spekter složek vzorku A (jsou k dispozici v laboratoři pro všechny vzorky) s hmotnostními spektry v katalogu spekter (katalog je také k dispozici v laboratoři).

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

Pro měření tohoto úkolu je třeba využít mírně upravenou metodu GC používanou výše. Otevřete metodu **GC_Method_1** a upravte ji následovně: v sekci metody v položce *Oven* nastavte počáteční topotu kolony na **45 °C** a do sloupce *Time* napište číslo **2**, do druhého řádku a sloupce *Rate* napište číslo **7**, dále na stejném řádku do sloupce *Time* napište číslo **0**. **Následně upravenou metodu uložte příkazem Save**. Po nástřiku vzorku bude tedy teplota na koloně po dobu dvou minut držena na teplotě výchozí, a pak bude růst rychlostí 7 °C min⁻¹ do 80 °C. Po dosažení konečné teploty bude kolona rovnou zchlazena na 45 °C.

Stanovení proveďte metodou vnitřního standardu (internal standard, IS). Jako vnitřní standard se v úloze používá toluen. Ke kvantitativnímu vyhodnocení použijte plochy píků.

a) Příprava kalibračního roztoku

Do předem zvážené suché vialky nadávkujte stříkačkou cca 20 μ l *p*-xyleny a vialku zvažte. Pak přidejte cca 20 μ l toluenu (IS) a vialku znova zvažte. Ke směsi ve vialce přidejte pipetou 1 ml hexanu a roztok po uzavření vialky dobře promíchejte. Tím je připraven kalibrační roztok, který obsahuje v 1 ml m_{x1} g *p*-xyleny 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 odměřte stříkačkou cca 20 μ l koncentrované směsi aromatických uhlovodíků a vialku zvažte. Dále přidejte cca 20 μ l toluenu a znova vialku zvažte. Ke směsi přidejte pipetou 1 ml hexanu a roztok dobře promíchejte. Tím je připraven roztok vzorku obsahující m_{s2} g toluenu a m_{vz} g vzorku (navážka).

Postupně proved'te následující analýzy:

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

Názvy chromatogramů tvořte opět podobně jako v úloze 1 s tím, že:

Kalibrační roztok je označen => **KALX**

Roztok ke kvantifikaci => **BX**

Po první analýze kalibračního roztoku a kvantifikovaného vzorku B je především nejprve třeba správně identifikovat pík toluenu (IS) a *p*-xyleny, protože vzorek obsahuje i jiné látky. **Nástřik kalibrační směsi i vzorku B provedeme minimálně 2x.**

Po skončení uvedených dvou úkolů proved'te čistění kolony.

Za tím účelem nastříkněte 1 μ l hexanu a k separaci použijte metodu označenou GC_Method_2_cleaning.meth. Tato metoda je již předdefinována a zahrnuje potřebný teplotní program kolony 50°-200°C rychlostí 20 °C min⁻¹. Nástřik hexanu proved'te kliknutím na *Acquisition* a následně v *Method name* vyberte metodu GC_Method_2_cleaning.meth, pak klikněte na *OK*. Jakmile se objeví zelená LED na displeji GC můžete nastříknout 1 μ l hexanu. Chromatogram není nutno vyhodnocovat. Práce na plynovém chromatografu je tím ukončena. **Vypnutí přístroje provádí výhradně asistent nebo laborant.**

4. Vyhodnocení výsledků úlohy 2

V chromatogramu kalibračního roztoku odečteme plochy píků (Area) toluenu (A_{s1}) a *p*-xyleny (A_{x1}) a z těchto ploch a známých hmotností toluenu a *p*-xyleny vypočteme pro každé jednotlivé stanovení odezvový faktor f a následně vypočítáme jejich průměrnou hodnotu.

Z chromatogramu roztoku 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) přidávaného ke vzorku (m_{S2}) vypočteme hmotnost *p*-xylynu ve vzorku B, m_{x2} , a následně z navážky vzorku B, m_{vz} , 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).

5. Výpočet účinnosti chromatografické kolony

Z chromatogramu směsi n-alkanů, získaného v úkolu 1 odečteme retenční čas t_R a šířku píku v polovině výšky w_h (v datastanici označeno *width 50%*) pro n-nonan, spočítáme počet teoretických pater n podle vztahu (4) a výšku patra H podle vztahu (5). 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 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 návodu práce byl částečně využit zdroj:

J.Podehradská, Z.Vozňáková: *Návody pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II. Plynová chromatografie*. VŠCHT, Praha 1997.