

Plynová chromatografie

Kvalitativní a kvantitativní analýza Základní přednáška



RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Kvalitativní analýza

Plynová chromatografie

▪ **Separační metoda**

- ✴ omezené možnosti kvalitativní analýzy

▪ **Možnosti kvalitativní analýzy**

- ✴ Shoda retenčních časů látky se standardem
 - nedostačující podmínka identity látek
 - teprve shoda retenčních časů minimálně na dvou kolonách s různými SF znamená vysokou pravděpodobnost shody standardu s analytem
- ✴ Standard není k dispozici
 - využití retenčních dat
 - využití selektivních detektorů
 - využití derivatizačních reakcí nebo reakční GC
 - spojení GC se spektrálním přístrojem

Kvalitativní analýza

Chromatografická data používaná v kvalitativní analýze

- Absolutní retenční data

- ✱ retenční čas t_r , redukovaný retenční čas t_r' , retenční faktor k

- Relativní retenční data

- ✱ relativní retence r_{12} , Kovatsův retenční index I_x

- Retenční objemy

- ✱ retenční objem V_r , redukovaný retenční objem V_r' , specifický retenční objem V_g

- Termodynamické veličiny

- ✱ rozdělovací (distribuční) koeficient K_D

Všechny retenční údaje musí doprovázet informace o teplotě a druhu SF !

Kvalitativní analýza

Využití retenčních dat

■ Retenční čas

- ✱ závislý na experimentálních podmínkách
- ✱ nepřenositelný mezi přístroji

- t'_r - redukovaný retenční čas (min), t_M - retenční čas nesorbující se složky (min)

$$t_r = t'_r + t_M$$

■ Retenční faktor

- ✱ nezávislý na průtokové rychlosti

$$k = \frac{t'_r}{t_M} = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

■ Relativní retence

- ✱ závislý jen na typu SF, MF a teplotě
- k - retenční faktor

$$r_{12} = \frac{t'_{r1}}{t'_{r2}} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{V'_{r1}}{V'_{r2}}$$

■ Specifický retenční objem

- ✱ teoreticky exaktní veličina
- ✱ redukovaný retenční objem vztažený na 1 g SF, teplotu 0°C a korigovaný na stlačitelnost plynu

- j - korekční faktor na stlačitelnost plynů, m_{SF} - hmotnost SF na koloně, T_c - teplota kolony

$$V_g = \frac{V'_r \cdot j \cdot 273.15}{m_{SF} \cdot T_c}$$

Kvalitativní analýza

■ Specifický retenční objem

★ korekční faktor j

- p_i - tlak na vstupu kolony (Pa)
- p_0 - tlak na výstupu kolony (Pa)

$$j = \frac{3 \cdot \left(\frac{p_i}{p_0} \right)^2 - 1}{2 \cdot \left(\frac{p_i}{p_0} \right)^3 - 1}$$

★ praktické měření s použitím bublinkového průtokoměru

$$V_g = F_{MF} t'_r j \cdot \frac{(p_0 - p_{H_2O})}{101325} \cdot \frac{273.15}{m_{SF} T_c T_a}$$

- p_{H_2O} - tlak nasycených par vody (Pa) při teplotě T_a (K)
- F_m - průtoková rychlost MF na výstupu kolony (ml/min)

★ objem MF potřebný k eluci analytu z kolony, která je bez tlakového spádu, bez mrtvého objemu a obsahuje 1 g SF

★ v praxi se příliš neuplatnil

- přílišné rozdíly v kvalitě SF

Kvalitativní analýza

Retenční indexy I_x - izotermální

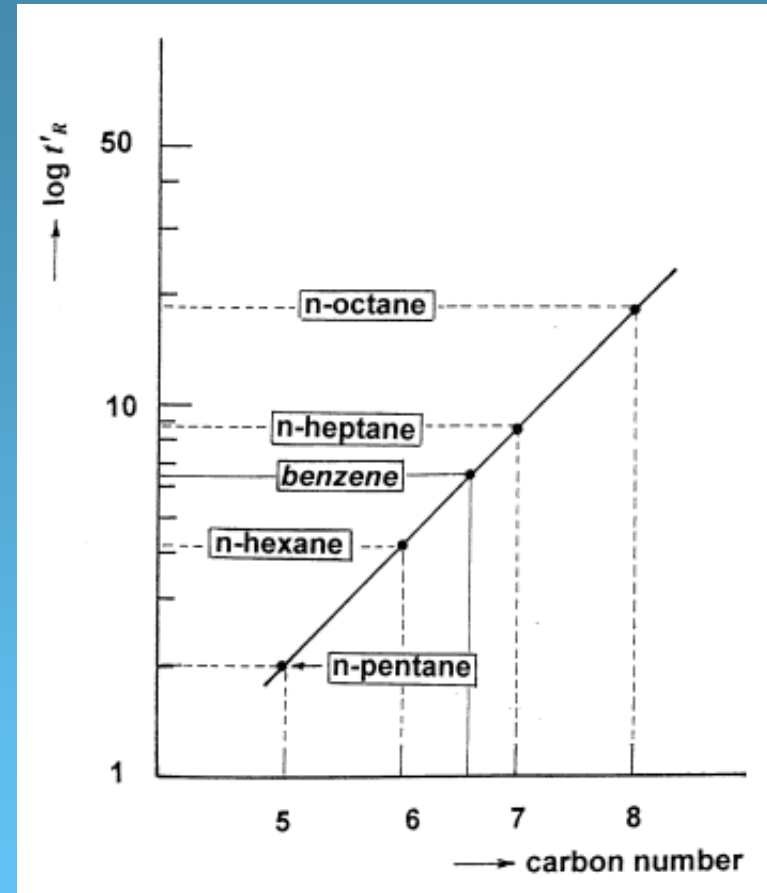
■ zavedeny Kovatsem (1958)

✱ princip

- logaritmy t'_r homologické řady rostou lineárně s počtem atomů C alkylového řetězce (mimo první dva členy h.řady)

$$\log t'_r = a \cdot n_C + b$$

- n_C - počet atomů C v molekule



Kvalitativní analýza

Izotermální analýza

- Korelace I_x s počtem atomů C

- ★ interakce $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ se SF

- Gibbsova energie rozpouštění analytu ve SF

$$\Delta G = \Delta G(\text{CH}_3) + n \cdot \Delta G(\text{CH}_2) + \Delta G(\text{X})$$

- jelikož ΔG koreluje s I_x

$$I = I(\text{CH}_3) + n \cdot I(\text{CH}_2) + I(\text{X})$$

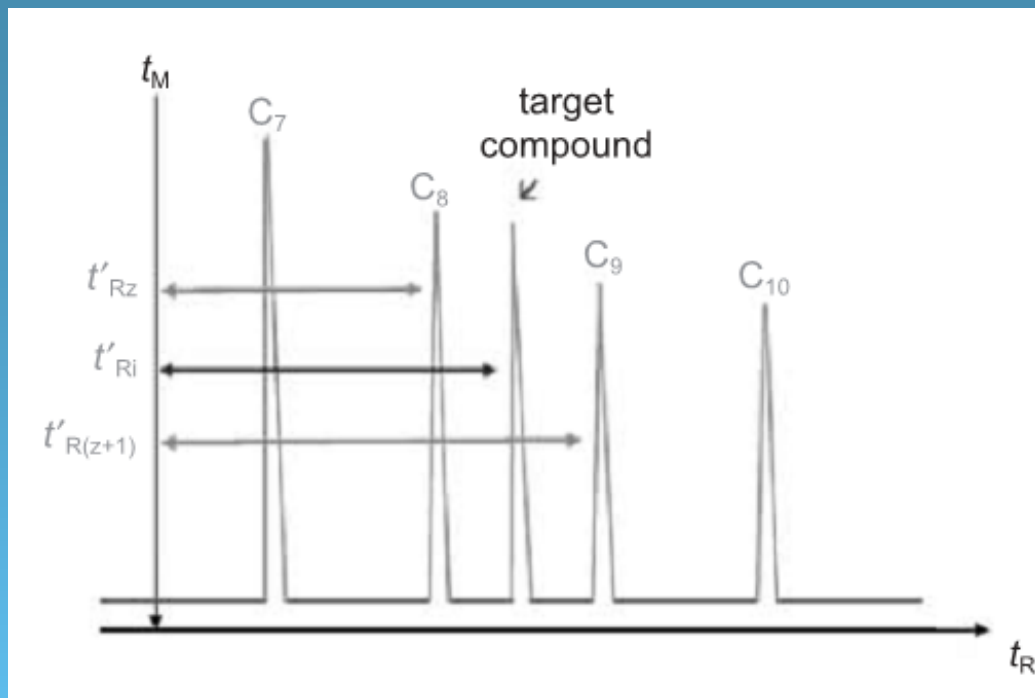
- ★ korelace $I_x - n_C$, b.v., M_r , tlak nasycených par, ...

- interpolace a extrapolace I_x pro členy homologických řad

Kvalitativní analýza

★ stupnice řady standardů - n-alkanů

- každému n-alkanu přiřazen index rovnající se $100n_C$
 - x - analyt, n, n+1 - n-alkany s n a n+1 atomy C v molekule
- přičemž musí platit: $t'_{r,n} < t'_{r,x} < t'_{r,n+1}$



$$I_x = 100 \frac{\log t'_{r,x} - \log t'_{r,n}}{\log t'_{r,n+1} - \log t'_{r,n}} + 100n$$

Kvalitativní analýza

Identifikace složek vzorku podle tabelovaných /

- spolehlivost závisí na

- ✱ reprodukovatelnosti naměřených /
- ✱ rozlišovací schopnosti použité kolony R_{ij}

- nejmenší rozdíl ΔI dvou rozlišitelných solutů i, j

$$\Delta I = I_j - I_i = \frac{400 R_{ij}}{\sqrt{n_{ef}} \ln r_{n+1,n}}$$

kde R_{ij} je rozlišení, n_{ef} je počet efektivních pater kolony a $r_{n+1,n}$ je eluční poměr alkanů s $n+1$ a n atomy uhlíku

- ✱ běžná přesnost $\Delta I = 5 - 10$
- ✱ standardizované podmínky $\Delta I = \pm 1$
 - postačují k identifikaci

Kvalitativní analýza

Identifikace složek vzorku podle elučních dat

- porovnání elučních údajů s údaji referenčních látek
 - ★ maximální dovolená chyba v elučních datech
 - v jejím rámci jsou data považována za totožná
 - ★ určitost se kterou lze analyt v píku identifikovat
 - je funkcí
 - přesnosti měřených dat
 - počtu předpokládaných složek ve vzorku n_p
 - rozlišovací schopnosti kolony R_{ij} (rozlišení)
 - pravděpodobnost výskytu n-solutů v pících eluujících v rozmezí t_M až t_r

$$p_n = \frac{e^{-\rho} \cdot \rho^n}{n!}$$

kde ρ je hustota píků eluujících na chromatogramu za čas t_r

$$\rho = \frac{n_p \cdot \Delta t_r}{t_r - t_M}$$

kde n_p je předpokládaný počet složek, které by měly eluovat v čase $t_r - t_M$, Δt_r je nejmenší rozdíl ret.časů složek i a j , které je kolona schopna spolehlivě rozlišit s rozlišením R_{ij}

Kvalitativní analýza

Identifikace složek vzorku podle elučních dat

- porovnání elučních údajů s údaji referenčních látek

- rozlišení

$$R_{ij} = \frac{2\Delta t}{Y_i + Y_j} \approx \frac{\Delta t_r}{Y_j}$$

kde Y je šířka píku při základně

- pokud je požadováno $R_{ij} = 1$ a za předpokladu dostatečně dlouhé analýzy, kdy $t_r - t_M \approx t_r$ a

$$Y_j = \frac{4t_{r,j}}{\sqrt{n_j}}$$

dostáváme

$$\rho = \frac{4n_p}{\sqrt{n_j}}$$

kde n_p je předpokládaný počet složek, které by měly eluovat v čase $t_r - t_M$, n_j je počet teoretický pater kolony pro složku j

Kvalitativní analýza

Pravděpodobnost eluce v intervalu Δt_r

- žádného či jednoho solutu

$$p_0 + p_1 = e^{-\rho}(1 + \rho)$$

- dvou nebo více solutů

$$p_{>2} = 1 - e^{-\rho}(1 + \rho)$$

Pravděpodobnost současné eluce dvou a více solutů na dvou kolonách o různé polaritě

- vzorek je analyzován na kolonách A a B různé polarity

$$p_{>2}(A + B) = p_{>2}(A) \cdot p_{>2}(B)$$

- je podstatně menší než při analýze vzorku na jedné koloně

Kvalitativní analýza

Izotermální analýza

- referenční materiály nejsou k dispozici
- publikované hodnoty I_x nejsou k dispozici
- korelace mezi elučními údaji a strukturou analytů

- ★ $\log(t_r')$ - počet atomů C (n_C)
- ★ $\log(t_r')$ - teplota varu, tlak nasycených par
- ★ $\log(t_r')_A - \log(t_r')_B$ A, B - různé SF
- ★ místo t_r' lze použít i V_g

$$\log V_g = \log \frac{273 R}{M_s} + 0.22 k \left(\frac{T_b}{T} - 1 \right) - 2.9 - \log \gamma_i^\infty$$

- k - Troutonův poměr, T_b - teplota varu analytu, M_s - molekulová hmotnost SF, γ_i - aktivní koeficient analytu při nekonečném zředění
- pro homologické řady látek - přímkové závislosti
 - směrnice charakterizuje homologickou řadu, SF a T
- závislosti obecně nelineární
 - bez prvních členů homologických řad jsou prakticky lineární

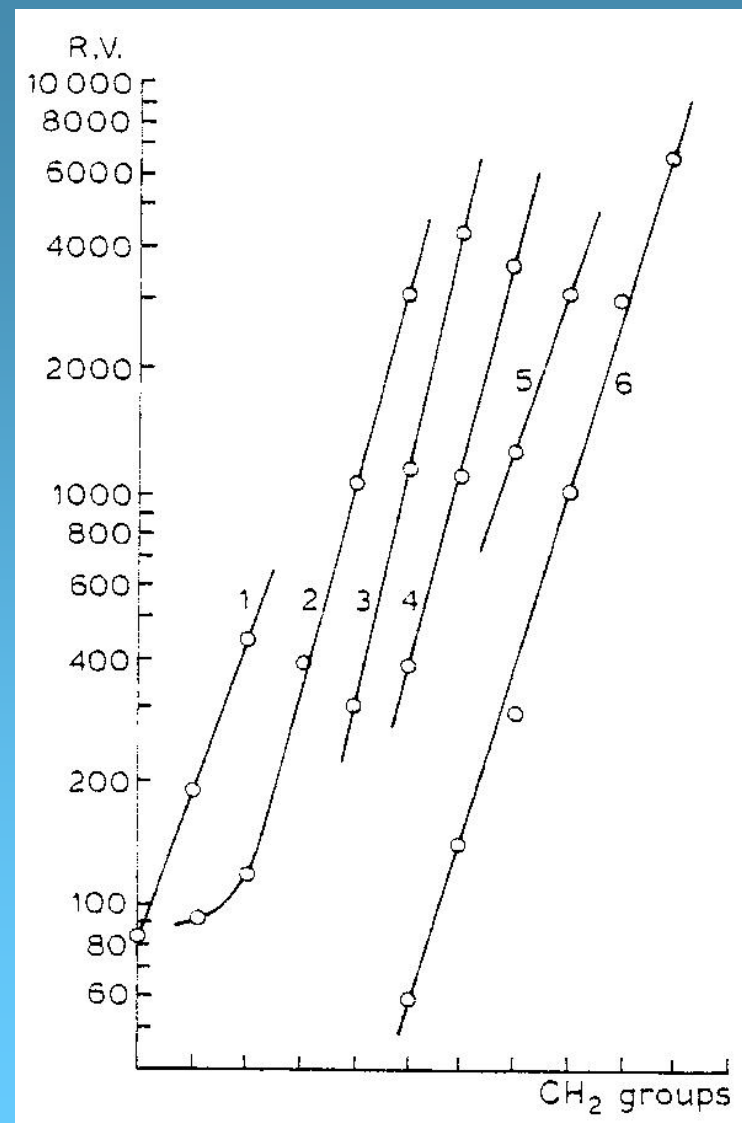
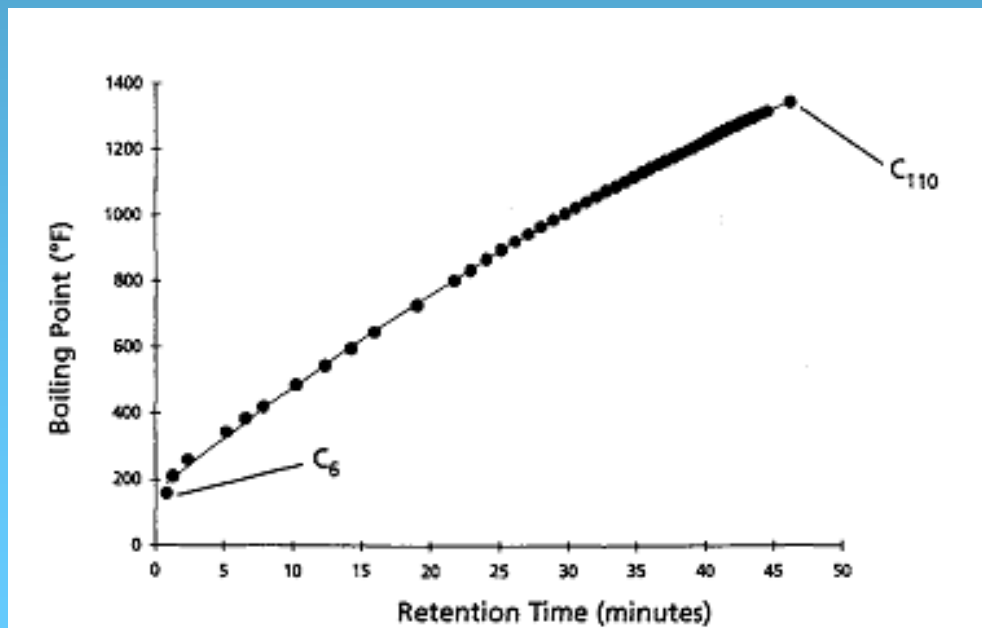
Kvalitativní analýza

Izotermální analýza

■ korelace

★ b_v a t_r

★ $\log V_g$ a $n(\text{CH}_2)$



Kvalitativní analýza

Identifikace analytů spojením dvou či více kolon

■ správnost identifikace lze zvýšit

★ snížením hustoty píků v chromatogramu ρ

- zvýšení účinnosti kolony
 - zapojení kolon A, B v sérii

$$n_{AB} = n_A + n_B$$

★ separací vzorku na dvou kolonách se SF o různé polaritě

- multidimenzionální GC, ortogonální GC
 - každá kolona se svou SF představuje jednu dimenzi

$$n_{AB} = n_A \times n_B$$

- heart-cut ... část eluátu první kolony je dávkována na druhou kolonu
- GC×GC - comprehensive GC ... celý eluát první kolony je dávkován na druhou kolonu
 - nutnost refokusace píků ... modulátor

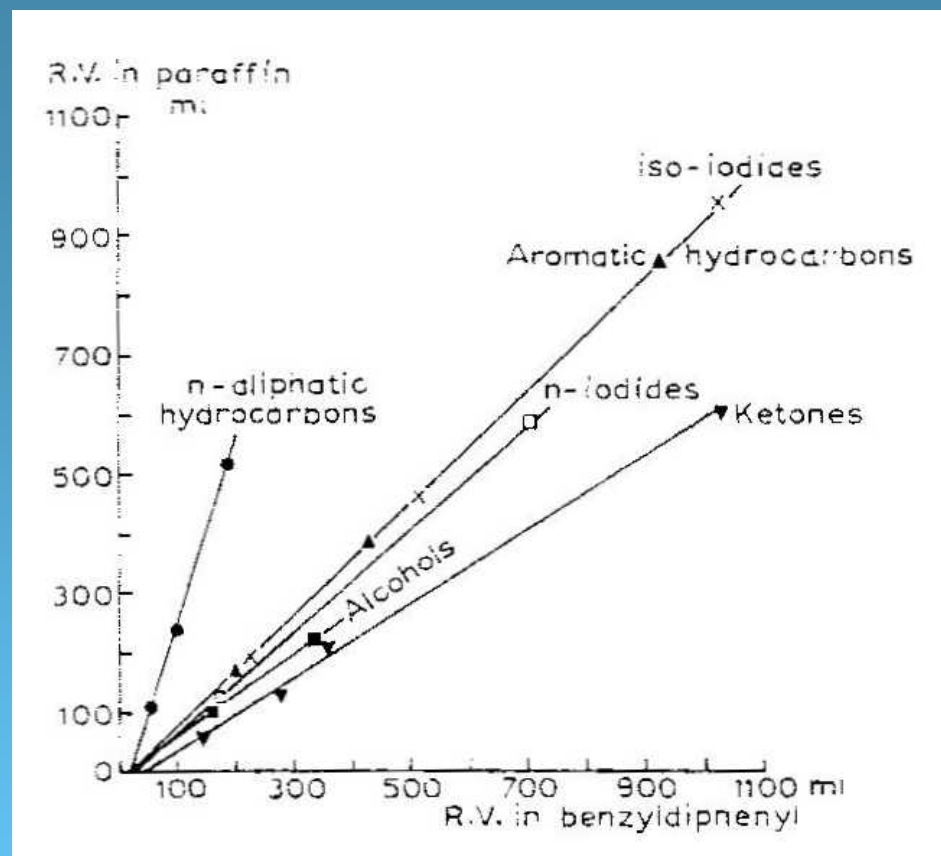
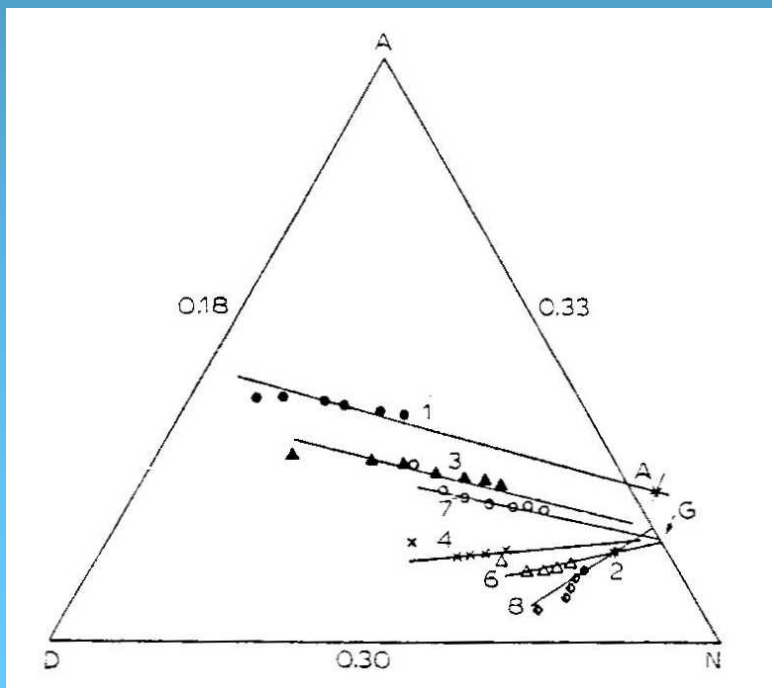
Kvalitativní analýza

Izotermální analýza

- korelace retenčních dat

- ★ na dvou různých SF

- ★ na třech různých SF



$$J_1 = \frac{I_1}{I_1 + I_2 + I_3} \quad J_2 = \frac{I_2}{I_1 + I_2 + I_3} \quad J_3 = \frac{I_3}{I_1 + I_2 + I_3}$$

Kvalitativní analýza

Analýza s programovanou teplotou

- Retenční indexy I_x - programovaná teplota

★ retenční časy lze nahradit elučními teplotami

$$I_x = 100 \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} + 100n$$

- musí platit: $T_n < T_x < T_{n+1}$

- Teplotní závislost I_x

★ relativně malá ve srovnání s ostatními retenčními daty

★ obecná teplotní závislost Antoinova typu

$$I = A + \frac{B}{T + C}$$

$$\frac{dI}{dT}$$

★ inkrement

- 0 pro n-alkany (z definice)
- asi 0,05 K⁻¹ pro rozvětvené uhlovodíky
- několik jednotek K⁻¹ pro polární látky

Kvalitativní analýza

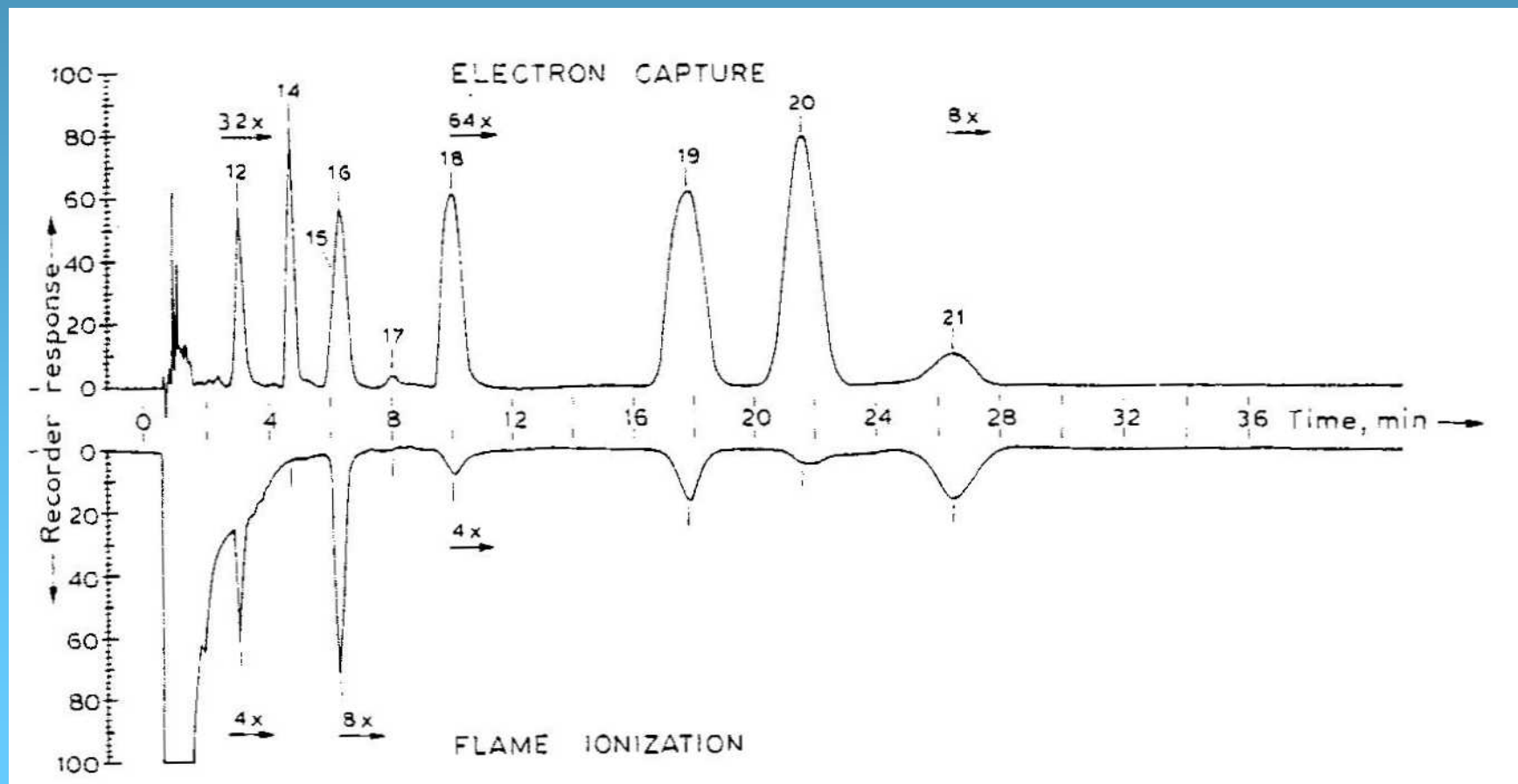
Identifikace látek použitím selektivních detektorů

- **odezva detektoru**
 - ✱ informace o charakteru složek vzorku
- **identifikace (důkaz) možná i když**
 - ✱ všechny složky vzorku nejsou rozděleny
 - ✱ analyty přítomny ve velmi nízkých koncentracích
- **selektivní detektory**
 - ✱ ECD, FPD, AFID, IR, MS
 - ✱ vhodná je kombinace s univerzálním detektorem (FID)
- **využití kombinace dat se specifickými elučními charakteristikami**

Kvalitativní analýza

Identifikace látek použitím selektivních detektorů

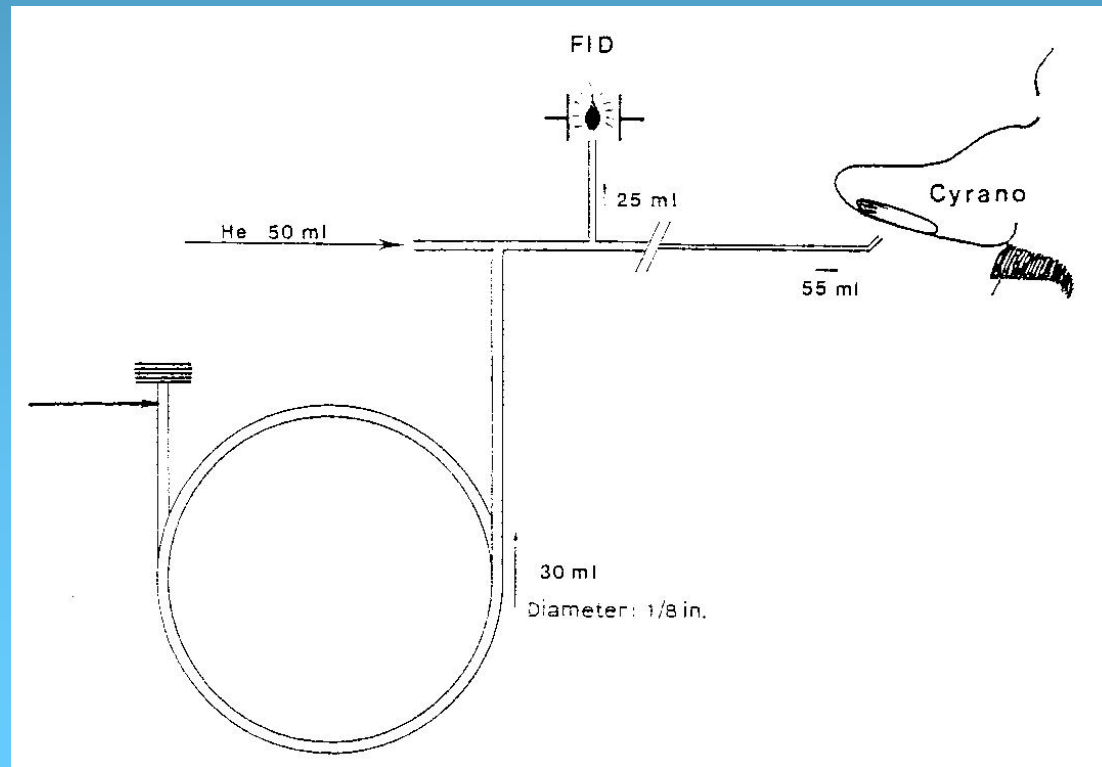
- kombinace FID a ECD



Kvalitativní analýza

Identifikace látek použitím selektivních detektorů

- kombinace objektivní a subjektivní identifikace
 - ✳ olfaktorická měření
 - ✳ využití biologických detektorů-senzorů



Kvalitativní analýza

Identifikace látek kombinací GC a organické analýzy

■ důkaz přítomnosti funkčních skupin

★ dvě analýzy

- původní vzorek
- vzorek po reakci se specifickým činidlem (derivatizaci)
 - katalytická hydrogenace násobných vazeb
 - GC uhlovodíkového skeletu po eliminaci všech funkčních skupin
 - esterifikace karboxylových skupin, alkoholů
 - tvorba aminů a amidů
 - ozonolýza
 - pyrolýza
 - silanizace alkoholů, amínů

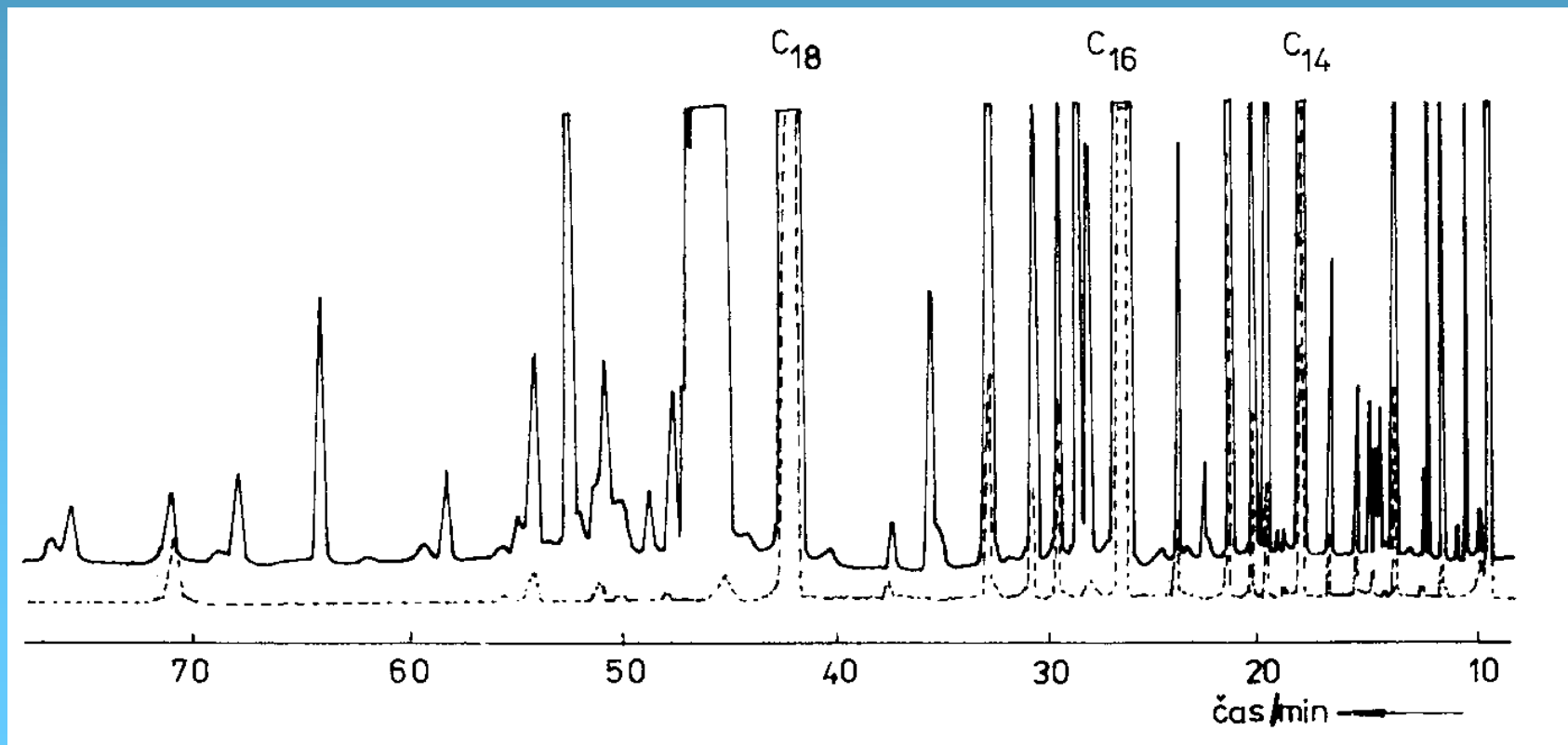
★ reakční GC

- precolumn a postcolumn reakce

Kvalitativní analýza

Identifikace látek kombinací GC a organické analýzy

- ★ příklad analýzy methylesterů karboxylových kyselin v másle před a po katalytické hydrogenaci



Kvalitativní analýza

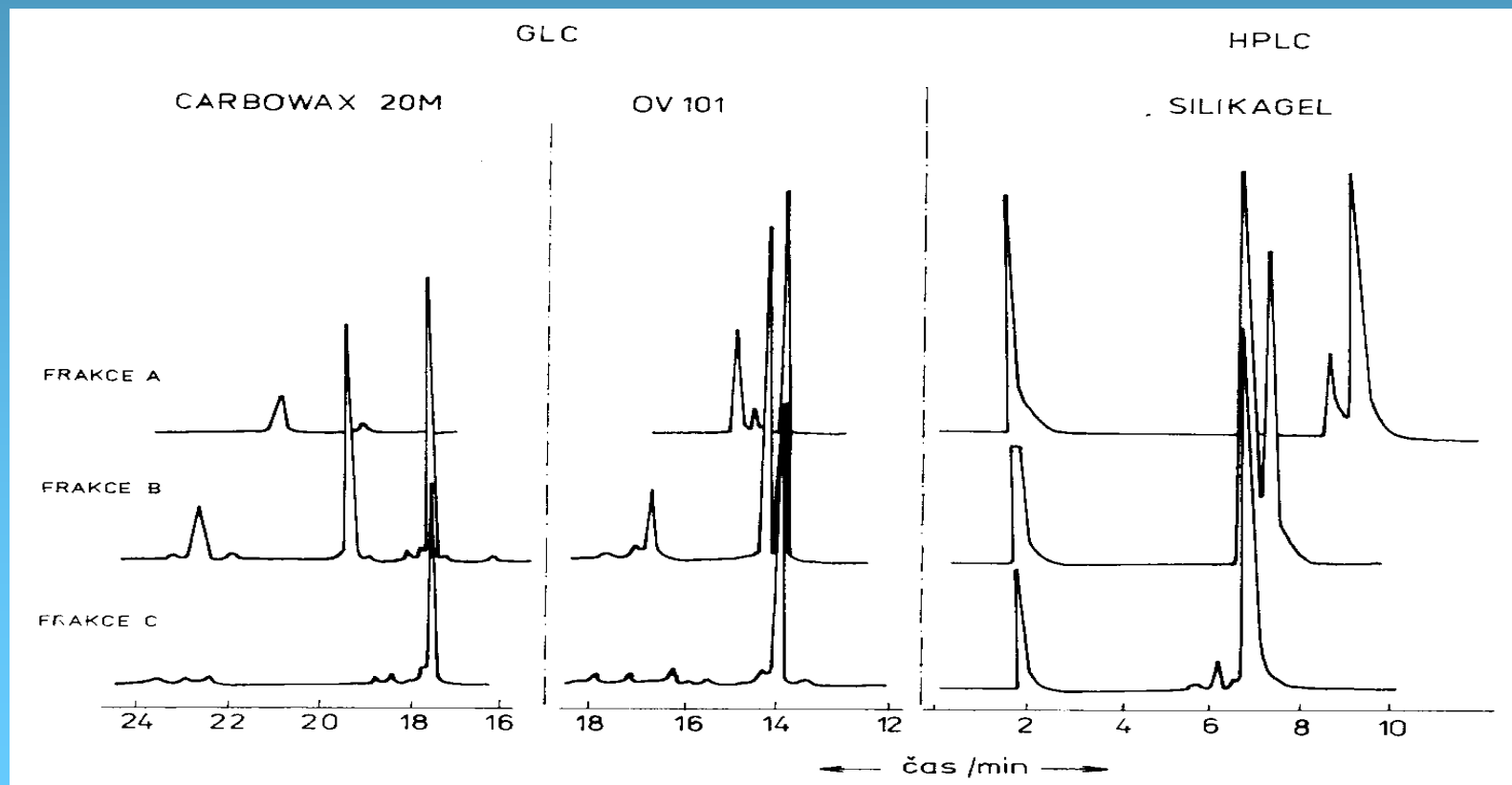
Identifikace analytů kombinací GC s jinými chromatografickými metodami

- využití dvou zcela rozdílných separačních mechanismů
- kombinace HPLC-GC
 - ★ HPLC eluát je rozdělen na malé frakce a ty analyzovány GC
 - off-line a on-line uspořádání ... pravé multidimenzionální systémy
- kombinace TLC-GC
 - ★ vypreparované zóny z TLC jsou vyextrahovány vhodným rozpouštědlem a analyzovány GC
- nutnost použití nedestruktivních detektorů v první metodě

Kvalitativní analýza

Identifikace analytů kombinací GC s jinými chromatografickými metodami

★ analýza destilační frakce PCB



Kvalitativní analýza

Přesnost měření retenčních dat

- Zdroje chyb z chromatografického systému
 - ✱ předávkování kolony vzorkem
 - ✱ změny vlastností SF
 - ✱ příspěvek smíšeného retenčního mechanismu
 - ✱ měření mrtvého retenčního času
- Přístrojové zdroje chyb
 - ✱ kolísání vlastností okolí
 - ✱ chyby měření

Artefakty

- Neočekávané píky (ghost peaks)
- Chybějící píky
- Pohyblivé píky

Kvantitativní analýza

Základní kroky - vyhodnocení chromatogramu

- určení plochy nebo výšky píků všech nebo jen stanovovaných složek
 - ✦ plocha píku (A), výška píku (h)
- určení obsahu složky ve vzorku
 - ✦ závislosti $c = f(A)$ nebo $c = f(h)$ nejsou obecně známy
 - kalibrace
 - využití molárních a relativních molárních odezev detektorů

$$MR_i = \frac{R_i}{n_i} \approx \frac{A_i}{n_i}$$

$$RMR_{ji} = \frac{MR_j}{MR_i}$$

- určení přesnosti a správnosti výsledků

Kvantitativní analýza

Měření ploch píků

■ manuální

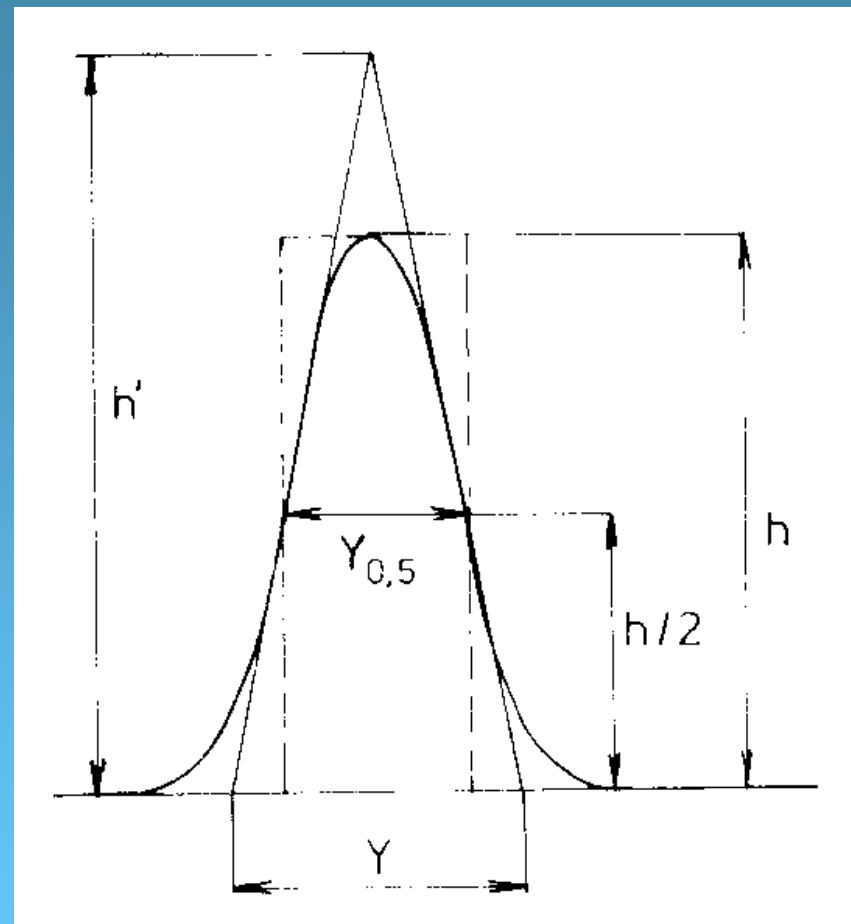
- ✱ polární planimetr
- ✱ kvadratura - součin výšky píku a jeho šířky v polovině výšky, pouze pro symetrické píky

$$A = h \cdot Y_{1/2}$$

- ✱ triangulace - nahrazení plochy píku vypočtenou plochou trojúhelníku, pro píky tvaru Gaussovy křivky

$$A = 0.5 Y h'$$

- ✱ vážení vystřiženého píku - i pro nesymetrické píky, nutnost stejné tloušťky, hustoty papíru, velmi přesná



Kvantitativní analýza

Měření ploch píků

■ integrací křivky

- ✱ analogové integrátory

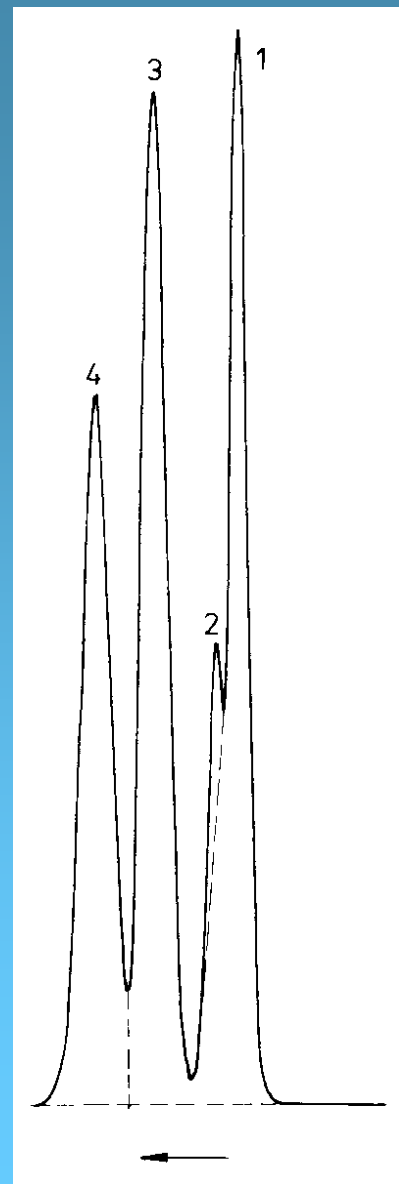
- ✱ digitální integrátory

- nastavení parametrů základní linie a píků

- prahová hodnota signálu (threshold) - citlivost
- šířka píků (náplňové a kapilární kolony)
- způsob vedení základní linie a rozdělení ploch u neúplně rozdělených píků
- integrace negativních píků
- vyřazení píků s velmi malými plochami
- nastavení časových oken

- velmi přesné

- RSD pod 0.5%



Kvantitativní analýza

Měření výšky píku

- je jednodušší než ploch
- za reprodukovatelných podmínek
- je více závislé na provozních podmínkách přístroje
- podmínky
 - ✦ správný průběh základní linie
 - ✦ správná pozice maxima (obtížné u překrývajících píků)

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

■ Metoda vnitřní normalizace

- ✱ všechny píky musí být eluovány
- ✱ všechny složky vzorku musí dávat odezvu na detektoru
- ✱ integrace ploch všech píků A_1 až A_n

$$A_x(\%) = \frac{A_x}{\sum_{i=1}^n A_i}$$

- ✱ spíše orientační
- ✱ není závislá na dávkovaném množství

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

- Metoda vnitřní normalizace s použitím korekčních faktorů
 - ✱ všechny píky musí být eluovány
 - ✱ všechny složky vzorku musí dávat odezvu na detektoru
 - ✱ integrace ploch všech píků A_1 až A_n
 - ✱ nutnost určení korekčních faktorů vůči referenční látce r
 - ✱ obecnější použití
 - ✱ není závislá na dávkovaném množství

$$w_x(\%) = \frac{k_x A_x}{\sum_{i=1}^n k_i A_i}$$

$$k_i = \frac{m_i A_r}{m_r A_i}$$

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

■ Metoda absolutní kalibrace (vnějšího standardu)

- ✱ dávkování známého množství vzorku a standardu za stejných podmínek
- ✱ dva způsoby
 - kalibrační křivka
 - konstrukce závislosti plochy píku analytu na jeho dávkovaném množství
 - dávkování standardu - stejné objemy o různých koncentracích nebo různé objemy jedné koncentrace
 - dávkování vzorku za stejných podmínek - odečet množství/koncentrace z kalibračního grafu
 - přímé srovnání
 - dávkuje se objem vzorku V_x a standardu V_{std} o jedné koncentraci c_{std}

- ✱ nutno znát přesně dávkovaný objem

$$c_x = \frac{k_x A_x V_{std} c_{std}}{k_{std} A_{std} V_x}$$

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

- Metoda vnitřního standardu (relativní, nepřímá)
 - ✱ přidání známého množství nové látky V_{std} , c_{std} (nesmí interferovat s žádnou složkou vzorku) ke známému objemu vzorku V_x
 - ✱ není nutno znát dávkovaný objem
 - ✱ dva způsoby
 - přímé srovnání
 - analýza vzorku, V_x a V_{std}
 - analýza vzorku s přidáním standardem

$$c_x = \frac{k_x A_x V_{std} c_{std}}{k_{std} A_{std} V_x}$$

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

- **Metoda vnitřního standardu (relativní, nepřímá)**
 - kalibrační křivka
 - roztoky analytu o různých koncentracích a standardu o jedné koncentraci
 - vynesení poměru ploch analytu a standardu oproti poměru jejich koncentrací
 - analýza vzorku s přidáním standardem
 - odečet z kalibračního grafu
 - není nutno znát odezvu složek (jsou vyjádřeny směrnici)

Kvantitativní analýza

Metody určení obsahu složky ve vzorku

■ Metoda standardního přídavku

- ★ přidání definovaného množství standardu ke známému množství vzorku
 - analýza objemu V_x původního vzorku poskytne plochu analytu A_x
 - k objemu V_1 vzorku se přidá objem V_{std} standardu o koncentraci c_{std}
 - analyzuje se objem V_3 směsi vzorku s přidaným standardem - plocha analytu A_3

$$c_x = \frac{A_x V_3 c_{std} V_{std}}{A_3 V_x (V_1 + V_{std}) - A_x V_3 V_1}$$

Kvantitativní analýza

Chyby ovlivňující výsledky stanovení

- **odběr vzorku a dávkování do kolony**
 - ✱ zhomogenizovaný reprezentativní vzorek
 - zvláště obtížné jsou plynné vzorky
 - ✱ přesnost manuálního dávkování $>\pm 5\%$
- **ztráty v průběhu separace**
 - ✱ chemické reakce
 - ✱ adsorpce
 - ✱ tepelný rozklad termolabilních látek
- **překryv píků**
 - ✱ nedostatečně rozlišené píky

Kvantitativní analýza

Chyby ovlivňující výsledky stanovení

■ překryv píků

- ✱ nedostatečně rozlišené píky
- ✱ chyba roste s klesajícím R a s klesajícím poměrem c_j/c_i
- ✱ u špatně rozlišených píků je výhodnější použít výšky místo ploch píků

