

1 Úvod	2
2 Cíle úlohy	2
3 Předpokládané znalosti	3
4 Autotest základních znalostí	3
5 Výpočty a nastavení proměnných při separaci	3
5.1 Druhy interakcí.....	3
5.2 Chromatogram.....	3
5.3 Parametry ovlivňující separaci (rozlišení).....	4
6 Příprava vzorků pro GC	5
6.1 Strategie.....	5
6.2 Metody	5
7 Základy práce se systémem GC-FID	6
7.1 Základní prvky	6
7.2 Funkce, nastavení a údržba injektorů.....	6
7.3 Výběr, příprava, kondicionace a údržba analytické kolony.....	6
7.4 Princip, parametry a aplikace FID.....	6
7.4.1 Vlastnosti.....	6
7.4.2 Popis a funkce	7
7.4.3 Údržba	7
7.5 Druhy, příčiny a odstranění problémů při chromatografické separaci a detekci	7
8 Použitá instrumentace	7
9 Spuštění přístroje	8
10 Dílčí úlohy a demonstrace	8
Optimalizace podmínek analýzy metodami GC-FID (úlohy 10.1-10.6)	8
10.1 Měření závislosti průtoku nosného plynu na teplotě kolony při konstantním tlaku	8
10.2 Zjištění optimální hodnoty průtoku nosného plynu kolonou	9
10.3 Vliv parametrů injektoru na přenos analytů do kolony a charakter separace	9
10.4 Vliv teploty injektoru, počáteční teploty na koloně a bodu varu rozpouštědla na odezvové faktory výševroucích analytů při splitless nástřiku.....	9
10.5 Analýza termolabilních látek	9
10.6 Nastavení optimálního teplotního gradientu na koloně.....	10
Kvalitativní analýza složek neznámé směsi (úlohy 10.7-10.9)	10
10.7 Separace a určení stereomerů 2,6-dimethylcyklohexanonu.....	10
10.8 Identifikace neznámého esteru	10
10.9 Identifikace, resp. vyloučení vybraných látek ve zkoumaných vzorcích analyzovaných na kolonách s rozdílnou stacionární fází.....	10
Kvantitativní analýza (úlohy 10.10-10.13)	11
10.10 Stanovení (4R)-(+)-limonenu a minoritních terpenových složek v silicích.....	11
10.11 Stanovení mastných kyselin ve vzorku rostlinných olejů.....	11
10.12 Stanovení dimetyldisulfidu – rozkladného produktu S-methylcysteinsulfoxidu	12
10.13 Demonstrace matricového efektu.....	12
11 Řešení autotestu	12
12 Kontrolní otázky	13

1 Úvod

Plynová chromatografie (GC) je fyzikální metoda dělení směsí látek mezi dvě fáze, fází nepohyblivou (stacionární) a fází pohyblivou (mobilní). Proces separace látek probíhá v koloně plynového chromatografu. Mobilní fází je vždy plyn, který je v kontaktu s fází stacionární. Stacionární fází bývá nejčastěji kapalina nanosená na nosiči, tvořící film nebo chemicky vázaná na stěnách kolony (chromatografie plyn – kapalina, GLC). Méně často se v analýze potravin používají jako stacionární fáze aktivní pevné látky (chromatografie plyn – tuhá látka, GSC). GLC je rozdělovací chromatografií, GSC chromatografií adsorpční. Všechny metody GC používají výhradně eluční techniky separace látek.

Pro běžnou analytickou práci se jako mobilní fáze (nosný plyn) používají inertní permanentní plyny. Analyzovaný vzorek se zavádí do toku nosného plynu zpravidla jako roztok v těkavém rozpouštědle (do injektoru přístroje), v plynném skupenství přichází do kolony a na jejím výstupu vstupuje do detektoru.

GC je metoda, která umožňuje současné dělení a stanovení velkého množství organických i anorganických látek vyskytujících se v potravinách. Výsledky kvalitativní i kvantitativní analýzy určuje řada proměnných, především stacionární a mobilní fáze (druh, množství), teplotní režim, parametry detektoru a mnohé další.

2 Cíle úlohy

- seznámit se s možnostmi techniky GC pro použití v analýze potravin a obvyklými technickými parametry instrumentace
- osvojit si základní pravidla pro přípravu GC systému a údržbu jednotlivých prvků
- osvojit si strategii při volbě vhodné konfigurace separačního systému (zejm. stacionární fáze)
- naučit se experimentálně nastavit optimální podmínky pro separaci složek analyzovaného vzorku
- naučit se používat techniky kvalitativní a kvantitativní analýzy
- naučit se zpracovat a interpretovat dosažené výsledky.

3 Předpokládané znalosti

- principy rozdělovací a adsorpční chromatografie
- princip plynové chromatografie a její využití v analýze potravin
- detektory pro plynovou chromatografií.

4 Autotest základních znalostí

1. Jaké plyny se používají jako nosný plyn (mobilní fáze), který z nich je hořlavý? Jak je označena tlaková láhev s vodíkem?
2. Je teplota injektoru libovolná? Jaký je postup při její volbě?
3. Jaké jsou hlavní rozdíly mezi náplňovými a kapilárními kolonami?
4. Jak se klasifikují stacionární fáze?
5. Čím se řídí výběr stacionární fáze?
6. Čím se řídí výše teploty kolony (při isotermické eluci)?
7. Čím se měří účinnost kolony? Na čem závisí?
8. Čím je dána selektivita stacionární fáze?
9. Jaký je rozdíl mezi detektorem univerzálním a selektivním?
10. Co jsou charakteristiky detektorů?

5 Výpočty a nastavení proměnných při separaci

5.1 Druhy interakcí

(van der Waalsovy síly, elektrostatické síly, vodíková vazba)

5.2 Chromatogram

(nulová/základní linie, šum, drift, eluční křivka/pík)

- kapacitní (retenční) faktor k' , např. $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$

- separační faktor α , např. $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$

- míra účinnosti separace - počet teoretických (efektivních) pater kolony n ,

$$\text{např. } n = 16 \times \left(\frac{t_{R'}}{w_b} \right)^2 \cong 5,545 \times \left(\frac{t_{R'}}{w_{0,5}} \right)^2$$

- teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony se nazývá **výškový ekvivalent teoretického patra H**,

$$H = \frac{L}{n}$$

- **lineární rychlost** nosného plynu v koloně \bar{u} , $\bar{u} = \frac{L}{t_M}$

- **rozlišení R**, $R = f(n, k', \alpha)$,

$$R = \frac{k}{1+k} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{\sqrt{n}}{4},$$

a to **kapacity**, **selektivity** a **účinnosti**

$$\text{např. } R = \frac{t_2 - t_1}{(w_1 + w_2)/2}$$

- alternativa k počtu pater pro vyjádření separační účinnosti kolony pro teplotně programované separace, tzv. **trennzahl, TZ**, definovaný jako počet separovatelných píků (při zachování průměrného $R = 1,177$) mezi dvěma následujícími členy řady alkanů,

$$TZ = \left(\frac{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}}{w_{0,5(n+1)} + w_{0,5(n)}} \right) - 1$$

- **koncentrační distribuční konstanta K'**,

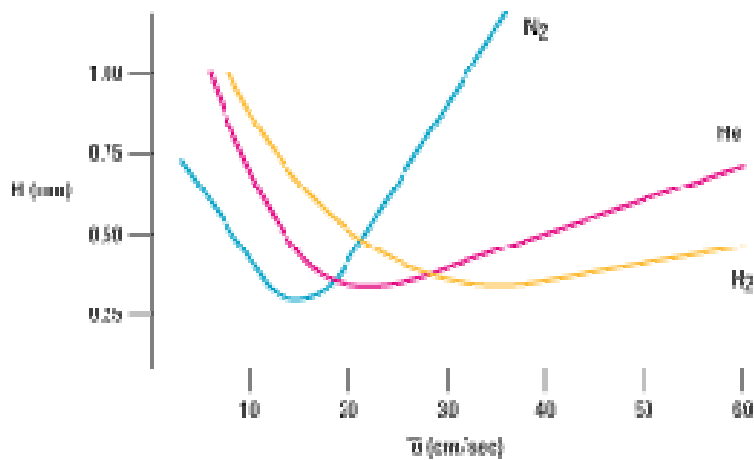
$$\text{např. } K' = \frac{c_L}{c_G} = \frac{m_L}{m_G} \times \frac{V_G}{V_L} = k' \times \beta; \quad \beta = \text{fázový poměr}, \quad \beta = \frac{r}{2d_f},$$

5.3 Parametry ovlivňující separaci (rozlišení)

při použití kapilárních kolon (GLC) pro analýzu konkrétních vzorků

- druh stacionární fáze (pro separaci nepolárních, polárních nebo polarizovatelných analytů; stabilita vázaných fází)

- tloušťka filmu
- průměr kolony
- délka kolony
- teplota kolony (gradient)
- nosný plyn
- průtok nosného plynu
- technika nástřiku aj.



Van Deemterovy křivky pro obvyklé nosné plyny v GC.

6 Příprava vzorků pro GC

6.1 Strategie

- druh složek vzorku (cílové analyty a matrice)
- počet analytů ve směsi
- body varu analytů (teplotní rozsah b.v.)
- funkční skupiny analytů
- předpokládaná koncentrace analytů
- stabilita (chemická a teplotní).

6.2 Metody

- bez úpravy
- extrakce, přečištění

- SPME
- SDE
- derivatizace.

7 Základy práce se systémem GC-FID

7.1 Základní prvky

7.2 Funkce, nastavení a údržba injektorů

- typy nástřikových systémů (injektorů), parametry inletů (vstupů) pro kapilární kolony
- typy, výběr a instalace vložek (linérů) injektorů „split/splitless“ (s dělením/bez dělení toku) - důležité pro kvantitativní a opakovatelný přenos analytů na kolonu
- septa
- fokusace
- techniky „head-space“ a „purge & trap“.

7.3 Výběr, příprava, kondicionace a údržba analytické kolony

- základní postupy, instrukce a parametry
- použití a parametry spojovacích prvků
- stručná klasifikace stacionárních fází, McReynoldsovy indexy
- teplotní limity, vymývání stacionární fáze z kolony
- testovací směsi.

7.4 Princip, parametry a aplikace FID

7.4.1 Vlastnosti

- destruktivní, hmotnostní („mass flow-sensitive“) - odezva se nemění se změnou průtoku
- selektivní s vlastnostmi téměř univerzálního detektoru pro organické sloučeniny
- nejmenší detegovatelná množství 10-100 pg (5 pg C/s), velký lineární dynamický rozsah (až 10^7).

7.4.2 Popis a funkce

- skládá se z trysky opatřené hlavou, kam vstupuje směs nosného plynu, vodíku a doplňkového plynu; na jejím hrotu (hořáku) dochází v proudu vzduchu ke spálení této směsi na ionty, které se sbírají na elektrodách a generují proud, který se po zesílení registruje
- proudové pozadí je 10^{-13} až 10^{-14} A, proud generovaný po spálení analytů eluujících se z kolony až 10^{-6} A
- na poměru průtoků doplňkového plynu a H_2 závisí linearita a citlivost detekce.

7.4.3 Údržba

- chromatografické symptomy znečištěného detektoru
- příčiny znečištění detektoru, prevence znečištění
- čištění trysky a sběrné elektrody.

7.5 Druhy, příčiny a odstranění problémů při chromatografické separaci a detekci

8 Použitá instrumentace

- GC-FID systém HP 4890A Series, Hewlett-Packard (Agilent Technologies), s manuální regulací tlaků a průtoků plynů



- GC-FID systém HP 6890 Series, Hewlett-Packard, příp. 6890N network GC System, Agilent Technologies, s elektronickou regulací (EPC) tlaků a průtoků plynů



- software CSW 1.7 (DataApex, Ltd.)

9 Spuštění přístroje

Po inspekci nástřikového prostoru se připraví a poté do přístroje nainstaluje vhodná kolona. Dříve než se nastaví teplota nástřiku a detektoru, nastaví se požadovaný průtok (tlak) nosného plynu kolonou při nastavené teplotě na koloně (pece). Průtok vodíku a vzduchu pro plamenově ionizační detektor (FID) je již přednastaven na průtokoměrech zabudovaných v přístroji. Po dostatečném zahřátí prostoru detektoru ($> 150^{\circ}\text{C}$) se zapálí plamínek detektoru a otevře se ventil doplňkového detektorového plynu („make-up“). Po ustálení teplot a signálu detektoru je možno zahájit měření.

10 Dílčí úlohy a demonstrace

Studenti (laboratorní skupina) experimentálně provedou minimálně jednu dílčí úlohu z každé skupiny úloh (**Optimalizace podmínek**, **Kvalitativní analýza** a **Kvantitativní analýza**) podle pokynů vyučujícího.

Optimalizace podmínek analýzy metodami GC-FID (úlohy 10.1-10.6)

10.1 Měření závislosti průtoku nosného plynu na teplotě kolony při konstantním tlaku

Cílem je ozřejmit si charakter závislosti průtoku nosného plynu na teplotě a rozměrech kolony (např. i.d. 0,25 mm vs. 0,32 mm) při konstantním tlaku na hlavu kolony. Ze získaných dat se určí

oblast lineární závislosti a zjistí rovnice přímky. U typu HP 4890, u kterého se nastavuje tlak nosného plynu, se určí také závislost průtoku dusíku kolonou na tlaku plynu na hlavu kolony.

Pozn.: vyhřívání prostoru detektoru lze spustit teprve po změření požadovaných hodnot.

10.2 Zjištění optimální hodnoty průtoku nosného plynu kolonou

Opakovaným nástřikem rozpouštědla (vzorku) při různých průtocích nosného plynu kolonou (0,2-3 ml/min) získáme píky různých retenčních časů, tvarů a šířky. Z těchto parametrů lze vypočítat počet teor. pater systému při daném průtoku a optimální průtok (tj. s nejvyšším počtem teor. pater). Získaná data lze srovnat s hodnotami vypočtenými podle algoritmu příslušného softwaru. Diskuse o vztahu optimální lineární rychlosti s praktickou optimální rychlostí nosného plynu s maximální účinností za jednotku času. Alternativně lze namísto průtoků nosného plynu použít údaje manometru.

10.3 Vliv parametrů injektoru na přenos analytů do kolony a charakter separace

Cílem je naučit se nastavit parametry režimů split/splitless (např. doba uzavření splitového ventilu, teplota pece při nástřiku apod.) vhodné pro konkrétní analýzu. Úloha se provádí s modelovými roztoky methylisobutylketonu a *p*-xylynu. Související témata - typy vložek v nástřikovém prostoru (linerů), fokusace, rekondenzační efekt, diskriminace analytů s různým počtem atomů C při různých technikách nástřiku, selektivita dělení (splitu), kapacita lineru (max. objemy nástřikovaných rozpouštědel), asymetrie píků, negativní píky aj.

10.4 Vliv teploty injektoru, počáteční teploty na koloně a bodu varu rozpouštědla na odezvové faktory výševroucích analytů při splitless nástřiku

K tomu, aby bylo dosaženo co nejlepší separace a nejvyšší citlivost při stanovení např. málo těkavých polycyklických aromatických uhlovodíků metodou kapilární GC-FID (též varianty GC-MS-EI), je třeba znát účinek rozpouštědla na fokusaci analytů, vztah mezi bodem varu rozpouštědla a optimální počáteční teplotou kolony a dalšími faktory, které mohou výrazně ovlivnit parametry metody pro stanovení těchto látek. Demonstrace vlivu rozpouštědla a teplot, význam pro stopovou analýzu semivolatilních a výševroucích látek.

10.5 Analýza termolabilních látek

Vzorek reakční směsi allylthiokyanátu s glycinem v neutrálním až mírně alkalickém prostředí obsahuje po 1 týdnu skladování při laboratorní teplotě jako dominantní produkt allylthiomočovinu (ATM). Plynově chromatografické stanovení ATM lze provést např. po

acylaci reakční směsi. ATM, resp. jeho acylovaný derivát, však není při obvyklých teplotách prostoru nástřiku (>200°C) stabilní a rozkládá se na allylamin (AA), resp. jeho acylovaný derivát. Úkolem je zjistit maximální teplotu injektoru (s přesností udanou asistentem), při níž již k rozkladu prakticky nedochází (v intervalu $t_{inj}=100-200^{\circ}\text{C}$).

10.6 Nastavení optimálního teplotního gradientu na koloně

Cílem je maximální rozlišení separovaných pásů (píků), maximální rozlišení při minimální době analýzy. Demonstrace na různých vzorcích, provádí se jako součást ostatních úloh.

Kvalitativní analýza složek neznámé směsi (úlohy 10.7-10.9)

10.7 Separace a určení stereomerů 2,6-dimethylcyklohexanonu

Stereoisomery 2,6-dimethylcyklohexanonu se dělí metodou plynové chromatografie. S odezev se zjistí poměr obou isomerů. Po redukci na příslušné alkoholy (*cis*-isomer ketonu dává dva isomery alkoholu, zatímco *trans*-isomer pouze jeden) se z relativních odezev těchto isomerů alkoholu identifikuje *cis*- a *trans*-isomer původního ketonu.

10.8 Identifikace neznámého esteru

Původní ester a hydrolyzou vzniklý alkohol a kyselina se analyzují metodou GC-FID a ze stanovených RI a tabelovaných (nebo také stanovených) RI standardů alkoholů, esterů a kyselin se určí neznámý ester.

10.9 Identifikace, resp. vyloučení vybraných látek ve zkoumaných vzorcích analyzovaných na kolonách s rozdílnou stacionární fází

Analyzují se různé vzorky - extrakt rozkladných produktů česneku, extrakty z Maillardových systémů, lihoviny, silice aj. Cílem je určení neznámých analytů z omezeného množství látek srovnáním s údaji (retenčními indexy, RI) v databázích dodaných vyučujícím, příp. srovnáním se standardy.

Pozn.: Ani naprostá shoda RI nebo jiných elučních charakteristik standardu a neznámě složky neopravňuje k tvrzení, že neznámá látka je totožná se standardem. Pravděpodobnost, že tomu tak je, lze zvýšit dalšími okolnostmi analýzy (např. analýzami na kolonách s fázemi o různé polaritě, kombinací s dalšími chromatografickými metodami nebo kombinací s chemickými metodami, atd.). Spolehlivá identifikace látek s využitím pouze plynové

chromatografie s tradičními detektory je možná pouze ve zvláštních případech. Naprosto spolehlivě lze ovšem na základě výsledků analýz tvrdit, že látky nejsou totožné, pokud mají za jinak shodných podmínek rozdílné eluční charakteristiky.

Hodnoty RI při opakovaných stanoveních by se za identických podmínek stanovení (nejlépe po sobě následující analýzy) neměly lišit více než o několik jednotek. Větší rozdíly jsou způsobeny nedodržením shodných podmínek analýzy, extrémně nízkými nebo vysokými koncentracemi analyzovaných složek, nedokonalým rozdělením analyzovaných látek nebo jinými vlivy. Vyšší přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků se dosáhne při isothermním režimu analýzy. Reprodukovatelnost RI v PTGC (GC s programovatelnou teplotou), generalizované RI.

Při isothermních podmínkách analýzy vypočteme retenční indexy látky x podle rovnice

$$KI_{(x)} = 100 \times \frac{\log t_{R(x)} - \log t_{R(n)}}{\log t_{R(n+1)} - \log t_{R(n)}} + 100n \quad .$$

V případě lineárně programové teploty lze použít např. aproximativní rovnici obecného tvaru

$$KI_{(PT,x)} = 100j \times \frac{d_{R(x)} - d_{R(n)}}{d_{R(n+j)} - d_{R(n)}} + 100n \quad ,$$

kde d_R je retenční teplota (T_R) nebo čas (t_R) určované látky a dvojice n -alkanů.

Kvantitativní analýza (úlohy 10.10-10.13)

10.10 Stanovení (4R)-(+)-limonenu a minoritních terpenových složek v silicích

Cílem je aplikace metod kvantitativní analýzy pro konkrétní případy. Kvantifikace majoritní složky se provádí pomocí kalibrační křivky vnitřního standardu; pro minoritní složky se využije metoda absolutní kalibrace s kalibrační křivkou nebo metoda standardního přídávku.

10.11 Stanovení mastných kyselin ve vzorku rostlinných olejů

Analýza mastných kyselin se provádí po hydrolýze tuku a esterifikaci methanolem za katalýzy fluoridem boritým užitím metody vnitřní kalibrace a dalších kvantifikačních metod.

10.12 Stanovení dimethyldisulfidu – rozkladného produktu S-methylcysteinsulfoxidu

Tepelným rozkladem S-methylcysteinsulfoxidu vzniká celá řada látek. Jedním z dominantních produktů je i dimethyldisulfid (DMDS). Pyrolyzát je extrahován do diethyletheru a přímo analyzován metodou GC-FID. Úloha zahrnuje identifikaci DMDS na 2 různých kolonách, vytvoření kalibračních křivek a stanovení obsahu DMDS v extraktu.

10.13 Demonstrace matricového efektu

Koextrahované složky mohou být v GC příčinou problémů souvisejících s nepřesnou kvantifikací, vyššími hodnotami LOD, falešně pozitivními i negativními výsledky a celkově snižující se robustností metody. Úlohu tvoří ukázky analýz demonstrujících zvýšení odezev v extraktu vzorku v důsledku přítomnosti aktivních koextraktů a diskuse možností eliminace tohoto efektu.

11 Řešení autotestu

1. Nejčastěji helium, dusík, vodík, ale i jiné plyny a jejich směsi. Hořlavý je vodík. Láhev je označena červeným pruhem.
2. Ne. Musí být dostatečně vysoká (zpravidla vyšší než teplota kolony), aby došlo ke zplynění vzorku, ale ne k jeho tepelnému rozkladu.
3. Náplňové kolony obsahují kromě stacionární fáze nosič, mají jiné rozměry (jsou širší a obvykle kratší), počet teoretických pater je řádově nižší.
4. Tradičně podle polarit (nepolární, středně polární, polární).
5. Měla by mít podobnou polaritu (chemické složení) jako složky dělené směsi.
6. Měla by být přibližně rovna průměrnému bodu varu složek směsi, aby doba trvání analýzy byla minimální, při současném požadovaném rozlišení analyzovaných látek. Dále je omezena maximální teplotou použitelnou pro danou stacionární fázi.
7. Počtem teoretických pater. Na průtoku nosného plynu, rozměrech, u náplňových kolon na změní nosiče, množství stacionární fáze.
8. Rozdělovacími (distribučními) koeficienty dělených látek.
9. Univerzální poskytuje odezvu prakticky na všechny látky, selektivním lze detegovat jen určitou skupinu látek.
10. Kritéria sloužící pro jejich porovnání (selektivita, odezva, citlivost, linearita aj.)

12 Kontrolní otázky

1. Vysvětlete rozdíl mezi adsorpční a rozdělovací GC.
2. Vysvětlete princip FID.
3. Které organické látky nelze detegovat plamenovým ionizačním detektorem?
4. Jakou funkci plní tzv. doplňkový detektorový plyn („make-up“)?
5. Jaký je vliv teploty a tlaku plynu na retenční charakteristiky v GC?
6. Které parametry ovlivňují výšku teoretického patra?
7. Definujte retenční indexy. Jaký mají praktický význam?
8. Vysvětlete princip metod vnitřní kalibrace, kalibrační přímky, vnitřního standardu a standardního přídatku.
9. Lze jednoznačně identifikovat chemickou sloučeninu pomocí plynové chromatografie (např. metodou GC-FID)?
10. K jakému účelu se používají derivatizační činidla? Uveďte příklady.