

Kvalitativní analýza v chromatografii - Úloha č. 1

Chromatografie je separační metoda a jako taková neposkytuje informace o struktuře látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze v chromatografii se identifikace analytu provádí na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Retenční data analytu odráží specifické interakce analytu se stacionární a mobilní fází. Např. retenční čas lze považovat za specifickou vlastnost analytu v daném chromatografickém systému, a tedy retenční časy mohou sloužit jako prostředek pro identifikaci látek v daném chromatografickém systému.

Je však nutno si uvědomit, že retenční čas není neměnnou vlastností analytu, ale je důsledkem jeho retence v daném systému, přičemž změny chromatografického systému způsobují změny retenčního času. Též je jasné, že retenční čas sám o sobě nemůže sloužit k identifikaci daného analytu a že bez předchozí částečné znalosti vzorku se retenční čas nedá obecně použít pro identifikaci látek. Z toho vyplývá, že 100% identifikace v chromatografii není možná. Existuje vždy předpoklad o identitě, který závisí na předběžné znalosti analytu, efektivnosti systému a použité identifikační metodě.

Přístupy:

1. Identifikace na základě retenčních časů

Při této metodě se srovnává retenční čas neznámé látky s retenčním časem standardu. Standard je látka, u které známe strukturu a předpokládáme, že neznámá látka je s ní identická. Při této metodě se musí též uvažovat, že retenční časy jsou kromě typu komponenty též závislé na chromatografickém systému. To znamená, že správné srovnání je možné jen tehdy, jestliže podmínky měření obou vzorků jsou stejné.

Jestliže se shoduje retenční čas analytu s retenčním časem standardu za stejných chromatografických podmínek, lze s jistou pravděpodobností tvrdit, že neznámá látka je identická se standardem.

2. Identifikace látek na základě retenčních indexů

U předchozí metody jsme museli mít známou látku (standard), jejíž retenční parametry jsme srovnávali s retenčními parametry látky neznámé. Toto není při metodě retenčních indexů nutné. U této metody se naopak porovnávají retenční časy neznámé látky s určitou látkou nebo skupinou látek, které slouží jako referenční látky. Neznámá látka se tedy identifikuje na základě srovnání retenčního indexu s retenčními indexy látek známých z literatury.

Nejznámější metodou tohoto typu, která se uplatnila hlavně v plynové chromatografii, je Kovátsova metoda, která pracuje s tzv. Kovátsovým indexem.

Kovátsův index. Kováts vyvinul systém identifikace látek, podle něhož se retenční čas přepočítá na tzv. retenční (Kovátsův) index, který je vztažen na rozsáhlou skupinu referenčních látek. Identifikace neznámé látky (analytu) se pak uskutečňuje na základě srovnání tohoto indexu s indexy známých látek.

Výpočet retenčního indexu (RI):

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log T_{r,vzorek} - \log T_{r,n}) / (\log T_{r,n+1} - \log T_{r,n})$$

n počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n -alkanu

$T_{r,vzorek}$ redukovaný retenční čas píku vzorku, analytu

$T_{r,n}$ redukovaný retenční čas nejbližšího nižšího n -alkanu

$T_{r,n+1}$ redukovaný retenční čas nejbližšího vyššího n -alkanu

V Kovátsově indexovém systému se retenční data chemických komponent naměřené za daných chromatografických podmínek vztahují na homologickou řadu n-alkanů, pro které Kováts definoval retenční indexy následujícím způsobem:

Retenční index n-alkanu se vypočítá jako stonásobek počtu uhlíku v daném n-alkanu; např. retenční index n-propanu je 300; n-butanu 400, n-pentanu 500, atd. Retenční indexy všech ostatních látek jsou vztaženy k těmto hodnotám a to tak, že např. má-li daná látka za daných podmínek retenční čas mezi n-pentanem a n-hexanem, bude mít Kovátsův index mezi hodnotami 500 a 600. Podobně, eluuje-li látka mezi n-dekanem a n-dodekanem, bude mít retenční index v rozmezí 1000 a 1200. Retenční index je charakteristický pro danou látku; závisí však na stacionární fázi a teplotě. Platí, že teplotní závislost je větší pro polární komponenty na polárních fázích ve srovnání s méně polárními látkami na nepolárních fázích. V případě nepolárních fází je retenční index na teplotě téměř nezávislý.

V praxi se Kovátsův index používá následovně: naměřený retenční čas neznámé komponenty a retenční časy n-alkanů, které se určily za stejných chromatografických podmínek, se dosadí do Kovátsovy rovnice a vypočítá se Kovátsův index. Identifikace látky se provede na základě srovnání experimentálně zjištěného retenčního indexu s literárními hodnotami.

3. *Identifikace na základě relativních retenčních časů*

Při této metodě se retenční čas analytu vztahuje na mrtvý čas T_0 nebo na retenční čas určité vhodné látky (standardu), která se přidává do vzorku. S použitím relativních retenčních časů se pak eliminuje vliv délky kolony, fluktuace průtoku, teploty apod. Uvažujeme-li mrtvý čas T_0 a RT_i ; retenční čas komponenty i , potom kapacitní poměr k' je v podstatě tímto relativním retenčním časem, neboť platí: $k_i' = (RT_i - T_0) / T_0$.

Identifikace neznámých látek

Chromatografie je separační metoda, nikoliv identifikační. Proto prvořadým úkolem chromatografie je separace neznámých látek ve směsi. Identifikace těchto neznámých složek se pak může provést pomocí speciálních detektorů. V současné době se často používá kombinace plynového chromatografu s hmotnostním detektorem GC-MS. Obdobně lze kombinovat i kapalinový chromatograf s MS nebo s NMR spektrometrem.

Identifikace směsí

Jsou případy, kdy se chemik nezajímá o určení identity neznámé látky, ale jde mu o identitu směsi jako takové, např. petrochemické frakce. V tomto případě se uplatní metoda „fingerprint“, kdy se srovnává profilové složení vzorku s referenčními směsmi, podle kterého se dá usoudit např. na původ vzorku.

Úloha č. 1.

Použití plynové chromatografie v kvalitativní analýze Kováčsova závislost

Metoda:

Chromatograf: Schimadzu GC-17A
Kolona: Spira KI8 (5% difenyldimethylsiloxan); i.d. = 0,2 mm; d = 25 m
Teplota kolony: 120°C
Objem nástřiku: 1 µl
Teplota injektoru: 250°C
Detektor: FID, 250°C
Nosný plyn: N₂

Postup:

- Stanovte retenční časy (RT) následujících n-alkanů: n-pentan, n-hexan, n-heptan, n-oktan, n-nonan.
- Proveďte methanový test a stanovte mrtvý čas T₀.
- Vypočtete redukované retenční časy T_r (T_r = RT - T₀) pro jednotlivé n-alkany a sestrojte graf závislosti log T_r = f (RI)
- Proveďte analýzu zadaného vzorku. Vypočtete Kováčsovy (retenční) indexy (RI) jednotlivých složek přítomných ve vzorku podle vztahu:

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log T_{r, \text{vzorek}} - \log T_{r, n}) / (\log T_{r, n+1} - \log T_{r, n})$$

n	počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu
T _{r, vzorek}	redukováný retenční čas píku analytu
T _{r, n}	redukováný retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu
T _{r, n+1}	redukováný retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu

- Vypočtete Kováčsovy (retenční) indexy z rovnice spojnice trendu grafu funkce log T_r = f (RI).
- Získané Kováčsovy (retenční) indexy porovnejte s tabelovanými hodnotami.¹

Protokol:

- Stručný popis metody (Kováčsovy indexy, jejich využití, methanový test...).
- Popis chromatografických podmínek.
- Tabulka obsahující retenční údaje standardů a zadaného vzorku.
- Graf funkce log T_r = f (RI).
- Závěr (porovnání výsledků s tabelovanými hodnotami, vysvětlení odchylek...).
- Protokol odevzdat do jednoho týdne pomocí ISu.

¹ <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/DB5.html> (relevantní je sloupec DB5)