

Kvantitativní analýza v chromatografii - Úloha č. 2

Výška nebo **plocha** chromatografického píku příslušející dané komponentě jsou měřítkem množství této komponenty ve vzorku. Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku na základě použití vzorku dané látky o známém množství či koncentraci, tzv. standardu.

Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorků, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody.

Kalibrační graf

Za určitých podmínek (tj. v lineární oblasti odezvy detektoru) je plocha píku dané komponenty přímo úměrná množství této komponenty ve vzorku. V praxi to znamená, že se změří závislost ploch píků dané látky na známém množství či koncentraci této komponenty a sestrojí se příslušný graf. V určité oblasti je tato závislost lineární a platí vztah

$$y = a + b \cdot x$$

kde

x = nezávislá proměnná (= koncentrace standardu)

y = závislá proměnná (= odezva)

a = úsek na ose y

b = směrnice přímky

Pomocí této lineární závislosti lze stanovovat neznámá množství nebo koncentrace dané komponenty ve vzorku.

Kvantitativní výpočtové metody

1. Metoda vnitřní normalizace

Touto metodou se určuje obsah látek ve směsích, je počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známy. Tento typ kalibrace se většinou provádí při rutinních stanoveních. Množství určité komponenty se pak vyjadřuje jako relativní frakce z celku. Tedy, v určité směsi je x % látky A, y % látky B, z % látky C atd. Výsledky při použití této metody nezávisí na přesnosti objemu při nástřiku vzorku.

2. Absolutní kalibrace

Touto metodou se určuje absolutní koncentrace nebo absolutní množství látky na základě kalibrační závislosti. Protože u této metody je kritický objem nástřiku, závisí správnost metody na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů; často se doporučuje pracovat s autosamplerem.

Neznámé množství dané komponenty lze vypočítat z rovnice:

$$C_x = A_x / RF_x$$

kde

C_x neznámé množství stanovované látky X

A_x plocha píku odpovídající látce X

RF_x odezvový faktor pro látku X: $RF_x = A_s / C_s$, kde A_s je plocha píku, odpovídající látce X ve vzorku o známé koncentraci látky X, C_s .

3. Metoda vnitřního standardu

Při této metodě se ke vzorku přidává určité množství známé látky, tzv. interní standard, IS. Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí se eluovat v blízkosti stanovované složky.

Výhodou metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku. Navíc, s použitím IS se eliminuje vliv změn pracovních podmínek, protože jak stanovovaná složka tak IS jsou těmito změnami stejně ovlivněny.

Neznámá koncentrace analytu X ve vzorku se stanoví buď z kalibrační závislosti:

$$A_{Xi}/A_{IS} = f(C_{Xi}/C_{IS})$$

kde

A_{Xi} plocha signálu analytu X ve standardním roztoku

A_{IS} plocha signálu vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu X

$C_{X,i}$ koncentrace standardního roztoku analytu X

C_{IS} koncentrace vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu X

nebo dle vztahu:

$$C_{Xu} = C_{Xi}/C_{IS} * A_{IS}/A_{Xi} * A_{X,u}/A_{IS,u} * C_{IS,u}$$

kde

$C_{X,u}$ stanovovaná neznámá koncentrace analytu X

C_{Xi} koncentrace standardního roztoku analytu X

C_{IS} koncentrace vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu X

A_{Xi} plocha signálu analytu X ve standardním roztoku

A_{IS} plocha signálu vnitřního standardu ve standardním roztoku

$A_{X,u}$ plocha signálu analytu X ve vzorku o neznámé koncentraci analytu X

$A_{IS,u}$ plocha signálu vnitřního standardu ve vzorku o neznámé koncentraci analytu X

$C_{IS,u}$ koncentrace vnitřního standardu ve vzorku o neznámé koncentraci analytu X

4. Metoda standardního přídatku

Při použití této metody se ke známému množství vzorku přidává definované množství standardu dané látky, jejíž obsah se má stanovovat. V závislosti na typu komponenty se tento přídatek může provést buď ve formě čisté látky nebo jako roztok dané látky ve vhodném rozpouštědle. Stanovení může být založeno na jednom nebo několika přídávcích známého množství analytu k neznámému vzorku.

Úloha č. 2.

Použití plynové chromatografie v kvantitativní analýze

Metoda:

Chromatograf: Schimadzu GC-17A
Kolona: Spira KI8 (5% difenyldimethylsiloxan); i.d. = 0,2 mm; d = 25 m
Teplotní program: 80°C (1 min), 25°C/min -> 250°C
Objem nástřiku: 1 µl
Teplota injektoru: 250°C
Detektor: FID, 250°C
Nosný plyn: N₂

Postup:

- Příprava kalibračních roztoků: do 5 přesně zvážených odměrných baněk o objemu 10 ml postupně napipetujeme 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 ml ethyl-benzoátu. Určíme přesnou navážku esteru v každé baněce. Do každé baněky přidáme 0,5 ml methyl-benzoátu jako vnitřní standard (IS) a opět určíme jeho přesnou navážku. Doplníme diethyletherem. Vzorky dobře promícháme a analyzujeme na plynovém chromatografu.
- Sestrojíme kalibrační závislost: $A_{st}/A_{IS} = f(c_{st}/c_{IS})$

A_{st} plocha signálu standardu
 A_{IS} plocha signálu vnitřního standardu
 c_{st} koncentrace standardu
 c_{IS} koncentrace vnitřního standardu

- Proveďte analýzu neznámého vzorku a určete koncentraci analytu pomocí naměřené kalibrační závislosti

Protokol:

- Stručný popis úlohy (co je to vnitřní standard a proč se používá...).
- Popis chromatografických podmínek.
- Tabulka s experimentálními daty.

| číslo vzorku | c_{IS} (mol/l) | c_{ester} (mol/l) | A_{ester} | A_{IS} | A_{ester}/A_{IS} |
|--------------|---------------------|---------------------|-------------|----------|--------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |

- Graf kalibrační závislosti $A_{st}/A_{IS} = f(c_{st}/c_{IS})$.
- Výsledky stanovení koncentrace ethyl-benzoátu v neznámém vzorku.
- Závěr, zhodnocení výsledků.
- Protokol odevzdat do jednoho týdne pomocí ISu.