

ÚLOHA č. 3

PLYNOVÁ ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE (GLC)

Seznámení s metodou, stanovení acetonu v rozpouštědle

CÍLE ÚLOHY

- kvantitativně stanovit obsah acetonu v rozpouštědle pomocí plynové rozdělovací chromatografie.

DŮLEŽITÉ POKYNY (ČTĚTE PROSÍM POZORNĚ!!!):

- **otevírání** plynů zleva!
- dávat si pozor na *červenou kontrolku Ready!*
- **metoda nástřiku** - vymývat stříkačku destilovanou vodou, nasát požadované množství vzorku + ještě asi 2 µl vzduchu - nástřik provést **co nejrychleji** (hrot směřuje mírně k přednímu panelu)!
- stříkačka jde zasunout do přístroje hůře, proto nepoužívat násilí, ale šikovnost!
- **uzavírání** plynů zprava!
- plynový chromatograf můžete vypnout až teploty detektoru (DET 1) a nástřikového prostoru (INJ 1) klesnou pod 100 °C!!!

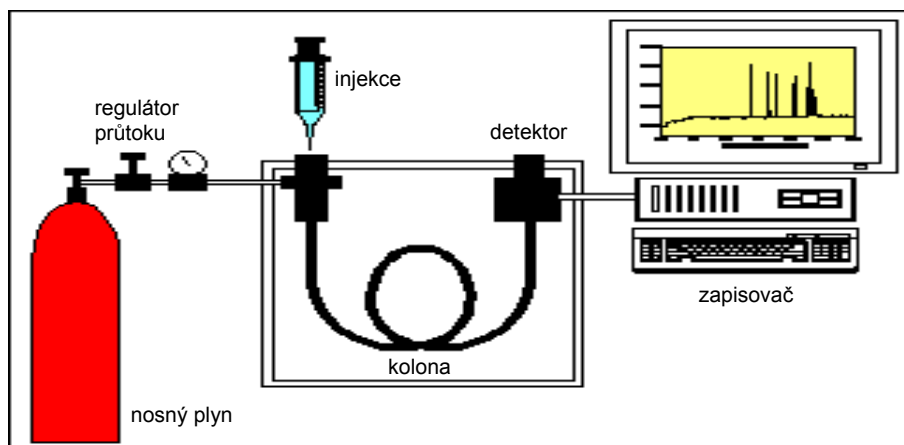
ÚKOLY:

- 3.1. Seznámení s metodou GC
- 3.2. Příprava vzorků k měření
- 3.3. Stanovení jednotlivých vzorků
- 3.4. Ukončení a vzhodnocení analýzy

3.1. SEZNÁMENÍ S METODOU GLC

PRINCIP:

Plynová chromatografie (GC) je vysoce účinná metoda pro separaci a stanovení plynných látek nebo látek, které lze zplynit. Hnací silou je proud inertního plynu (mobilní fáze). V tomto cvičení budete provádět analýzu rozpouštědla a stanovovat množství acetonu ve vzorku.



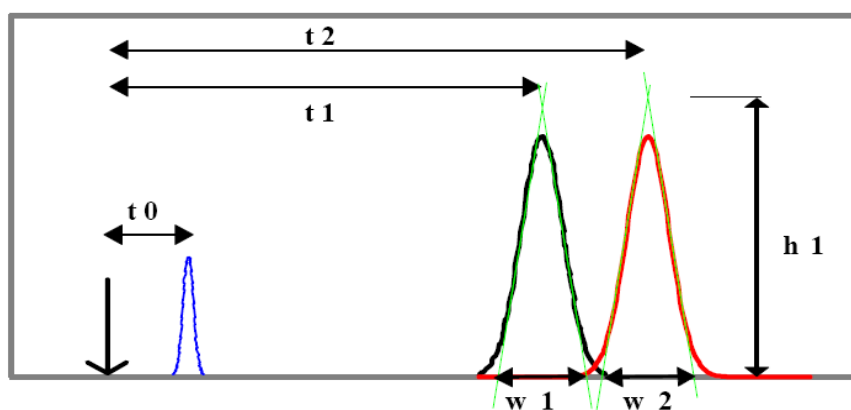
- kvalitativní charakteristikou látky je retenční čas t_r , popř. redukovaný retenční čas t_r'
- kvantitativní charakteristikou látky je výška píku h_{max} , popř. plocha píku A
- počet efektivních teoretických pater N_{ef} je mírou účinnosti kolony:

$$N_{ef} = 16 \frac{(t_r - t_0)^2}{w^2}$$

kde: t_0 je mrtvý čas

w je příslušná délka základny píku (trojúhelníku),

$(t_r - t_0)$ je redukovaný retenční čas t_r'



- rozlišení R_s je mírou separace dvou píků. Při $R_s = 1,5$ považujeme píky za kvantitativně odseparované:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2}$$

PRACOVNÍ PODMÍNKY:

- plynový chromatograf YL 6100 GC

NASTAVENÍ PODMÍNEK PRO METODU 3:

- metoda 3 - rozpouštědla:
 - detektor - plamenově ionizační (FID):
 - teplota detektoru: 240 °C
 - průtok: H₂ 30 ml, vzduch 300 ml, Makeup 20 ml
 - kolona:
 - typ: CARBOWAX, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka sorbentu 0,25 μm
 - tepelný program kolony: 40 °C (4 minuty), 40 °C/min, 180 °C (0 minut) ≈ 7,5 minut
+ 6 minut chlazení; celkový čas cyklu ≈ **13,5 minut**
 - průtok nosného plynu přes kolonu: 1 ml/min
 - rozdělovací poměr nástřiku: 1/70
 - nástřikový prostor:
 - teplota nástřikového prostoru: 200 °C

3.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ K MĚŘENÍ

POPIS VZORKŮ A ROZTOKŮ:

1. Vzorek rozpouštědla:
 - vzorek zředíte 100x - do odměrné baňky na 10 ml napipetujete 100 μl neznámého vzorku a doplníte destilovanou vodou po rysku; vzorky je vždy nutné ultrazvukit
2. Kalibrační roztoky:
 - obsah acetonu: 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,10 % (v/v) - do 100 ml odměrné baňky napipetujete postupně 20, 40, 60, 80 a 100 μl acetonu a doplníte destilovanou vodou po rysku
3. Roztok pro stanovení acetonu v rozpouštědle metodou přidavku standardu:
 - do odměrné baňky na 10 ml napipetujete 100 μl neznámého vzorku, přidáte 20 μl acetonu a doplníte destilovanou vodou

3.3. MĚŘENÍ

3.3.1. ZÁKLADY PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE:

1. Za dohledu vyučujícího si prohlédnete součásti plynového chromatografu (kolonový prostor, detektor, nástřikový prostor, atd)

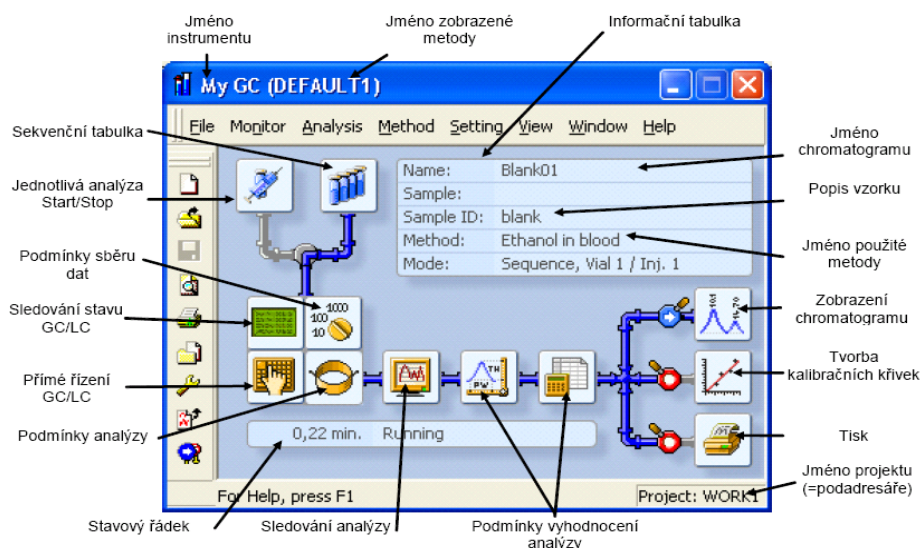
3.3.2. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ ACETONU VE VZORKU, URČENÍ MRTVÉHO ČASU:

METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY:



a) URČENÍ MRTVÉHO ČASU:

1. Pomocí hlavních ventilů otevřete postupně všechny plyny (! **POZOR:** první otevřete dusík – první tlaková láhev vlevo!)
2. Spustíte PC a tiskárnu
3. Vzadu zapnete plynový chromatograf a na počítači spustíte program **YLClarity**
4. Kliknete na ikonu *Login* pod nápisem Instrument 1, po otevření okna vyberete možnost *Student*, zadáte heslo *Slivovice* a kliknete **OK**





Objeví se vám následující okno:




5. Kliknete na *File* → *Open method...* → *metoda 1 - start.met* → **OK**
6. Poté kliknete na ikonku *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → **OK** (metoda se tímto způsobem pošle do GC a přístroj začne pracovat)
7. Kliknete na *File* → *Open method...* → *metoda 2 - vyhřivani.met* → **OK**
8. Po rozsvícení **červené kontrolky Ready** na předním panelu přístroje GC kliknete na ikonku *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → **OK**
9. Kliknete na *File* → *Open method...* → *metoda 3 - rozpouštědla.met* → **OK** (! **POZOR:** před posláním metody do GC a před provedením nástřiku vždy vyčkáte na rozsvícení **červené kontrolky Ready!**)
10. Po rozsvícení **červené kontrolky Ready** na předním panelu přístroje GC kliknete na ikonku *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → **OK**
11. Během čekání na rozsvícení **červené kontrolky Ready** si připravte požadované roztoky
12. Kliknete na ikonu **Single Analysis** (Jednotlivá analýza Start/Stop) a vypíšete informace ke vzorku do kolonek *Sample ID* (vaše jméno a příjmení), *Sample* (stručný popis vzorku), *Inj. Volume* (objem nástřiku) a do pole *Counter* napíšeme 1

13. Před prvním nástřikem provedete kontrolu funkčnosti detektoru: nad detektor přiložíte skličko, pokud se zarosí, vše je v pořádku a pokračujete dále dle návodu, pokud se skličko nezarosí, zavoláte na pomoc vyučujícího
14. Provedete nástřik asi 1 μl plynu, který nasajete z ventilu v laboratoři (! **POZOR**: první nástřik za dohledu vyučujícího!) a na GC stisknete „*ihned*“ tlačítko **Start** (na GC se rozsvítí zelená kontrolka **Run**)
15. Průběh chromatografie můžete sledovat po kliknutí na ikonu **Data Acquisition** (Sledování analýzy) - je vhodné nastavit rozsah cca od 0 do 1000 mV (může se lišit)
16. V následném okně chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace
17. V horizontální nástrojové liště kliknete na ikonku  **Print**, potvrdíte tisk a po vytištění chromatogramu zavřete okna chromatogramu a sledování analýzy

b) VYTVORENÍ KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI A URČENÍ MNOŽSTVÍ ACETONU VE VZORKU:

1. Kliknete na ikonu **Single Analysis** (Jednotlivá analýza Start/Stop) a vypíšete informace ke vzorku do kolonek *Sample ID*, *Sample* a *Inj. Volume*
2. Provedete nástřik 1 μl 1. kalibračního vzorku
3. Rozsah cca od 0 do 1000 mV (může se lišit)
4. V nástrojové liště chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace (označený zůstane pouze pik acetonu)
5. Zavřete chromatogram (potvrďte případnou otázku programu na změnu chromatogramu)
6. Provedete nástřik 1 μl 2. kalibračního vzorku
7. Rozsah cca od 0 do 1000 mV (může se lišit)
8. V nástrojové liště chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace (označený zůstane pouze pik acetonu)
9. Zavřete chromatogram (potvrďte případnou otázku programu na změnu chromatogramu)
10. Stejným způsobem provedete nástřik i 3., 4. a 5. kalibračního roztoku
11. Provedete nástřik 1 μl zředěného (1:100) neznámého vzorku
12. Rozsah cca od 0 do 2000 mV (může se lišit)
13. V nástrojové liště chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace (označený zůstane pouze pik acetonu)
14. Zavřete chromatogram (potvrďte případnou otázku programu na změnu chromatogramu)
15. Kliknete na ikonu **Calibration Window** (Tvorbina kalibračních křivek) a v kalibračním okně kliknete na *File* → *New*
16. Kliknete na ikonu  Open Standard, ve složce *Data* si naleznete chromatogram kalibračního roztoku č.1 a kliknete **OK**




17. V horizontální liště kalibračního okna kliknete na ikonu  **Add Peak** a levým tlačítkem na myši kliknete na pík acetonu

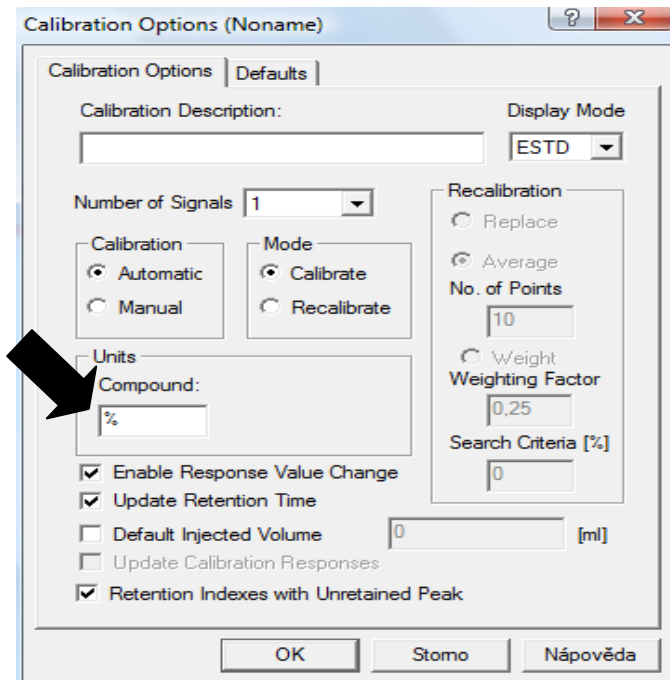
V tabulce se vám objeví přibližně takový popis:


Use d	Compound Name	Reten. Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Peak Color	LOD	LOQ	R.B.	Resp. Factor	Level 1			
											Response	Amount	Resp. Fact	Rec No.
1	Peak 3,40	3,400	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000	36,5913	0,000	0,0000	1


18. Do políčka *Compound Name* napíšete Aceton a do políčka *Amount* zadáte hodnotu 0,02

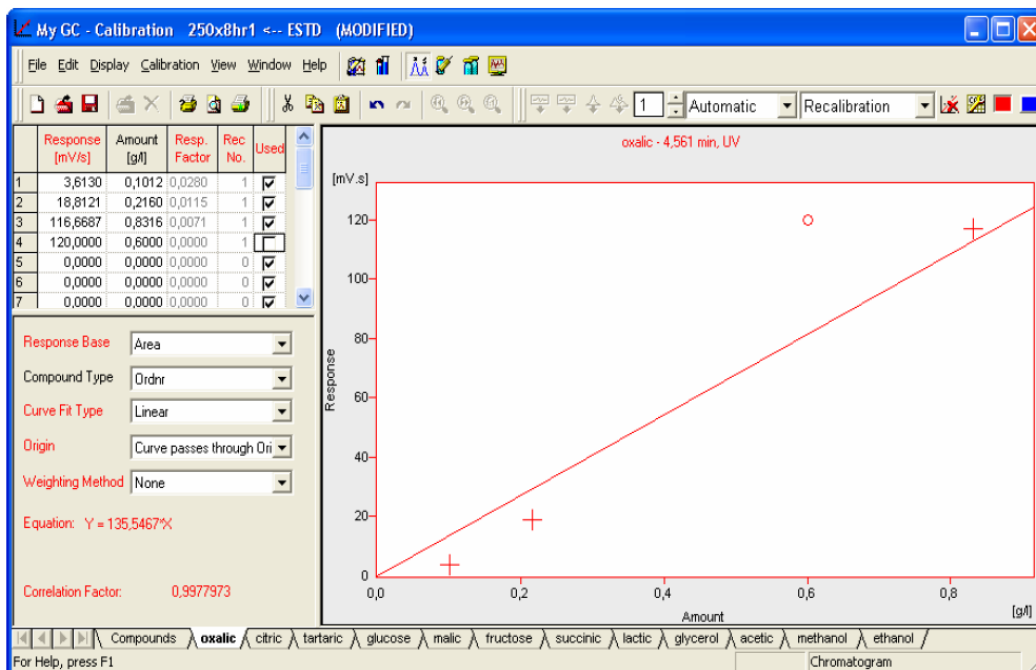
Use d	Compound Name	Reten. Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Peak Color	LOD	LOQ	R.B.	Resp. Factor	Level 1			
											Response	Amount	Resp. Fact	Rec No.
1	MeOH	3,400	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000	36,5913	0,020	0,0005	1

19. Kliknete na ikonu , ve složce *Data* si naleznete chromatogram kalibračního roztoku č. 2 a kliknete **OK**
20. V horizontální liště kalibračního okna kliknete na ikonu  **Add Peak** a levým tlačítkem na myši kliknete na pík acetonu
21. Do políčka *Amount* nyní zadáte hodnotu 0,04
22. Stejným způsobem postupujete i s kalibračními roztoky č. 3, 4 a 5
23. V horizontální nástrojové liště kliknete na ikonku  **Calibration Options** a v následném okně zadáte do políčka *Compound %*:



24. Kliknete na ikonu , ve složce *Data* si naleznete chromatogram 100x zředěného vzorku rozpouštědla a kliknete **OK**

25. V horizontální liště kalibračního okna kliknete na ikonu  Add Peak a levým tlačítkem na myši kliknete na pík acetonu
26. V levém dolním rohu kliknete na podokno s názvem *Aceton*
- Objeví se vám následující okno:





27. U vzorku rozpouštědla (prvních pět řádků patří standardům) odškrtnete políčko ve sloupci **Used** (na obrázku je to řádek 4) a pomocí vhodně zadaného přibližného množství do sloupce *Amount* graficky určíte polohu vzorku (v grafu se vám vzorek zobrazí jako kolečko - viz předchozí obrázek)
28. Kalibrační okno vytisknete a přesnou polohu vzorku určíte z rovnice
29. Kalibrační okno zavřete a **změny neukládáte!!!**

METODA PŘÍDAVKU STANDARDU:

- metoda předpokládá linearitu kalibrační závislosti

a) URČENÍ MNOŽSTVÍ ACETONU VE VZORKU:

1. Kliknete na ikonu **Single Analysis** (Jednotlivá analýza Start/Stop) a vypíšete informace ke vzorku do kolonek *Sample ID*, *Sample* a *Inj. Volume*
2. Provedete nástřik 1 μ l zředěného (1:100) vzorku rozpouštědla
3. Rozsah cca od 0 do 2000 mV (může se lišit)
4. V nástrojové liště chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace (označený zůstane pouze pík acetonu)
5. Takto upravený chromatogram vytisknete
6. Kliknete na ikonu **Single Analysis** (Jednotlivá analýza Start/Stop) a vypíšete informace ke vzorku do kolonek *Sample ID*, *Sample* a *Inj. Volume*

7. Provedete nástřik 1 μ l zředěného vzorku rozpouštědla s přidavkem standardu
8. Rozsah cca od 0 do 2000 mV (může se lišit)
9. V nástrojové liště chromatogramu kliknete na ikonku  Lock a vyřadíte nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace (označený zůstane pouze pík acetonu)
10. Takto upravený chromatogram vytisknete
11. Podle následujícího vzorce vypočítáte koncentraci neznámého vzorku:

$$c_1 = \frac{V_s}{V_1} * \frac{c_s}{\frac{A_2}{A_1} * \frac{(V_1 + V_s)}{V_1} - 1}$$

- kde:
- c_1 ... koncentrace neznámého analytu
 - c_s ... koncentrace standardu
 - V_1 ... objem vzorku
 - V_s ... objem roztoku standardu
 - A_1 ... plocha píku analytu o neznámé koncentraci c_1
 - A_2 ... plocha píku analytu o neznámé koncentraci c_1 po přidavku standardu o známé koncentraci c_s

3.3.4. UKONČENÍ ANALÝZY

1. Požádejte vyučujícího o kontrolu vaší práce
2. Kliknete na **File** → *Open method...* → *metoda 4 - ukonceni.met* → **OK**
3. poté kliknete na ikonku **Control** (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → **OK**
4. na ploše počítače kliknete na *Počítač* → *Systém (C:)* → *YLClarity* → *Koralka* → *Data*
5. **Vytvoříte si složku se svým jménem a přesunete do ní všechny vaše chromatogramy!!!**
6. Než se přístroj ochladí, vypnete PC, tiskárnu a uklidíte pracovní stůl
7. **! POZOR:** Před vypnutím GC zavoláte vyučujícího!
8. **! POZOR:** Uzavřete postupně ventily všech plynů - zprava!

3.4. VYHODNOCENÍ:

Do protokolu uvedete tyto výpočty:

1. **Pro aceton určete počet teoretických pater**
2. **Stanovíte rozlišení mezi plynem z ventilu a acetonem**
3. **Zjistíte procentuální množství acetonu ve vzorku rozpouštědla pomocí metody kalibrační křivky a metody přidavku standardu**
4. **Porovnejte mezi sebou obě metody a zdůvodněte možné rozdíly ve stanovení acetonu.**
5. **Odpovězte na otázky k diskusi dle zadání vyučujícího**