

2. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE (GC)

Stanovení methylalkoholu CH₃OH v konzumním destilátu pomocí GC

Plynová chromatografie (GC) je vysoce účinná separační metoda pro stanovení plynných látek nebo látek, které lze zplynit. Je založena na rozdílu v distribuci oddělovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Hnací silou je proud inertní mobilní fáze. Stacionární (nepohyblivá) fáze interaguje se složkami vzorku, který je unášen mobilní plynnou fází, a proto se při pohybu zdržují. Na konec stacionární fáze se tedy dostávají dříve složky méně zadržované. Síla interakce látky se stacionární fází je přímo úměrná počtu uhlíků v molekule. GC se používá pro směsi, které jsou teplotně stálé, ale současně i těkavé.

Methanol vzniká hydrolyzou pektinů ovoce, které bylo použito ke kvašení, proto je přítomnost metanolu v ovocných destilátech naprosto přirozená, takže v nich naše i evropská norma stanovuje povolený obsah 12 gramů metanolu na litr čistého alkoholu, což je šest gramů methylalkoholu v litru 50% ovocné pálenky. Kvalitní potravinářský líc k výrobě lihovin obsahuje max. jen 0,5 g metanolu v 1 l čistého (tj. 100% líhu). Jiným méně významným zdrojem methanolu v destilátech může být rozklad dalších přirozených složek ovoce, zejména anthokyanových barviv a podobných látek při kvašení zejména barevného ovoce. Obsah methanolu v destilátu může být také ovlivněn také způsobem destilace, kdy oddělením většího objemu první části destilátu, tzv. úkapu, dochází ke snížení obsahu methanolu v destilátu. Ovocný destilát je velmi složitou směsí desítek až stovek sloučenin jejichž přítomnost díky azeotropii, či jejich absence rozhoduje o čichovém či chuťovém vjemu daného destilátu. Jednotlivé ovocné destiláty mohou např. obsahovat stopová množství následujících látek: 2-propylalkohol, 2-butanol, octan ethylnatý, isobutanol, ethylpropionát, isohexanol, 3-methylbutanol, n-butanol apod.

Hranice nebezpečnosti methylalkoholu pro člověka je individuální, ale v destilátech významně převládá ethanol, který je metabolizován přednostně. Případy úmrtí nebo významného poškození zdraví proto nemohou být způsobeny lihovinami vyrobenými kvasnou cestou, ale přidávkou methanolu do lihoviny nebo úplnou záměnou kvasného líhu za methanol při výrobě lihovin.

Důležité pokyny:

- uzávěry tlakových láhví otevírat vždy po směru hodinových ručiček
- nastříkavat vždy až po rozsvícení červené kontrolky **Ready** na předním panelu plynového chromatografu
- metoda nástřiku - stříkačku vždy propláchnout destilovanou vodou, poté několikrát analyzovaným roztokem, po promytí nasát požadované množství vzorku → **nástřik provést co nejrychleji**
- uzávěry tlakových láhví uzavíráme vždy proti směru hodinových ručiček
- plynový chromatograf můžeme vypnout, až teploty detektoru (DET 1) a nástřikového prostoru (INJ 1) klesnou pod 50 °C

Kvalitativní charakteristikou látky je **retenční čas t_r** , popř. **redukovaný retenční čas $t_r' = t_r - t_0$** , kvantitativní charakteristikou látky je **výška píku h_{max}** , popř. **plocha píku A** .

Mírou účinnosti kolony je počet efektivních teoretických pater N_{ef} :

$$N_{ef} = 16 \frac{(t_r - t_0)^2}{w^2} \qquad N_{ef} = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{05}}\right)^2$$

Mírou separace dvou píků je **rozlišení R_s** :

(např. hodnota $R_s = 1$ udává, že dva stejné píky vykazují jen 2% překryv. Při $R_s = 1,5$ považujeme píky za kvantitativně odseparované)

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

Pracovní podmínky:

- plynový chromatograf YL 6100GC
- kolona: typ CARBOWAX, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka sorbentu 0,25 μm
- nosný plyn N₂ – průtok přes kolonu 1 ml/min
- detektor: plamenově ionizační (FID)

- metoda 3 – GC3 (FID - průtok: H₂ 30 ml.s⁻¹, vzduch 300 ml.s⁻¹, tepelný program kolony: 50 °C (3,5 minuty), 40 °C/min, 180 °C (0 minut) ≈ 6,8 minut + 6 minut chlazení; celkový čas cyklu ≈ 12,8 minut, teplota nástřikového prostoru 200 °C, teplota detektoru 220 °C, split (rozdělovací poměr nástřiku) 1/100)

2.1. Stanovení času, za který projde kolonou mobilní fáze (tzv. mrtvý čas)

Mrtvý čas kolony t_M je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Proměřit 1 ×.

Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony t_0 .

Tab.1. Stanovení mrtvého času kolony

název	V _{nástřik} (μl)	t _R (min)	A (mV.s)	h (mV)	w (min)	w ₀₅ (min)
methan	1					

2.2. Příprava roztoku směsi alkoholů

Ze zásobních roztoků alkoholů (methanol, ethanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol a isobutanol) připravit do 100 ml odměrné baňky směsný roztok alkoholů ve vodě (obsah jednotlivých látek 0,05 % v/v), tj. do 100 ml odměrné baňky napipetovat postupně 50 μl methanolu, ethanolu, 1-propanolu, isopropanolu, isobutanolu a 1-butanolu. Doplnit dest. vodou po rysku a umístit na 5 min do ultrazvukové lázně. V_{nástřiku} = 1 μl. Proměřit 1 ×.

Tab.2. Směsi alkoholům vodě

název	t _R (min)	t' _R (min)	A (mV.s)	h (mV)	w (min)	w ₀₅ (min)	N _{ef}	počet uhlíků	log t _R

2.3. Příprava vzorku konzumního destilátu

- do odměrné baňky na 10 ml napipetovat 1 ml vzorku konzumního destilátu a doplnit destilovanou vodou po rysku. Roztok umístit na 5 min do ultrazvukové lázně. Proměřit 3×.
- do odměrné baňky na 10 ml napipetovat 1 ml téhož vzorku konzumního destilátu a 10 μl standardu metanolu o φ_%(MeOH) = 100% v/v, doplnit destilovanou vodou po rysku. Roztok umístit na 5 min do ultrazvukové lázně. Proměřit 3×.

Tab.3. Stanovení obsahu methanolu v neznámém vzorku

č.	V _{vz} (μl)	V _{st} (μl)	c _{st} (%)	t _R (min)	A (mV.s)	h (mV)	w (min)	w ₀₅ (min)
1.		0						
2.		0						
3.		0						
4.		10						
5.		10						
6.		10						

2.4. Měření methyllalkoholu

Měření provést dle následujícího postupu. Nejprve proměřit nástrík 1 μl methanu (stanovení mrtvého času), který je třeba nasát do injekční mikrostříkačky (např. Hamilton) z plynového ventilu na laboratorním stole v laboratoři. Poté stejným způsobem proměřit jednotlivé vzorky.

Postup měření CH_3OH pomocí plynového chromatografu YL 6100GC:

1. Otevřít postupně ventily všech plynů (první otevíráme dusík – první tlaková láhev vlevo)
2. Plynový chromatograf YL 6100GC uvést do provozu stiskem tlačítka *ON* na zadním panelu přístroje, na počítači spustit program *YLClarity*
3. Kliknout na ikonu *Login* pod nápisem Instrument 1, po otevření okna vybrat možnost *Student* → heslo *Slivovice* → *OK*
4. Vybrat *File* → *Open method...* → *metoda 1 – start.met* → *OK*
5. Poté kliknout na ikonu *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → *OK* (metoda se tímto způsobem pošle do GC a přístroj začne pracovat)
6. Po rozsvícení červené kontrolky **Ready** na předním panelu přístroje GC vybrat *File* → *Open method...* → *metoda 2 - vyhrivani.met* → *OK*
7. Poté kliknout na ikonu *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → *OK*
8. Po opětovném rozsvícení červené kontrolky **Ready** na předním panelu přístroje GC vybrat *File* → *Open method...* → dle pokynu vyučujícího vybrat *metodu 3 – GC 1 až 4.met* → *OK*
9. Vybrat ikonu *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → *OK*
10. Během čekání na rozsvícení červené kontrolky *Ready* si připravit potřebné roztoky
11. Před prvním nástríkem provést kontrolu funkčnosti detektoru: nad detektor přiložit sklíčko, pokud se zarosí, vše je v pořádku a je možné dále pokračovat dle návodu, pokud se sklíčko nezarosí, přivolat na pomoc vyučujícího
12. Před nástríkem vždy rozkliknout ikonu *Single Analysis* (Jednotlivá analýza Start/Stop) → vypsat informace ke vzorku do kolonek *Sample ID* (vaše jméno a příjmení), *Sample* (stručný popis vzorku), *Inj. Volume* (objem nástríku) a do pole *Counter* napsat 1 → vyčkat na rozsvícení červené kontrolky **Ready**
13. Provést nástrík 1 μl vzorku a na GC „ihned“ stisknout tlačítko *Start* (na GC se rozsvítí zelená kontrolka *Run*)
14. Průběh separace můžeme sledovat po rozkliknutí ikony *Data Acquisition* (Sledování analýzy) – pro sledování průběhu separace je vhodné nastavit rozsah pomocí ikony *Signal range* cca od 0 do 300 mV pro stanovení mrtvého času, cca od 0 do 1500 mV pro jednotlivé vzorky (tato hodnota se může lišit)
15. Po ukončení analýzy v okně chromatogramu určit pořadí jednotlivých analytů na základě očekávaného chování v GC systému s plamenoionizačním detektorem a ve vertikální nástrojové liště kliknout na ikonu  *Lock* a vyřadit nepotřebné píky ve vybraném intervalu z integrace
16. Upravený chromatogram uložit pomocí funkce *File* → *Print to PDF*. Po uložení chromatogramu zavřít dialogové okno chromatogramu i okno sledování průběhu analýzy
17. Provést měření pro další vzorky dle postupu od bodu 12, před nástríkem vždy vyčkat na rozsvícení červené kontrolky **Ready**

2.5. Metody stanovení methyllalkoholu v konzumním destilátu

2.5.1. Metoda kalibrační přímky

Metoda založená na sestrojení grafické závislosti měřené veličiny na zvyšující se koncentraci kalibračních roztoků o známé koncentraci. Z této kalibrační křivky se hodnota hledané veličiny neznámého vzorku odečte. Použití metody kalibrační křivky je oprávněné v případě, že všechny vzorky a standardy jsou si svými vlastnostmi rovnocenné, tzn. že lze zanedbat vliv matrice vzorku.

Z jednotlivých chromatogramů pro stanovení methanolu je třeba si opsat následující položky pro vytvoření kalibrační závislosti v *Excelu*: retenční čas t_R v min, plochu píku A v $\text{mV}\cdot\text{s}$, výšku píku h v mV, šířku píku $w_{0,5}$ (min), w je třeba dopočítat.

Ze získaných hodnot sestrojít kalibrační závislost pro jednotlivé objemové koncentrace methanolu a z rovnice regrese vypočítat obsah methanolu ve vzorku konzumního destilátu (je nutné počítat také

s ředěním vzorku)

2.5.2. Metoda přidavku standardu

Metoda přidavku standardu předpokládá splnění podmínky linearity kalibrační závislosti mezi plochou píku a stanovovanou koncentrací. Její výhodou je eliminace vlivu matrice. Ke stanovovanému vzorku se přidá známé množství téže látky, u které se má stanovit neznámá koncentrace. Vždy se musí udělat nejméně dva nástríky vzorku – při prvním se dává přesné množství vzorku, při druhém se dává přesné množství směsi.

Koncentraci obsahu methanolu v neznámém vzorku při přidavku jednoho standardu ke vzorku je třeba určit podle následujícího vzorce:

- a) v případě, že, matrice a celkový objem je konstantní (tj. odm. baňka je doplněna po rysku) –
tzv. *metoda dvou roztoku*

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{(A_{vz+st} - A_{vz})} \cdot \frac{V_{st} \cdot c_{st}}{V_{vz}}$$

- b) v případě, že celkový objem není konstantní – tzv. *metoda jednoho roztoku*

$$c_{vz} = \frac{V_{st}}{V_{vz}} \cdot \frac{c_{st}}{\frac{A_{vz+st}}{A_{vz}} \cdot \frac{(V_{vz} + V_{st})}{V_{vz}} - 1}$$

kde: c_{vz} je koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku,
 c_{st} je koncentrace standardu,
 V_{vz} je objem stanovovaného vzorku,
 V_{st} je objem přidaného standardu,
 A_{vz} je plocha píku stanovovaného vzorku,
 A_{vz+st} je plocha píku stanovovaného vzorku a standardu.

2.7. Ukončení analýzy

1. Požádat vyučujícího o kontrolu naší práce
2. Kliknout na *File* → *Open method ...* → *metoda 4 - ukonceni.met* → *OK*
3. Poté kliknout na ikonu *Control* (Přímé řízení GC/LC) → *Apply* → *OK*
4. Vyhledat chromatogramy potřebné pro zpracování protokolu, tj kliknout na *Počítač* → *Systém (C:)* → *YLClarity* → *Koralka* → *Data*
5. Než se přístroj ochladí, vypnout PC a uklidit pracovní stůl

2.8. Vyhodnocení analýzy

V protokolu uvést všechny výpočty, přiložit grafy vybraných chromatogramů s popisem (tj. chromatogramy směsného roztoku č. 1, směsného roztoku č. 2 a konzumního destilátu bez přidavku methanolu), graf závislosti $\lg t_R$ na počtu uhlíků v molekule alkoholu a grafickou závislost pro metodu přidavku standardu. Stanovení obsahu methanolu v konzumním destilátu vyhodnotit pouze metodou přidavku standardu (graficky i početně).

1. **Z nástríku methanu určit mrtvý čas.**
2. **Z jednotlivých chromatogramů určit a uvést do tabulky pro jednotlivé látky retenční časy, plochy, výšky a šířky signálů w a w_{05} .**
3. **Sestrojit graf $\log t_r'$ vs. počet uhlíkových atomů v molekule n-alkoholů. V závěru uvést případnou závislost.**
4. **Zjistit účinnost kolony pro separované látky na základě počtu teoretických pater.**

5. Vypočítat rozlišení mezi dvěma signály (píky), které mají mezi sebou nejmenší rozdíl retenčních časů (rozlišení pro dva nejbližší signály).

6. Určit procentuální množství methanolu ve vzorku pomocí metody přidavku standardu (pro konstantní objem) graficky i početně a oba způsoby vyhodnocení porovnat. Pro grafické vyhodnocení sestavit graf závislosti A ($\text{mV}\cdot\text{s}$) vs. $V_{\text{přidavku}}$ (příp. $c_{\text{přidavku}}$), pro početní vyhodnocení vzorec a) z odstavce 2.5.2. Oba výsledky porovnat. *Uvědomit si, že při měření nebyla použita kalibrační křivka.*