ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ
KATEDRA CHEMIE

Stanovení vybraných analytů metodou plynové chromatografie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Ondřej Hodek

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Ing. Jan Hrdlička, Ph.D.

Plzeň, 2013

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

Plzeň, 26. března 2013

.....

vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat panu Ing. Janu Hrdličkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, ochotu a trpělivost během mé práce v laboratoři, ale i při zpracovávání této práce.

Děkuji také mé rodině za finanční a psychickou podporu při studiu.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta pedagogická
Akademický rok: **2011/2012**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Ondřej HODEK**
Osobní číslo:	**P10B0038P**
Studijní program:	**B1001 Přírodovědná studia**
Studijní obor:	**Chemie se zaměřením na vzdělávání**
Název tématu:	**Stanovení vybraných analytů metodou plynové chromatografie**
Zadávající katedra:	**Katedra chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Seznámit se s principy plynové chromatografie.
2. Seznámit se s ovládáním plynového chromatografu DANI Master.
3. Navrhnout metody pro stanovení vybraných analytů.
4. Metody optimalizovat a validovat.
5. Postupy stanovení shrnout do návodu pro stanovení vybraných analytů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **40 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Štulík K. a kol.: Analytické separační metody. Nakladatelství Karolinum, Praha 2005.
Master GC/AS - Operating Manual Eng-rev.1.0. (CD - Návod k použití GC Dani Master).

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jan Hrdlička, Ph.D.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **15. června 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2013**

Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka

L.S.

Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. června 2012

OBSAH

ÚVOD ..... **- 6 -**

1 TEORETICKÁ ČÁST ..... **- 7 -**

1.1. SEPARAČNÍ METODY ..... - 7 -

1.1.2. Vlastnosti látek ovlivňující jejich přechod mezi fázemi ..... *- 7 -*

1.1.3. Vlastnosti separačních metod ..... *- 8 -*

1.2. CHROMATOGRAFIE ..... - 8 -

1.2.1. Princip ..... *- 8 -*

1.2.2. Historie ..... *- 8 -*

1.3. TEORETICKÉ ZÁKLADY PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE ..... - 9 -

1.3.1. Vlastnosti systému v plynové chromatografii ..... *- 10 -*

1.3.2. Kolony používané k separaci v plynové chromatografii ..... *- 11 -*

1.4. DETEKCE ANALYTŮ ..... - 12 -

1.4.1. Detektor elektronového záchytu ..... *- 13 -*

1.4.2. Plamenově ionizační detektor ..... *- 13 -*

1.5. METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY ..... - 14 -

1.6. REŠERŠE ..... - 15 -

2 PRAKTICKÁ ČÁST ..... **- 19 -**

2.1. SPECIFIKACE PŘÍSTROJE ..... - 19 -

2.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A TLAKOVÉ LÁHVE ..... - 20 -

2.3. PRACOVNÍ POSTUPY ..... - 21 -

2.3.1. Nástřik vzorku ..... *- 21 -*

2.3.2. Úprava injekční stříkačky ..... *- 22 -*

2.3.3. Určení mrtvého času kolony Zebron ZB-WAXPlus ..... *- 22 -*

2.3.4. Pracovní postup měření na koloně Restek RXI-35 Sil MS ..... *- 23 -*

2.3.5. Pracovní postup měření na koloně Zebron ZB-WAXPlus ..... *- 28 -*

3 VÝSLEDKY A DISKUZE ..... **- 30 -**

3.1. URČENÍ REDUKOVANÉHO RETENČNÍHO ČASU A RETENČNÍHO FAKTORU ETHANOLU A METHANOLU NA KOLONĚ ZEBRON ZB-WAXPLUS ..... - 30 -

3.1.1. Výpočet rozlišení píků methanolu a ethanolu na koloně Zebron ZB-WAXPlus a Restek RXI-35 Sil MS ..... *- 31 -*

3.2. VÝSLEDKY STANOVENÍ METHANOLU A ETHANOLU V DESTILÁTECH METODOU GC-FID ..... - 32 -

3.3. SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ZÍSKANÝCH FOTOMETRICKOU METODOU A METODOU GC-FID ..... - 36 -

4 ZÁVĚR ..... **- 37 -**

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... **- 38 -**

6 SEZNAM PŘEJATÝCH OBRÁZKŮ ..... **- 39 -**

7 KLÍČOVÁ SLOVA ..... **- 40 -**

8 RESUMÉ ..... **- 41 -**

9 PŘÍLOHY ..... **- 42 -**

ÚVOD

Chromatografické metody mají dnes nezastupitelnou úlohu při stanovování analytů ve složitých vzorcích. Pro látky těkavé je vhodnou metodou plynová chromatografie. Touto metodou lze analyzovat především organické látky s teplotou varu do 400°C. Chromatografické metody jsou dnes často využívány při kontrole kvality potravin, např. při analýze destilátů.

Tato práce popisuje postupy vytváření metody „Stanovení vybraných analytů metodou plynové chromatografie“ a následnou optimalizaci metody stanovení methanolu a ethanolu v reálných vzorcích. Vytvořená metoda bude používána studenty katedry chemie FPE ZČU v rámci předmětu „Laboratorní cvičení z instrumentální analýzy“. Zjištěné koncentrace methanolu v reálných vzorcích metodou plynové chromatografie jsou porovnány s koncentracemi methanolu stanovenými fotometricky. Fotometrické stanovení methanolu v destilátech provádělo centrum Nové technologie, které zároveň poskytlo reálné vzorky pro stanovení metodou plynové chromatografie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1.Separační metody

1.1.1. Separace

Děj, při kterém dochází k úplnému rozdělení nejméně dvou složek ve vzorku na základě fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností těchto složek. Při většině separačních metod (extrakce, papírová chromatografie a TLC, GC, HPLC) dochází k distribuci složek směsi nejméně mezi dvě fáze, tento proces lze popsat třemi kroky:

1. transport analytu k mezifázi

2. převod přes mezifázi

3. transport od mezifázi

Vedle těchto základních kroků probíhají během separačního děje v systému různé chemické reakce, které jsou spontánní, nebo uměle vyvolané s úkolem usnadnit přechod mezi fázemi. Další procesy, které usnadňují převod látek mezi fázemi, jsou rozdíly v rozpustnosti látky ve dvou různých fázích, dále fyzikální adsorpce, chemisorpce (tvorba komplexů) a iontová výměna. Separační děj může probíhat pouze v jedné fázi, pak jsou složky ve vzorku děleny na základě různých transportních rychlostí v silovém poli (elektroforéza, ultracentrifugace). Separační metody byly vyvinuty pro dělení komplikovaných vzorků, které obsahují podobné látky podobných vlastností, jejichž rozdělení není možné provést jinými způsoby.[1]

1.1.2. Vlastnosti látek ovlivňující jejich přechod mezi fázemi

Sorpce je obecný název procesu, během kterého dochází k pronikání částic jedné fáze do fáze druhé bez vytvoření třetí fáze. Dále je důležité, zdali částice z jedné fáze pronikají pouze na povrch fáze druhé, pak se tento děj označuje jako adsorpce. Pokud se částice dostávají do hloubky objemu druhé fáze, mluvíme o absorpci.

Pokud mezi částicemi adsorbentu a adsorbátu dojde k chemické reakci, ve většině případů se vytvoří koordinační sloučenina. Tento děj se nazývá chemisorpce.[1]

1.1.3. Vlastnosti separačních metod

Selektivita – schopnost separační metody dělit složky např. na základě strukturní odlišnosti (tvar a velikost molekul apod.).

Rozsah použitelnosti – předurčuje vhodnost separační metody vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem vzorku. Např. pro dělení těkavých směsí využijeme metodu plynové chromatografie, ale pro rozdělení málo těkavých složek ve vzorku zvolíme metodu kapalinové chromatografie.

Frakcionační kapacita – udává počet částí popř. složek vzorku, který může být získán jedinou separační operací.[2]

1.2. Chromatografie

1.2.1. Princip

Chromatografický proces je založen na existenci fáze mobilní a stacionární, přičemž analyt je unášen mobilní fází po fázi pevné (např. TLC chromatografie), která je umístěna v ploše a, nebo přes kolonu, která je nejčastěji vyplněna fází pevnou nebo kapalnou. Tato pevná tzv. stacionární fáze zadržuje různé analyty ze vzorku různou dobu a odlišnou silou.

1.2.2. Historie

Objevitelem této separační metody byl Michail Semjonovič Cvět. Tento ruský botanik sestrojil roku 1903 první aparaturu, která fungovala na principu kapalinového chromatografu, pomocí tohoto zařízení pak odděloval složky chlorofylů. Jednalo se o několik skleněných nálevek, které byly naplněny uhličitanem vápenatým. Po nanesení biologického vzorku byl přes kolonu pod tlakem hnán sirouhlík a tak se jednotlivé druhy chlorofylů rozdělily do vrstev odlišných barvou. Po separaci byla kolona vytlačena z nálevky, nařezána dle barvy a chlorofyly adsorbované na stacionární fázi byly extrahovány do roztoků.[3]

Počátky plynové chromatografie spadají do první poloviny 20. století, kdy se používalo dřevěné uhlí pro přečištění plynů nebo pro regeneraci rozpouštědel v průmyslu. Na počátku 40. let se dřevěné uhlí začalo používat v plynových chromatografech jakožto stacionární fáze pro analýzu uhlovodíků a esterů v průmyslu. Roku 1941 Martin a Synge navrhli používání kolon potažených vysoko vroucí kapalinou pro čistě analytické účely.

Dříve používaná kapalná mobilní fáze byla nahrazena plynnou mobilní fází, protože při použití plynu jakožto mobilní fáze je možno používat delší kolony, a tím dosáhnout větší účinnosti při separaci, a detekce analytů v plynné fázi je jednodušší než v kapalině. Martin a Synge aplikovali zjištění, že difúze v plynné fázi je mnohonásobně rychlejší než ve fázi kapalné (stacionární fáze) a účinnost separace v koloně tak závisí hlavně na rychlosti difúze v kapalné fázi.

Zjistili, že počet teoretických pater každé kolony je úměrný její délce. Počet teoretických pater kolony o délce 121,92 cm byl od 700 do 1200, zatímco u kolony dlouhé 365,76 cm byla její míra separace ekvivalentní až 2000 pater. Během jejich práce také testovali vliv teploty na účinnost separace a při experimentech zjistili, že při 65°C vykazovala kolona účinnost 365 teoretických pater, zatímco při 100°C u téže kolony byla prokázána účinnost 720 teoretických pater. Dále experimentem potvrdili, že dle teorie by měl mít parciální tlak separovaných složek zanedbatelný, ale v praxi být zanedbatelný nemusí. Pokud je parciální tlak nějaké složky v koloně vyšší, dochází k rozmývání její zóny vlivem vyšší rychlosti v koloně kvůli vyššímu tlaku této složky.[4]

1.3. Teoretické základy plynové chromatografie

Jak již bylo uvedeno, principem kolonové chromatografie je průchod mobilní fáze přes kolonu. V případě plynové chromatografie (GC) je mobilní fází inertní plyn (dusík, helium, vodík apod.). Rozdělení koncentrace analytu během průchodu kolonou mezi stacionární a mobilní fázi je zajištěno adsorpcí a rozpouštěním. Toto rozdělení je považováno za rovnovážné. Průchod mobilní fáze je zajištěn tlakovým spádem mezi injektorem a detektorem a teplotním gradientem.

Metoda plynové chromatografie může být využívána jak ke kvantitativnímu stanovení analytu ve vzorku, tak ke kvalitativní analýze směsi neznámých vzorků. Množství analytu je detekováno měřícím systémem. Jeho signál je funkcí obsahu analytu ve vzorku a citlivosti detekčního zařízení. Faktorem určujícím kvalitu (složení) analytu je retenční čas (t_R).

Retenční čas analytu:

$$t_R = \frac{L}{u'}$$

L je délka kolony v cm, a u´ je průměrná lineární rychlost analytu.

Pojem retenční čas analytu vychází z definice mrtvého času (t_M). Ten udává čas, za který mobilní fáze projde kolonou. K určení mrtvého času se používá plyn

(marker/značkovač, např. metan), který je minimálně zadržován stacionární fází kolony, ale musí být rozeznán detektorem.

Pro mrtvý čas platí:

$$t_M = \frac{L}{u}$$

kde *L* je délka kolony v cm, *u* představuje lineární rychlost mobilní fáze v koloně.

Nejčastěji se retenční čas analytu vyjadřuje jakožto tzv. redukovaný retenční čas ($t_R´$):

$$t_R´ = t_R - t_M$$

Další důležitou veličinou charakterizující retenční vlastnosti analytu je retenční faktor (k). Tento faktor popisuje poměr objemu analytu ve stacionární a mobilní fázi:

$$k = q \cdot \frac{Vs}{Vm}$$

kde q je rozdělovací poměr, V_s představuje objem analytu ve stacionární fázi a V_m objem analytu v mobilní fázi.

Dále retenční faktor lze vyjádřit poměrem redukovaného retenčního času ($t_R´$) a mrtvého času (t_M):[1]

$$k = t_R´ / t_M$$

1.3.1. Vlastnosti systému v plynové chromatografii

Charakter plynově chromatografického systému nezávisí na typu analytu a současně je popsán dvěma základními vlastnostmi: účinností systému (schopnost opakujícího se ustavení rovnováhy v koloně) a selektivitou systému (schopnost ovlivnění velikosti rozdělovacího poměru). Podmínky, při nichž rozdělovací poměr analytu zůstává stejný po celé délce kolony, nazýváme jako jednodimenzionální. Opakem jsou vícedimenzionální chromatografické podmínky, které umožňují změnu hodnoty rozdělovacího poměru analytu (např. teplotní program).

Účinnost systému je vyjádřena počtem tzv. teoretických pater (n), je charakterizována dvěma parametry: délkou kolony (L) a výškovým ekvivalentem odpovídajícímu jednomu teoretickému patru (H):

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

$$n = 5{,}545 \left(t_{Rmax} / w_{1/2} \right)^2$$

kde t_{Rmax} je retenční čas posledního detekovaného analytu a $w_{1/2}$ představuje šířku tohoto píku v polovině jeho výšky. Faktor před závorkou 5,545 (číselně odpovídá 8 ln2) je spojen s určením šířky píku.

V plynové chromatografii je selektivita systému určena pouze fází stacionární (adsorpcí, slabými interakcemi), jelikož fáze mobilní je indiferentní plyn. Selektivita systému se nejčastěji vyjadřuje pomocí rozlišení dvojice píků (analytů) ($R_{i,j}$):

$$R_{i,j} = [(r_{i,s} - 1)/(r_{i,s} + 1)][(k_i + k_j)/(2 + k_i + k_j)] \cdot \sqrt{n}$$

kde $r_{i,s}$ je selektivita vyjádřená poměrem retence dvou zvolených standardů (*i* a *j*), k_i a k_j představují retenční faktory těchto standardů. Pokud je rozlišení větší než 1,5, pak jsou píky od sebe dostatečně odděleny. Jestliže je rozlišení menší než 1,5, píky se překrývají.[1]

1.3.2. Kolony používané k separaci v plynové chromatografii

Existují dva základní druhy kolon, které se používají v plynové chromatografii: náplňové a kapilární. V dnešní době jsou používanějším typem kolony kapilární pro jejich vyšší účinnost. Dle skupenství stacionární fáze se metoda plynové chromatografie dělí na dva typy: plynová adsorpční chromatografie (GSC - gas-solid chromatography), kde stacionární fáze je tuhý adsorbent a bývá obvykle umístěn v náplňových kolonách, plynová rozdělovací chromatografie (GLC - gas-liquid chromatography), u níž stacionární fázi představuje kapalinu fixovanou v kapilární koloně.

Náplňové a kapilární kolony se liší v rozměrech, jak ukazuje tab. 1.

Tabulka 1 **– Rozměry náplňových a kapilárních kolon**

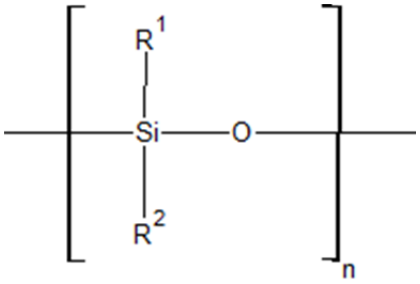
parametr kolony	náplňové	kapilární
délka (L) v m	0,5 – 4	10 – 60
průměr (d) v mm	2 – 5	0,2 – 0,7

Náplňové kolony se vyrábějí ze skla nebo oceli, jsou to trubice naplněné tuhým granulovaným materiálem nebo kapalnou stacionární fází uchycenou na nosiči (křemelina).

Kolony kapilární mají stacionární fázi v kapalném stavu ukotvenou na stěnách kapiláry. Vnitřní stěny kapiláry se mohou upravovat např. naleptáním, aby se zvětšil vnitřní povrch kapiláry, a tak vznikne možnost uchytit na stěny kapiláry větší množství stacionární fáze. Další možností je úprava přímo taveného křemene, která spočívá

v inaktivaci silanolů na vnitřní vrstvě kapiláry a následném chemickém navázání funkčních skupin, které pak určují rozsah použitelnosti kolony. Kapilární kolony jsou vyráběny z taveného křemene, jehož vnější povrch je pak potažen vrstvou polyimidu, což přispívá k větší pružnosti kolony.

Podle charakteru analyzovaného vzorku se volí typ kolony a hlavně typ stacionární fáze, při výběru platí obecný princip, že stacionární fáze by měla mít podobný charakter jako analyzovaný vzorek. Stacionárních fází existuje nespočet typů, ale v současné době se jejich výběr omezil na několik typů, které jsou vyráběné na bázi polysiloxanů s obecnou strukturou:



Obr. 1 **Obecná struktura polysiloxanů**

Nejdůležitějším parametrem, který rozhoduje při volbě vhodné kolony je polarita stacionární fáze. Substituenty u polysiloxanů určují jejich polaritu: pokud za R dosadíme methylové skupiny, jedná se o nepolární stacionární fázi vhodnou pro separaci látek nepolárních (uhlovodíky, rozpouštědla), pokud se ovšem na místě R budou nacházet skupiny CH=CHCN, potom se jedná o silně polární stacionární fázi vhodnou k separaci alkoholů nebo aldehydů. Dvě extrémní stacionární fáze představují skvalan ($C_{30}H_{62}$) – silně nepolární, a polyethylenglykol (střední molekulová hmotnost ≈ 20 000) – silně polární stacionární fáze. Polyethylenglykol je vysokovroucí kapalina nanášená ve formě tenkého filmu na vnitřní stěny kolony. V takto upravené koloně dochází k distribuci analytu mezi plynnou a kapalnou (stacionární) fází (polyethylenglykol). Kolony tohoto typu jsou vhodné pro dělení vysoce polárních a těkavých složek vzorku (např. destiláty).[2]

1.4. Detekce analytů

Zařízení, v němž dochází k převádění množství analytu, nejčastěji na elektrický signál, se nazývá detektor. Ten je umístěn na výstupu z kolony a je spojen s hardwarovým zařízením zobrazujícím signály pro různé analyty.

Existuje řada detektorů. Každý typ detektoru je určen pro stanovení takových látek, na které je citlivý. Detektory se nejčastěji dělí na 3 základní skupiny podle fyzikálně-chemického principu, na kterém pracují. Tyto tři principy jsou: tepelná vodivost (teplotně vodivostní detektor, TCD), ionizační účinnost (např. detektor elektronového záchytu, ECD; plamenově ionizační detektor, FID), fotoemise (plamenově fotometrický detektor, FPD).[1]

1.4.1. Detektor elektronového záchytu

Tento druh detektoru se používá v metodě plynové chromatografie od roku 1960. Detekce analytů tímto detektorem spočívá ve schopnosti eluovaných látek přijmout nízkoenergetický elektron a vytvořit tak aniont. Tuto skutečnost velice ovlivňují vlastnosti analytu vstupujícího do detektoru, tzn. elektronová afinita atomů či molekul a s ní související jejich elektronová konfigurace. Proto se s výhodou tento typ detektoru používá ke stanovení látek, které mají v molekule obsažený atom halogenu.

Detektor je tvořen kovovou komůrkou, do které ústí výstup z kolony. Na stěnách komůrky se nachází fólie se zdrojem záření β (obvykle ^{63}Ni). Uvnitř komůrky jsou umístěny dvě sběrné elektrody, které detekují zvýšení elektrického proudu při průchodu analytu detektorem. Aby mohly být elektrony zachyceny molekulou popř. atomem, musejí být elektrony vycházející ze zdroje zbrzděny, protože elektronový záchyt může probíhat pouze při nízké energii elektronů. Výsledný signál detektoru je složen z různých příspěvků, některé možné děje procházející proud snižují a jiné zvyšují.[1]

1.4.2. Plamenově ionizační detektor

Začal být využíván v plynové chromatografii v roce 1958 a v současné době je nejrozšířenějším detektorem v této analytické metodě. Jeho princip je založen na měření elektrického proudu procházejícího sběrnými elektrodami. Výstup z kolony ústí do hořáku, ve kterém je spalována směs vodíku, vzduchu a analytu vycházejícího z kolony.

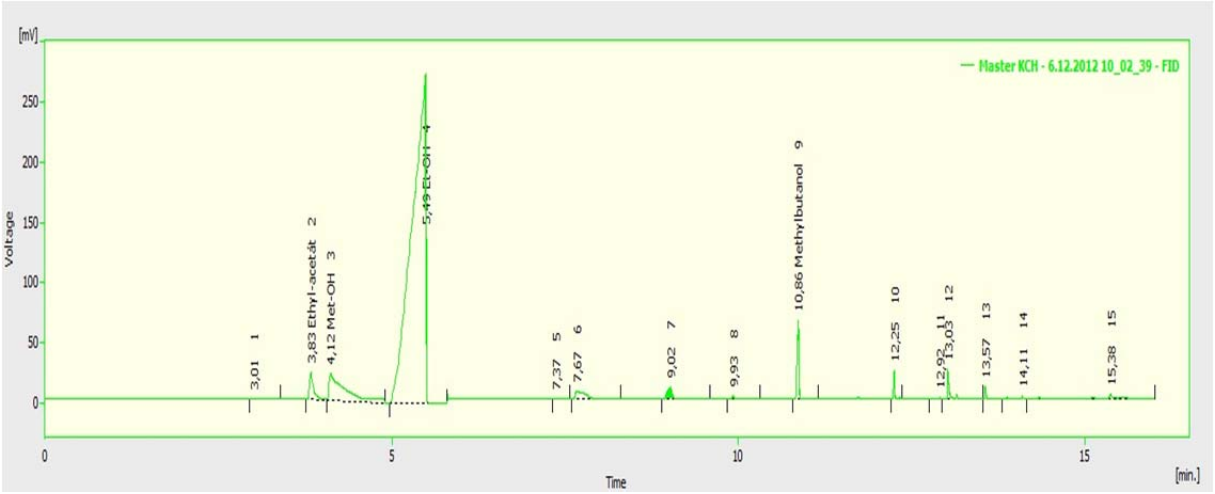
Během hoření je uvolňována tepelná energie, která chemiionizuje molekuly analytu na ionty a elektrony, které zvyšují hodnotu elektrického proudu procházejícího sběrnými elektrodami. Výsledný signál tohoto detektoru je závislý na počtu uhlíkových atomů, které lze ionizovat (zvýšení signálu). Dále na množství molekul, které ionizovat nelze a na možnosti elektronového záchytu, který rovněž snižuje signál detektoru.

Výsledný signál lze tedy popsat jakožto příspěvky různých jevů:

$$S = bc + ic_n - ic_{CO} - ic_{ECD}$$

kde *b*c je hodnota tzv. základního proudu, ic_n se rovná počtu atomů uhlíku v molekule, které jsou ionizovatelné, ic_{CO} představuje počet molekul uhlíku neionizovatelných a hodnota ic_{ECD} je rovna množství nízkoenergetických elektronů pohlcených v rámci elektronového záchytu.

Tento detektor je univerzální, a tak je široce využíván při detekci hlavně organických látek.[1] Příklad chromatogramu získaného při analýze destilátu pomocí plamenově ionizačního detektoru:

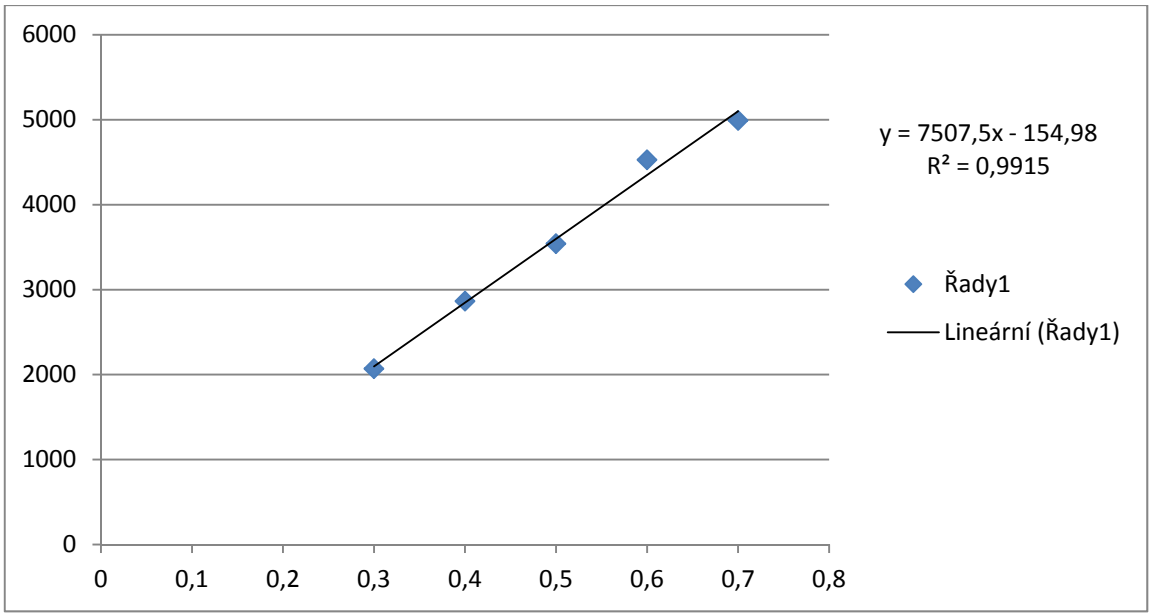


Obr. 2 **Chromatograf destilátu detekovaného FIDem**

1.5.Metoda kalibrační křivky

Kalibrace tímto způsobem je v analytické praxi stěžejním prvkem stanovení množství analytu ve vzorku. K vytvoření kalibrační křivky je zapotřebí připravit několik standardů o různé koncentraci, přičemž se předpokládá, že závislost koncentrace analytu standardů a analytického signálu je lineární. Interval zvolených koncentrací by měl pokrývat celý rozsah stanovovaného analytu. Poté se měří odezvy detektoru v intervalu koncentrace standardů. Ze zjištěných údajů je vytvořen graf s vynesenými body. Kalibrační křivka je linearizována proložením přímkou zjištěnými body.[2]

Model kalibrační křivky by měl mít několik základních vlastností: dostatečnou schopnost predikce, měl by dovolit interpretaci a měl by být dostupný k opodstatněným úpravám.[5] Příklad kalibrační křivky je uveden na obrázku 3.



Obr. 3 **Příklad kalibrační křivky závislosti koncentrace ethanolu na ploše píku**

1.6. Rešerše

Methanol vzniká přeměnou pektinů v ovoci při alkoholovém kvašení. Pektiny tvoří součást rostlinných pletiv a jsou to lineární řetězce kyseliny galakturonové, jejichž karboxylové skupiny jsou esterifikovány methanolem. K odštěpování molekul methanolu dochází během alkoholového kvašení a methanol je tak přirozenou součástí ovocných destilátů.

Tato sloučenina je jednosytný alkohol s jedním uhlíkovým atomem v molekule. Jedná se o vysoce toxický jed, z jehož struktury vyplývá několik skutečností. Obecně platí, že narkotické účinky jednoduchých alkoholů rostou se zvětšující se molekulovou hmotností. Toxicita těchto alkoholů má opačnou závislost. Z toho plyne, že methanol má nejmenší narkotické účinky z řady jednoduchých alkoholů. Avšak jako nejnižší člen řady jednoduchých alkoholů se vyznačuje nejvyššími toxickými účinky. Velké nebezpečí spočívá v jeho biotransformaci na formaldehyd a následně na kyselinu mravenčí. Tyto metabolity působí jako nervové jedy a zasahují především zrakový nerv. Smrtelná dávka pro člověka je okolo 30 ml a ztrátu zraku může způsobit 7-15 ml čistého methanolu.

Protilátkou při léčbě otravy methanolem jsou dávky zředěného ethanolu, který snižuje množství biotransformovaného methanolu díky kompetenci na biotransformačním místě.

Před započetím samotné práce v laboratoři byly shromážděny některé dostupné informace z článků a prací vyhledaných na vědeckých internetových portálech (www.webofknowledge.com; www.sciencedirect.com), které se týkaly analýzy alkoholických nápojů a stanovení chemických sloučenin v nich.

Tyto informace byly využity během prvotního nastavení chromatografu v rámci optimalizace vyvíjené metody. Jednalo se především o nastavení teplotního a časového programu temperované pece a o nastavení teploty injektoru a detektoru. Toto nastavení bylo provedeno v softwarovém vybavení počítače (program značky Clarity) propojeném s chromatografem.

Teploty injektoru a detektoru byly převzaty z práce autorů Apostolopoulou et al.[6], kde autoři popisují analýzu řeckého destilátu zvaného „tsipouro“ získávaného destilací ze zbytku po výrobě vína. Takto získaný destilát obsahuje přes 50 % ethanolu a před distribucí je ředěn vodou až na obsah ethanolu v destilátu v rozmezí 37,5 - 50 %. Jedním z přístrojů, který autoři používali k analýze tohoto destilátu, byl plynový chromatograf značky Fisons s plamenově ionizační detekcí a s parametry kolony rozměrově podobnými koloně Restek RXI-35 Sil MS (využita při vyvíjení metody Stanovení vybraných analytů metodou plynové chromatografie). Informace získané z této práce (např. teplotní program pece) mohly být s výhodou považovány za relevantní (vzhledem k podobnosti přístrojů) a mohly být dále využívány.

První nastavení teplotně časového programu pece bylo inspirováno několika informačními zdroji. Wang et al. se ve své práci[7] zabývali rychlým stanovením methanolu v destilátech. Jimi používaná polární kolona CP-Wax 58 CB o délce 30 m a průměru 0,53 mm byla vhodná pro stanovení methanolu. Doba jedné analýzy byla 9 minut při nastavení teplotního programu pece:

Tabulka 2 **Teplotní program stanovení methanolu ve vzorcích alkoholických nápojů**

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	38	3	50
2	250	1	0

Podstatné informace o teplotním programu pece byly získány z práce Cristina López-Vazqueze et al.[8], která pojednává o stanovení methanolu a vyšších alkoholů ve španělském destilátu „orujo“ získávaného ze zkvašených výlisků hroznů. Stanovení 33 významných látek proběhlo na koloně CP-Wax 57 CB o délce 30 m a vnitřním průměru 0,32 mm.

Tabulka 3 **Teplotní program analýzy španělského destilátu**

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	40	3	6
2	75	0	9
3	210	0	0

Bakalářská práce M. Machalíčka[9], jež se zabývala stanovením methanolu a dalších alkoholů v konzumním destilátu (viz tabulka 4), posloužila k orientačnímu nastavení počátečního teplotního programu.

Tabulka 4 **Teplotní program analýzy konzumního destilátu**

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	50	2	5
2	60	0	30
3	180	0	0

Téměř konečný teplotní program pro později použitou kolonu byl získán z katalogu produktů firmy Phenomenex[10], u které byla v průběhu optimalizace metody pořízena kolona Zebron ZB-WAXPlus.

Tabulka 5 **Teplotní program určený pro kolonu Zebron ZB-WAXPlus**

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	35	5	10
2	85	0	25
3	200	1	0

Výše uvedené informace byly vzaty v úvahu při tvorbě teplotních programů a celkového nastavení přístroje. Finální teplotní program a nastavení chromatografu, uvedené níže v praktické části této práce, pak vychází především z teplotního programu uvedeného v tabulce 5.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1.Specifikace přístroje

Měření byla prováděna na chromatografu DANI Master GC Fast Gas Chromatograph firmy DANI Instruments SpA (viz obr. 4).

Obr. 4 **Chromatograf DANI Master**

- maximální možný počet injektorů, kolon a detektorů: 3,3 a 3
- instalovaný počet injektorů, kolon a detektorů: 2,2 a 2
- použité detektory: FID, ECD
- operační teplota temperované pece: od 5°C nad laboratorní teplotu do 500°C
- maximální teplota injektoru a detektoru: 450°C
- název kolony, na které byla prováděna první část měření: Restek RXI-35 Sil MS
    - délka kolony: 30 m
    - průměr kolony: 0,25 mm
    - tloušťka naneseného filmu na povrchu kolony: 0,25 μm

- název kolony pořízené v průběhu měření: Zebron ZB-WAXPlus
    - délka kolony: 30 m
    - průměr kolony: 0,25 mm
    - tloušťka naneseného filmu na povrchu kolony: 0,25 μm
- použitý nosný plyn: dusík (25 ml/min)
- plyny ústící do FID detektoru: vodík (40ml/min) + vzduch (280 ml/min)

2.2.Použité chemikálie a tlakové láhve

- methanol p.a.
    - výrobce: LACHEMA, a.s.
    - CAS: 67-56-1
- ethanol konzumní (96 %)
    - CAS: 64-17-5
- destilovaná voda

<u>plyny použité při analýzách</u>:

- vodík
    - čistota: 5.0
    - přiváděn do FIDu pro udržování vzducho-vodíkového plamene
    - CAS: 1333-74-0
- dusík
    - dusík ECD T50
    - použit jako nosný plyn
    - CAS: 7727-37-9
- vzduch
    - syntetický vzduch bez uhlovodíků
    - obsah O_2=20 %, zbytek N_2
    - láhev značky Linde, plnící tlak=200 bar
    - přiváděn do FIDu pro udržování vzducho-vodíkového plamene
    - CAS (dusík): 7727-37-9
    - CAS (kyslík): 7782-44-7
- výrobce plynů
    - Linde Gas a.s.

2.3. Pracovní postupy

V průběhu měření bylo postupně vytvořeno celkem 6 skupin standardních roztoků ethanolu v destilátech a 3 sady standardních roztoků methanolu. Tento velký počet skupin standardních roztoků byl vytvořen v důsledku nesrovnalostí při vytváření kalibračních křivek, které nastávaly při analýzách na koloně Restek RXI-35 SilMS. Poslední sady (č. 6 v příloze 1 a č. 3 v příloze 2) byly konečné sady standardních roztoků určené k analýze na polární koloně Zebron ZB-WAXPlus.

K přípravě všech standardních roztoků bylo použito vialek o objemu 1,5 ml. Celkový objem připravovaných roztoků byl 1 ml.

Ke standardnímu roztoku ethanolu (u sady 1;2;3;5, **příloha 1**) byl mikrostříkačkou Hamilton přidáván methanol v celkovém množství 20 µl. Tento postup byl zvolen pro případnou optimalizaci rozlišení píku methanolu a ethanolu. Z důvodu simulace matričního prostředí destilátů byly standardní roztoky methanolu (koncentrace a počet standardních roztoků v **příloze 2**) tvořeny přidáním určitého množství methanolu do 1 ml 50 % roztoku ethanolu v destilované vodě.

Při přípravě roztoků bylo využito vialek a automatické pipety o pracovním objemu 100 – 1000 µl. Po smíchání každého standardu byla vialka uzavřena a obsah důkladně zhomogenizován protřepáním vialky.

2.3.1. Nástřik vzorku

Dávkování vzorku do injektoru má svá pravidla, ke kterým bylo přihlédnuto při nastřikování standardních roztoků a roztoků analyzovaných vzorků destilátů. K nástřiku vzorku bylo použito mikrostříkačky Hamilton o celkovém objemu 10 µl.

Vždy bylo odebráno množství 1µl roztoku, přičemž byly vhodnými manipulacemi (opakované vytahování a zasouvání pístu mikrostříkačky) vypuzeny případné vzduchové bubliny, které by zkreslovaly objem odebraného vzorku.

2.3.2. Úprava injekční stříkačky

Před použitím mikrostříkačky Hamilton byl zaoblen její hrot smirkovým papírem, aby septum v injektoru nebylo prořezáváno příliš ostrým hrotem jehly. Je vhodné, aby byla jehla mikrostříkačky vpravena do hloubky injektoru zhruba 45 mm, což odpovídá ¾ délky jehly mikrostříkačky Hamilton. Hloubka vpichu by měla být v celé sérii měření stejná. V opačném případě dochází k nekvantitativnímu nástřiku a k získání nepřesných dat. Pomalu provedený nástřik pak může vést i k deformaci píků.

Jelikož nelze při každém nástřiku odhadnout ideální hloubku vpichu, byla mikrostříkačka upravena (obr. 5). Na jehlu mikrostříkačky byla navlečena izolační bužírka sloužící pro vymezení hloubky vpichu. Před izolační bužírku bylo vpichem nasunuto použité septum, aby při nástřiku nedocházelo k termodegradaci izolační bužírky.

Obr. 5 **Upravená mikrostříkačka Hamilton (10µl)**

2.3.3. Určení mrtvého času kolony Zebron ZB-WAXPlus

Pro zjištění mrtvého času kolony byla použita injekční stříkačka Hamilton o objemu 10 µl. K nástřiku byl odebrán zemní plyn používaný v laboratoři. Odběr byl proveden propíchnutím gumové hadice nasazené na vývodu zemního plynu. Hadicí dlouhou zhruba 35 cm byl pouštěn zemní plyn, poté byl konec hadice uzavřen svorkou a vzorek byl následně nasát injekční mikrostříkačkou. Objem nasátého plynu byl 10 µl.

Nástřik zemního plynu byl proveden dvakrát a v obou případech byla získána stejná hodnota mrtvého času: $\mathbf{t_M = 1{,}680\ min}$.

2.3.4. Pracovní postup měření na koloně Restek RXI-35 Sil MS

Nejprve byl vytvořen 50% roztok ethanolu (0,5 ml Et-OH + 0,5 ml dest. H_2O). K tomuto roztoku bylo přidáno 10 µl methanolu a roztok byl nastříknut do injektoru v množství 1µl. Teplota injektoru byla nastavena na 200°C a teplota detektoru na 240°C. Průtok nosného plynu byl nastaven na 0,5 ml/min.

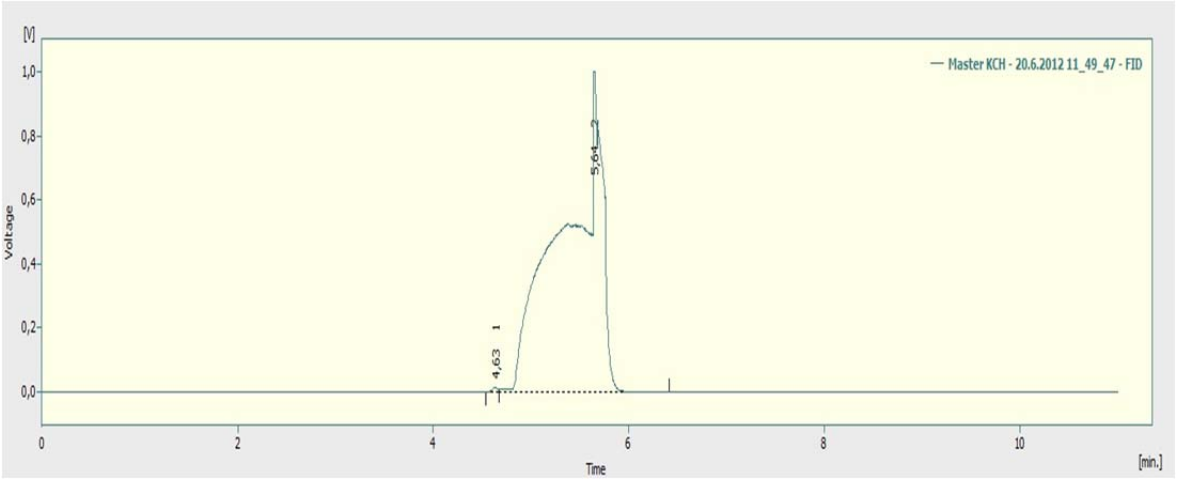
Teplotní program této první analýzy je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6 **Teplotní program č. 1** analýza 50% roztoku ethanolu s přídavkem 10µl methanolu

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	50	2	10
2	100	0	50
3	230	1,40	0

Výsledné píky methanolu a ethanolu se překrývaly. Teplota 1. stupně v teplotním programu byla snížena o 10°C, čas trvání 1. stupně prodloužen o 2 minuty a teplota 2. stupně byla snížena o 40°C, průtok nosného plynu byl 0,5 ml/min (viz **příloha 3**).

Byla provedena analýza roztoku dle teplotního programu č. 2. Výsledkem této analýzy byly dva oddělené píky, avšak pík ethanolu byl deformovaný, jak je patrné z obr. 6.



Obr. 6 **Chromatogram analýzy roztoku ethanolu a methanolu dle teplotního programu č. 2**

Pro vhodnější oddělení píků byla v teplotním programu prodloužen čas 1. stupně o 2 minuty (viz **příloha 4**). Píky se oddělily (viz **příloha 5**).

V další fázi měření byl teplotní program totožný s teplotním programem č. 3, ale průtok nosného plynu byl zvýšen na 1 ml/min. První analýzou roztoku methanolu a ethanolu byl získán chromatogram, kde byly 3 spojené píky (viz **příloha 6**), poté byla provedena druhá analýza za stejného nastavení přístroje a byl získán chromatogram se dvěma překrývajícími se píky (viz **příloha 7**).

V rámci další optimalizace nastavení přístroje byl upraven teplotní program prodloužením času 1. stupně o 1 minutu (viz **příloha 8**). Split byl nastaven na hodnotu 1:50 ($\frac{1}{50}$ injektovaného roztoku postupuje injektorem do kolony, zbytek je oddělen a vypuštěn do okolního prostředí).

Výsledkem analýzy dle teplotního programu č. 4 byl chromatogram s částečně překrývajícími se píky methanolu a ethanolu (viz **příloha 9**).

Další úpravou bylo snížení počáteční teploty v teplootním programu o 3°C a snížení času 1. stupně o 2 minuty (viz **příloha 10**). Split byl zvýšen na hodnotu 1:70. Byl získán chromatogram se dvěma oddělenými píky (viz **příloha 11**).

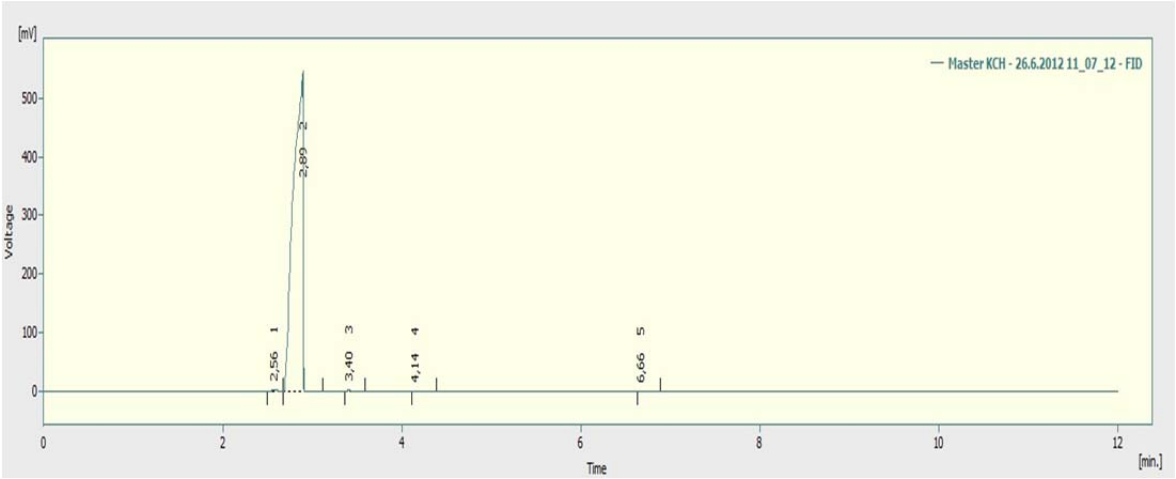
Za cílem snížit celkovou dobu analýzy byl snížen čas 1. stupně o 0,5 minuty (viz **příloha 12**). Split byl nastaven na hodnotu 1:100, aby byla zmenšena výška a šířka píku ethanolu a nehrozilo tak překrytí píku methanolu. Tímto nastavením přístroje byl získán chromatogram (viz **příloha 13**), ve kterém byly odděleny píky methanolu a ethanolu.

Retenční časy těchto analytů byly:

t_R(methanol)= 2,570 min

t_R(ethanol)= 2,793 min.

Pro otestování vytvořené metody (teplotní program č. 6, příloha 13) na reálném vzorku byla provedena analýza vzorku slivovice. Nástřikový objem byl 1 µl a split 1:100. Výsledkem byl chromatogram s 5 píky (viz obr. 7).



Obr. 7 **Chromatogram analýzy vzorku slivovice dle nastavení a teplotního programu č. 6**

K další analýze bylo využito stejného teplotního nastavení jako v předchozím případě, avšak došlo ke změně citlivosti detektoru z 10x na 1x. Po dokončení analýzy vzorku slivovice byl získán chromatogram s 6 píky a s ethanolovým píkem sahajícím mimo rozsah detektoru (viz **příloha 14**).

Následně byla vytvořena nová metoda se stejným teplotním programem a splitem (1:100). Při tvorbě této metody bylo využito funkce „event table“ v programu Clarity. Tato funkce mimo jiné umožňuje změnu citlivosti detekce v průběhu analýzy, tak aby píky přesahující rozsah detektoru (pík ethanolu) byly zmenšeny a byly tak vyhodnotitelné. Zatímco menší píky (např. pík methanolu) jsou zaznamenány při citlivosti detektoru 1x, jak ukazuje tabulka 7.

Tabulka 7 **Změna citlivosti detektoru v průběhu analýzy**

Časový úsek analýzy (minuty)	Citlivost
Do 2,6738	1x
Od 2,6738 do 3,0	10x
Od 3,0	1x

Nastavením změny citlivosti a následnou analýzou vzorku slivovice byl chromatogram (viz **příloha 15**), ve kterém žádný pík nepřesahoval vyhodnotitelný rozsah detektoru.

Součástí úpravy této metody bylo zpřesnění vymezené doby změny citlivosti detektoru uvedené v tabulce 8.

Tabulka 8 **Nastavení a zpřesnění změny citlivosti detektoru v průběhu analýzy**

Časový úsek analýzy (minuty)	Citlivost
Do 2,696	1x
Od 2,696 do 2,920	10x
Od 2,920	1x

Výsledkem časového zpřesnění změny citlivosti detektoru byl chromatogram uvedený v **příloze 16**.

Poté byla vytvořena 1. sada standardních roztoků ethanolu (viz sada č. 1 v příloze 1) a 1. sada standardních roztoků methanolu (viz sada č. 1 v příloze 2). Ke každému standardnímu roztoku ethanolu bylo přidáno 20 µl methanolu a každý standardní roztok methanolu byl vytvářen v prostředí 50% ethanolu, jak již bylo uvedeno výše.

Bylo provedeno měření standardních roztoků (sada č. 1) ethanolu, ale během měření docházelo k odchylkám při tvorbě kalibrační křivky (**příloha 17**) v programu MS Excel 2010. Posléze bylo měření opakováno, ale nedošlo ke změně.

Z tohoto důvodu byly standardní roztoky ethanolu přepracovány sada č. 2 v příloze 1) a postupně nastříknuty na kolonu. Při tvorbě kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci ethanolu však stále docházelo k neuspokojivým

výsledkům (např. standard 4 vykazoval mnohem menší odezvu než standard 3). Každou kalibrační křivkou byla proložena přímka a byla zobrazena rovnice této přímky.

Protože došlo k obavám, že vyšší koncentrace ethanolu by mohly vytvářet zmíněné odchylky v odezvách detektoru, byla vytvořena sada standardních roztoků, ve které se koncentrační rozmezí ethanolu pohybovalo od 30 do 50% (viz sada č. 3 v příloze 1). Byl proveden jeden nástřik od každého standardního roztoku. Výsledkem byla kalibrační křivka (viz **příloha 18**), jejíž body byly značně vychýleny. Hodnota spolehlivosti přímky proložené zjištěnými body byla velmi nízká.

Později byly nastříknuty tytéž standardní roztoky a z odezvy detektoru byla vytvořena znovu kalibrační závislost plochy píku ethanolu na jeho koncentraci. Nejprve byl proveden jeden nástřik od každého standardního roztoku a byla vytvořena kalibrační křivka (viz **příloha 19**). Nebyly získány dostačující data, a tak byly provedeny čtyři nástřiky standardu 5, při kterých bylo zjištěno, že se radikálně liší velikosti píku ethanolu i methanolu při nástřiku téhož standardního roztoku.

V další fázi hledání kalibrační závislosti byla vytvořena sada standardních roztoků ethanolu (sada č. 4 v příloze 1) v koncentračním rozmezí od 35 do 45%. K těmto roztokům nebyl přidáván methanol z důvodu možného ovlivňování odezvy detektoru na množství ethanolu. Byl proveden postupný nástřik 3 standardních roztoků, ale výsledek odezvy byl velice nepřesný (viz tabulka 9).

Tabulka 9 **Výsledek měření sady č. 4 standardních roztoků ethanolu**

Koncentrace ethanolu φ (%)	Plocha píku (mV.s)
35	1338,962
40	5049,272
45	1447,740

V úvahu byla vzata velikost splitu (1:70), jelikož po rozdělení vstříknutého objemu standardního roztoku se množství tohoto roztoku mohlo pohybovat kolem meze detekce. Hodnota splitu byla tedy snížena na 1:50 a byla vytvořena nová sada standardních roztoků ethanolu (sada č. 5 v příloze 1). Tyto roztoky byly proměřeny a byla vytvořena kalibrační křivka (viz **příloha 20**). Hodnota spolehlivosti této křivky byla lepší než v předchozích

případech, ale kalibrační křivka vytvořená v závislosti na výšce ethanolových píků a koncentrace ethanolu (viz **příloha 21**), byla opět značně nereprodukovatelná.

2.3.5. Pracovní postup měření na koloně Zebron ZB-WAXPlus

Kolona Zebron ZB-WAXPlus byla zakoupena v průběhu měření k analýze destilátů pro stanovení methanolu. Tato kolona se vyznačuje vysokou polaritou a je vhodná pro separaci polárních sloučenin jako jsou např. alkoholy.

Nejdříve byla vytvořena sada standardních roztoků methanolu (sada č. 3 v příloze 2). Roztoky byly vytvořeny v prostředí 50% ethanolu a celkový objem každého roztoku činil 1 ml.

Teplotní program pro měření těchto roztoků byl převzat z katalogu firmy Phenomenex[11] (tabulka 10). Byl určen pro tuto kolonu a pro analýzu destilátů.

Tabulka 10 **Teplotní program**

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	35	5	10
2	85	0	25
3	200	1	0

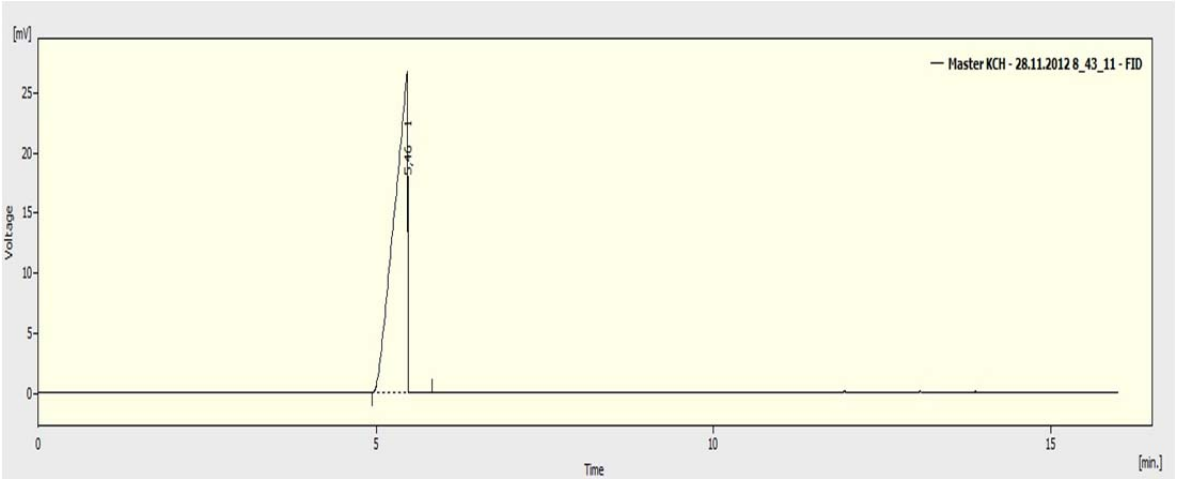
Split byl nastaven na hodnotu 1:50 a celková doba analýzy byla 16 min. Po tomto nastavení přístroje byla proměřena sada standardních roztoků methanolu. Byla vytvořena kalibrační přímka (**příloha 22**) proložením body, které byly získány na základě koncentrace methanolu a plochy jeho píku.

Poté byla kalibrace methanolu zopakována, čímž byla získána kalibrační křivka s lepší hodnotou spolehlivosti (**příloha 23**).

Z výše provedených kalibrací bylo zřejmé, že druhá kalibrační křivka mohla být použita ke stanovení methanolu v destilátech. Z toho důvodu byly údaje o koncentracích a plochách píků zaznamenány do kalibračního souboru v programu Clarity (viz **příloha 24**) a tento soubor byl spojen s vytvořenou metodou.

Měření pokračovalo hledáním kalibrační závislosti mezi plochou píku ethanolu a jeho koncentrací. Byly vytvořeny standardní roztoky ethanolu (sada č. 6 v příloze 1).

Pro nastavení citlivosti byl na zkoušku nastříknut 50% roztok ethanolu, citlivost byla nastavena na 1:100 a výsledkem byl chromatogram uvedený na obr. 8, jehož pík ethanolu měl výšku 26,659 mV. Z toho bylo usouzeno, že citlivost může být zvýšena na 1:10 a výsledkem analýzy 50% ethanolu při této citlivosti detektoru byl chromatogram uvedený v **příloze 25**.



Obr. 8 **Chromatogram 50% roztoku ethanolu získaný při citlivosti detektoru 1:100**

Citlivost detektoru byla ponechána na hodnotě 1:10 i při následném měření standardních roztoků ethanolu. Sada roztoků ethanolu byla proměřena a byla vytvořena kalibrační křivka (**příloha 26**). Následně byly údaje o plochách píků a koncentracích standardů zaznamenány do kalibračního souboru programu Clarity (**příloha 27**) a tento soubor byl propojen s vytvořenou metodou.

Před analýzami jednotlivých vzorků destilátů byla opět využita funkce event table v programu Clarity. Došlo k modifikaci metody pomocí časového nastavení změny citlivosti detektoru v průběhu analýzy (viz tabulka 11).

Tabulka 11 **Nastavení změny citlivosti detektoru v průběhu analýzy destilátů**

Časový úsek analýzy (minuty)	Citlivost
Do 4,90	1x
Od 4,90 do 5,80	10x
Od 5,80	1x

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Určení redukovaného retenčního času a retenčního faktoru ethanolu a methanolu na koloně Zebron ZB-WAXPlus

Jelikož byl již určen mrtvý čas této kolony (viz kapitola 2.3.3), mohly být vypočteny další veličiny charakterizující vlastnosti analytů. Jak již bylo uvedeno výše, redukovaný retenční čas analytu lze vyjádřit jako rozdíl retenčního času analytu a mrtvého času kolony:

$$t_R' = t_R - t_M$$

mrtvý čas kolony má hodnotu: t_M=1,680,

pak pro redukovaný retenční čas methanolu platí:

$$t_R'(\text{methanol}) = 4{,}12 - 1{,}68 = \mathbf{2{,}44\ min}$$

hodnota retenčního času methanolu byla převzata z chromatografu v **příloze 28**, který byl výsledkem analýzy reprezentativního vzorku destilátu.

Dále pro redukovaný retenční čas ethanolu platí:

$$t_R'(\text{ethanol}) = 5{,}50 - 1{,}68 = \mathbf{3{,}82\ min}$$

retenční čas ethanolu byl převzat z chromatografu v **příloze 28**.

Následně byly vypočteny hodnoty retenčních faktorů (k) methanolu a ethanolu dle vztahu:

$$k = t_R' / t_M$$

pro methanol:

$$k(\text{methanol}) = \mathbf{1{,}4524}$$

pro ethanol:

$$k(\text{ethanol}) = \mathbf{2{,}2734}.$$

3.1.1. Výpočet rozlišení píků methanolu a ethanolu na koloně Zebron ZB-WAXPlus a Restek RXI-35 Sil MS

Míra relativní separace na koloně ZB-WAXPlus byla vyjádřena rozlišením (R) píků methanolu a ethanolu:

$$R= t_M.[k(ethanol) - k(methanol)] / 0,5.[w(ethanol) + w(methanol)]$$

kde t_M je mrtvý čas kolony, k retenční faktor analytu a w šířka jeho píku.

Šířky obou píků byly odečteny z chromatogramu uvedeného v **příloze 29:**

w(methanol)=0,604 min

w(ethanol)=0,5265 min.

Dosazením všech hodnot do vzorce dostaneme:

R=**2,44**.

Pro tentýž výpočet pro kolonu Restek RXI-35 Sil MS lze přenést hodnotu mrtvého času získanou na koloně Zebron ZB-WAXPlus (vzhledem k totožným rozměrům kolon): t_M= 1,680 min.

Avšak bylo zapotřebí vypočítat retenční faktory methanolu a ethanolu pro tuto kolonu. Postup výpočtu redukovaného retenčního času analytů je totožný jako v kapitole 3.1. Retenční časy methanolu a ethanolu byly získány z chromatogramu uvedeného v **příloze 30**:

t_R(methanol)=2,57 min

t_R(ethanol)=2,79 min

Z těchto hodnot byly vypočítány redukované retenční časy a následně retenční faktory:

k(methanol)=**0,5298**

k(ethanol)=**0,6607**.

Nakonec bylo vypočítáno rozlišení píků methanolu a ethanolu (R) pro kolonu Restek RXI-35 Sil MS. Hodnoty šířek píků methanolu a ethanolu byly odečteny z chromatogramu v **příloze 30**.

w(methanol)=0,141 min

w(ethanol)=0,185 min

$$R= 1,68[k(ethanol)- k(methanol)] / 0,5[w(methanol) + w(ethanol)]$$

R=**1,35**

Z hodnot rozlišení píků u obou kolon je zřejmá účinnější separace na koloně ZB-WAXPlus. Na koloně RXI-35 Sil MS není oddělení píků úplné, jelikož k ideálnímu rozdělení píků dochází při hodnotě R≥1,5.

3.2. Výsledky stanovení methanolu a ethanolu v destilátech metodou GC-FID

Vzorky destilátů byly poskytnuty výzkumným centrem Nové technologie, které odebíralo vzorky od občanů ČR a poskytovalo bezplatné analýzy destilátů v době hrozícího nebezpečí otravy methanolem. Centrum Nové technologie provádělo stanovení methanolu pomocí fotometrické metody.

Metodou plynové chromatografie dle teplotního programu v tabulce 10 a příslušného nastavení (split 1:50; citlivost viz tabulka 11) bylo analyzováno celkem 13 vzorků destilátů. U 6 vzorků nebyla zjištěna přítomnost methanolu, protože šlo o několik druhů vodky. Analýza každého vzorku byla provedena nejméně třikrát a hodnoty zjištěných koncentrací byly zprůměrovány. Stanovené koncentrace methanolu ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 12. Koncentrace methanolu ve vzorcích, ve kterých nebyla zjištěna přítomnost methanolu, mohla být pod mezí detekce metody GC-FID.

Tabulka 12 **Stanovené koncentrace methanolu ve vzorcích destilátů**

	Číslo analýzy a objemová koncentrace methanolu (‰)				
Vzorek	1	2	3	4	Průměr (‰)
V 54	0				
V 121	0				
V 125	2,545	2,516	2,485		2,515
V 182	7,177	6,932	6,813	7,106	7,007
V 210	0				
V 218	0				
V 219	0				
V 225	0				
V 229	5,398	5,509	5,365	5,379	5,413
V 230	2,732	0,296	4,514	4,541	3,02
V 270	8,295	8,005	8,047	6,189	7,634
V 272	6,475	6,424	6,164	6,321	6,346
V358	28,875	28,567	30,46	29,59	29,37

Ve stejných vzorcích byla dále stanovována koncentrace ethanolu dle kalibrační závislosti vytvořené v podokně programu Clarity (viz **příloha 30**). Byly získány údaje o koncentraci ethanolu v jednotlivých vzorcích a zaznamenány do tabulky (viz tabulka 13).

Tabulka 13 **Stanovené koncentrace ethanolu ve vzorcích destilátů**

	Číslo analýzy a objemová koncentrace ethanolu (%)				Průměr (%)
Vzorek	1	2	3	4	
V 54	34,6442				34,6442
V 125	50,49	48,4003	48,304	53,234	50,107
V 182	51,56	50,865	50,2688	51,6541	51,087
V 229	53,3142	54,9333	53,342	53,0749	53,666
V 230	57,72	51,33	51,63		
V 270	51,0632	49,3877	50,0213	48,8751	49,837
V 272	54,48	55,3499	52,2094	53,9379	53,994
V 358	29,41	28,34			28,875

Dle vyhlášky MZ ČR 305/2004 Sb. je maximální přípustná koncentrace methanolu 12 g na 1 l 100% ethanolu. Výsledné koncentrace methanolu ve vzorcích dle uvedené vyhlášky jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14 **Koncentrace methanolu ve vzorcích destilátů** vyjádřeny dle vyhlášky MZ ČR 305/2004 Sb.

Vzorek č.	Koncentrace methanolu v g/l 100% ethanolu
125	3,97
182	10,85
229	7,98
230	4,46
270	12,12
272	9,3
358	80,46

Koncentrace methanolu v g/l 100% ethanolu byla zjištěna následující úvahou (provedeno např. pro vzorek 358):
Analýzou byl zjištěn obsah methanolu v obj. ‰.....φ(methanol) = 29,37 ‰, to znamená, že v 1 litru tohoto destilátu je obsaženo 29,37 ml methanolu. Byl také stanoven obsah ethanolu v tomto destilátu…..φ(ethanol) = 28,875 %.

Objem methanolu byl přepočten na gramy: m(methanol) = ρ . V = 0,7910 . 29,37, kde ρ je hustota methanolu v g/cm^3.

Dále bylo zjištěno kolik litrů 28,875% ethanolu by bylo zapotřebí, aby toto množství obsahovalo 1 l 100% ethanolu:

1 l…..……100%

x l……28,875%

x = 100/28,875 . 1 = <u>3,4632 l.</u>

Nakonec bylo vypočteno, kolik gramů methanolu je obsaženo v 1 l 100% ethanolu, jestliže v 3,4632 l 28,875% ethanolu je 23,2317 g methanolu:

3,4632 l…….23,2317 g

1 l…….x g

x = 3,4632 . 23,2317/1 = <u>80,456 g</u>

Jak je zřejmé z výše uvedeného, vzorek č. 358 obsahoval nadlimitní koncentraci methanolu a ve vzorku č. 270 byla zjištěna hraniční koncentrace methanolu.

3.3. Srovnání výsledků získaných fotometrickou metodou a metodou GC-FID

Fotometrická metoda byla použita pro stanovení methanolu v destilátech centrem Nové technologie. Tato metoda je založena na oxidaci methanolu na formaldehyd manganistanem draselným v kyselém prostředí. Formaldehyd následně reaguje s dvěma molekulami kyseliny chromotropové (reakční mechanismus viz **příloha 31**). Tento vysoce konjugovaný komplex je růžovo-fialově zabarven a je změřena jeho absorbance spektrofotometrem při vlnové délce 575 nm.[11]

Pro srovnání koncentrací methanolu získaných dvěma odlišnými metodami byly poskytnuty výsledky analýz 5 vzorků centrem Nové technologie. Koncentrace methanolu zjištěny fotometricky a metodou GC-FID v těchto vzorcích jsou shrnuty v tabulce 15.

Tabulka 15 **Srovnání obsahu methanolu zjištěného ve vzorcích fotometricky a metodou GC-FID**

Vzorek č.	Koncentrace methanolu zjištěna metodou GC-FID (g/l)	Koncentrace methanolu zjištěna fotometricky (g/l)
125	1,99	1,38
182	5,54	6,26
229	4,28	2,72
230	2,39	2,08
358	23,23	21,7

4 ZÁVĚR

Výsledkem mé práce je metoda „Stanovení methanolu a ethanolu v destilátech“. Tato metoda byla vytvářena a optimalizována na přístroji DANI Master GC Fast Gas Chromatograph.

V první části měření byla používána středně polární kolona firmy Restek, na které docházelo k problémům během vytváření kalibračních křivek. Následně byla zakoupena silně polární kolona firmy Zebron vhodnější pro separaci polárních látek. V rámci vytváření této metody bylo sestrojeno několik kalibračních křivek.

Byly popsány postupy nástřiku, nastavování přístroje a detekce analytů, které budou využity spolu s vyvinutou metodou na katedře chemie FPE ZČU v Plzni při výuce v předmětu „Laboratorní cvičení z instrumentální analýzy“.

Finální kalibrační křivky methanolu a ethanolu byly převedeny do kalibračního souboru programu Clarity a tento soubor byl propojen s vytvořenou metodou. Pomocí této metody je nyní možno analyzovat vzorky destilátů a stanovit tak koncentraci methanolu i ethanolu v alkoholických nápojích.

Výsledky stanovení methanolu v destilátech získané fotometrickou metodou jsou v souladu s námi získanými výsledky metodou GC-FID a mezi těmito výsledky nedochází k velkým odchylkám.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Štulík K. a kol.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha 2004.
2. Volka K. a kol.: Analytická chemie II. VŠCHT, Praha 1997.
3. Švec F.: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?. In: *Chem. Listy*. **2009**, 103, s. 266-270.
4. James A. T. a Martin A. J. P.: Gas-liquid partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. In: *National Institute for Medical Research, London.* **1952**, 50, s. 679-690.
5. Ševčík J.: Metodologie měření v analytické chemii. Karolinum, Praha 1999.
6. Apostolopoulou A. A., Flourus A. I., Demertzis P. G., Akrida-Demertzi K.: Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. In: *Food Control*.**2005**, 16, s. 157-164.
7. Wang M.-L., Wang J.-T., Choong Y.-M.: A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. In: *Journal of Food Composition and Analysis*.**2004**, 17, s. 187-196.
8. López-Vázqueze C., Bollaín M. H., Berstsch K., Ignacio Orriols: Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits. In: Food Control.2010, 21, s. 1436-1441.
9. Machalíček M.: Plynová chromatografie organických sloučenin. Bakalářská práce. Brno 2010.
10. Phenomenex: Phenomenex Chromatography Product Guide 12/13. Katalog firmy Phenomenex.2012, s. 89.
11. Vydavatelství Úřadu pro normalizaci a měření: ČSN 56 0210. In: *Metody zkoušení lihovin, stanovení methanolu v brandy a vinném destilátu.* 1985, část 9, s. 1-6.

6 SEZNAM PŘEJATÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 4: Labor-Technik,

http://labor-technik.com.ua/ru/component/djcatalog2/item/24-2011-09-25-17-49-26/48-danimastergc,

staženo 20.12.2012

7 KLÍČOVÁ SLOVA

Fotometrie

Methanol

Plynová chromatografie

8 RESUMÉ

As a result of my work the method „Determination of methanol and ethanol in spirits“ has been developed. This method was created and optimized on instrument DANI Master GC Fast Gas Chromatograph.

A moderately polar column of Restek company was used in the first part of determining. This column was causing difficulties during creating of calibration curves. A strongly polar column of Zebron company, that is suitable for separation of polar substances, has been purchased afterwards. A lot of calibration curves has been constructed within creation of this method.

The procedures of injection, setting the instrument and detection of analytes has been described and will be used together with developed method at the chemistry department of the University of West Bohemia in Pilsen during lessons of „Laboratory exercises of instrumentál analysis“.

The final calibration curves of methanol and ethanol has been tranferred to calibration file of Clarity program and this file has been connected with created method. There is a possibility to analyze samples of spirits by this method and determine so concentration of methanol or ethanol in alcoholic beverages.

Results of determination of methanol obtained by fotometric method corresponds with results that we obtained by GC-FID method and there aren’t deviations between these results obtained by two different methods.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled počtu a koncentračního rozsahu ethanolových standardů.

Příloha 2: Přehled počtu a koncentračního rozsahu mathanolových standardních roztoků.

Příloha 3: Teplotní program č. 2.

Příloha 4: Teplotní program č. 3.

Příloha 5: Chromatogram analýzy dle teplotního programu č. 3.

Příloha 6: Chromatogram analýzy 1 dle teplotního programu č. 3 - průtok nosného plynu zvýšen na 1 ml/min.

Příloha 7: Chromatogram analýzy 2 dle teplotního programu č. 3 - průtok nosného plynu zvýšen na 1 ml/min.

Příloha 8: Teplotní program č. 4 (split 1:50).

Příloha 9: Chromatogram získaný na základě teplotního programu č. 4 (split 1:50).

Příloha 10: Teplotní program č. 5 (split 1:70).

Příloha 11: Chromatogram analýzy dle nastavení teplotního programu č. 5.

Příloha 12: Teplotní program č. 6 (split 1:100).

Příloha 13: Chromatogram analýzy dle teplotního programu č. 6 (split 1:100).

Příloha 14: Chromatogram získaný na základě teplotního programu č. 6 (split 1:100) se změněnou citlivostí detektoru z 10x na 1x (analýza vzorku slivovice).

Příloha 15: Chromatogram analýzy vzorku slivovice po časové změně citlivosti detektoru (teplotní program č. 6).

Příloha 16: Chromatogram získaný po zpřesnění časových úseků změny citlivosti detektoru (teplotní program č. 6).

Příloha 17: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 1) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu.

Příloha 18: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 2) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu. První měření.

Příloha 19: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 2) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu. Druhé měření.

Příloha 20: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 5) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu.

Příloha 21: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 5) - závislost výšky píku na koncentraci ethanolu.

Příloha 22: Kalibrační křivka methanolových standardů - závislost plochy píku na koncentraci methanolu. První měření.

Příloha 23: Kalibarční křivka methanolových standardů - závislost plochy píku na koncentraci methanolu. Druhé měření.

Příloha 24: Podokno kalibračního souboru programu Clarity a zaznamenané údaje o methanolových standardech.

Příloha 25: Chromatogram 50% roztoku ethanolu získaný při citlivosti detektoru 1:10.

Příloha 26: Kalibrační křivka standardních roztoků ethanolu (sada č. 6).

Příloha 27: Podokno kalibračního souboru programu Clarity a zaznamenané údaje o ethanolových standardech.

Příloha 28: Chromatogram analýzy vzorku destilátu, ze kterého byly vypočítány redukované retenční časy methanolu a ethanolu a jejich retenční faktory.

Příloha 29: Chromatogram, ze kterého byly odečteny šířky píku methanolu a ethanolu pro výpočet rozlišení na koloně Zebron ZB-WAXPlus.

Příloha 30: Chromatogram, ze kterého byly získány retenční časy methanolu a ethanolu a šířky píků těchto analytů na koloně Restek RXI-35 Sil MS.

Příloha 31: Reakční mechanismus spojení dvou molekul kyseliny chromotropové methylenovou skupinou formaldehydu.

Příloha 1: Přehled počtu a koncentračního rozsahu ethanolových standardů

Standard č.	1	2	3	4	5	6
	Koncentrace ethanolu φ (%)					
Sada č.						
1	30	40	50	60	70	80
2	30	40	50	60	70	80
3	30	35	40	45	50	
4	35	40	45			
5	10	15	20	25	30	
6	30	40	50	60	70	

Příloha 2: Přehled počtu a koncentračního rozsahu mathanolových standardních roztoků

Standard č.	1	2	3	4	5	6
	Koncentrace methanolu φ (%)					
Sada č.						
1	1	2	3	4	5	
2	1	2	3	4	5	
3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	

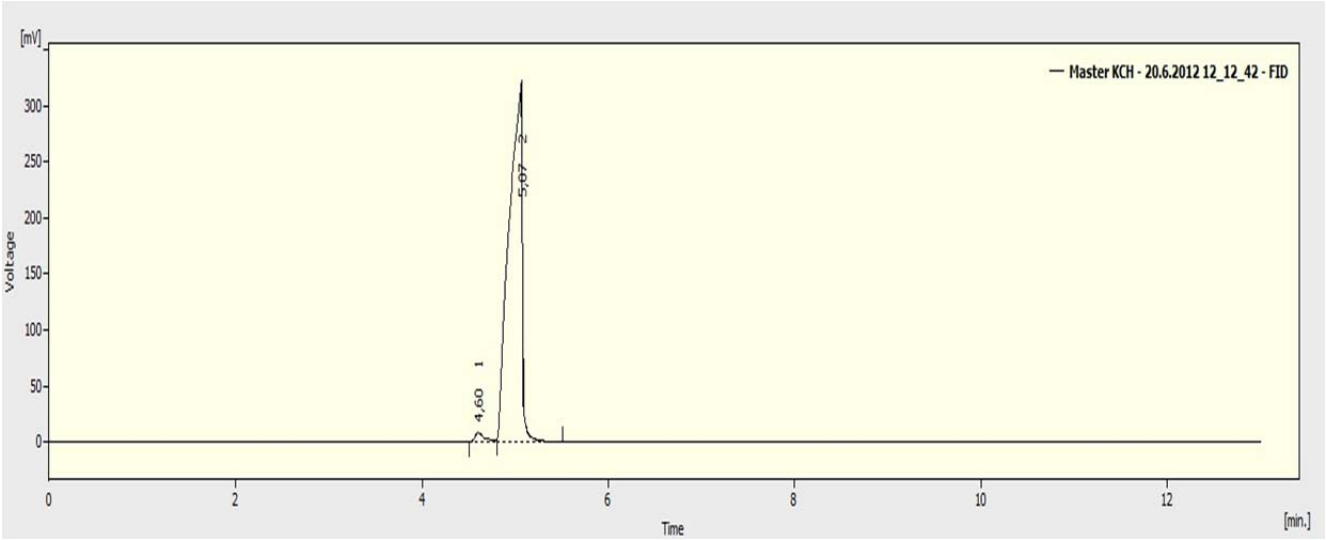
Příloha 3: Teplotní program č. 2

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	40	4	10
2	60	0	50
3	230	1,40	0

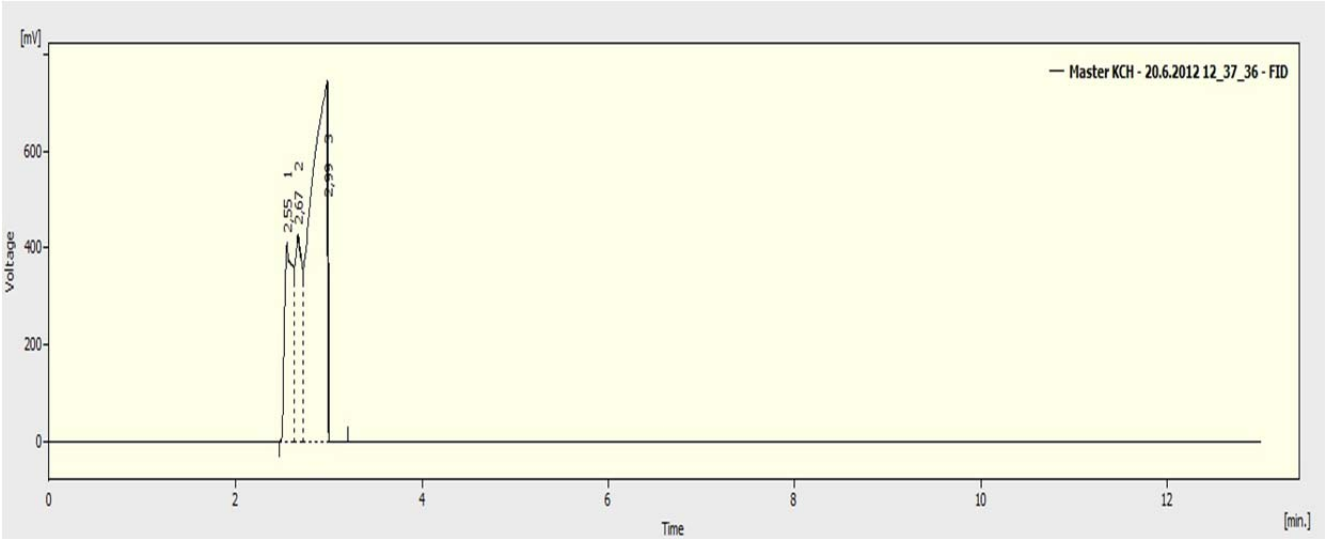
Příloha 4: Teplotní program č. 3

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	40	6	10
2	60	0	50
3	230	1,40	0

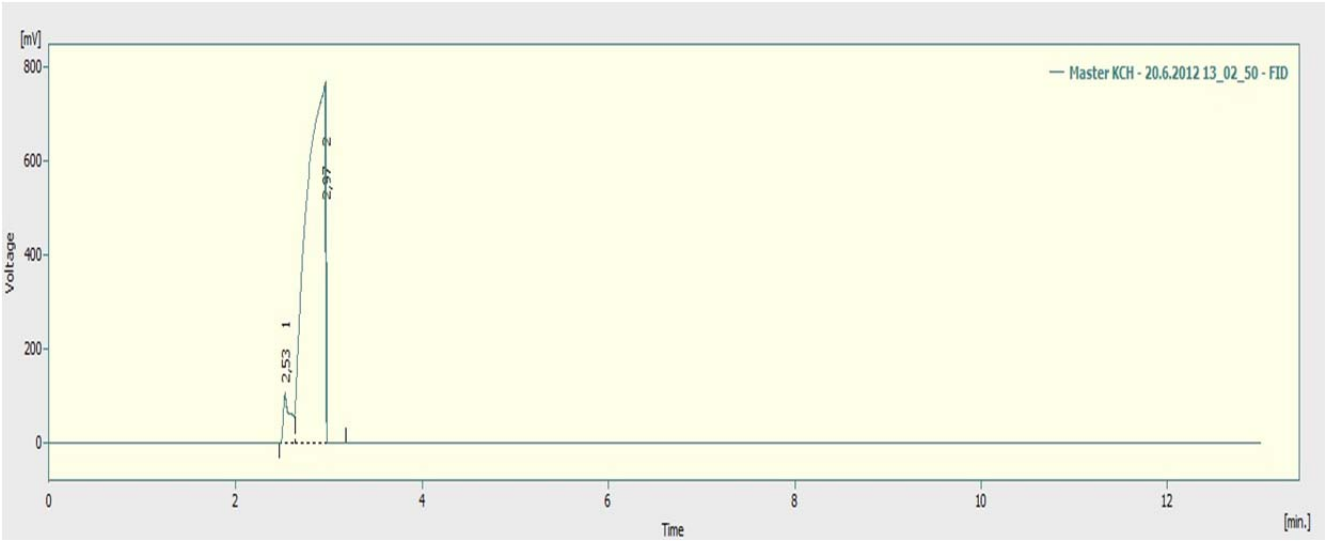
Příloha 5: Chromatogram analýzy dle teplotního programu č. 3



Příloha 6: Chromatogram analýzy 1 dle teplotního programu č. 3 - průtok nosného plynu zvýšen na 1 ml/min



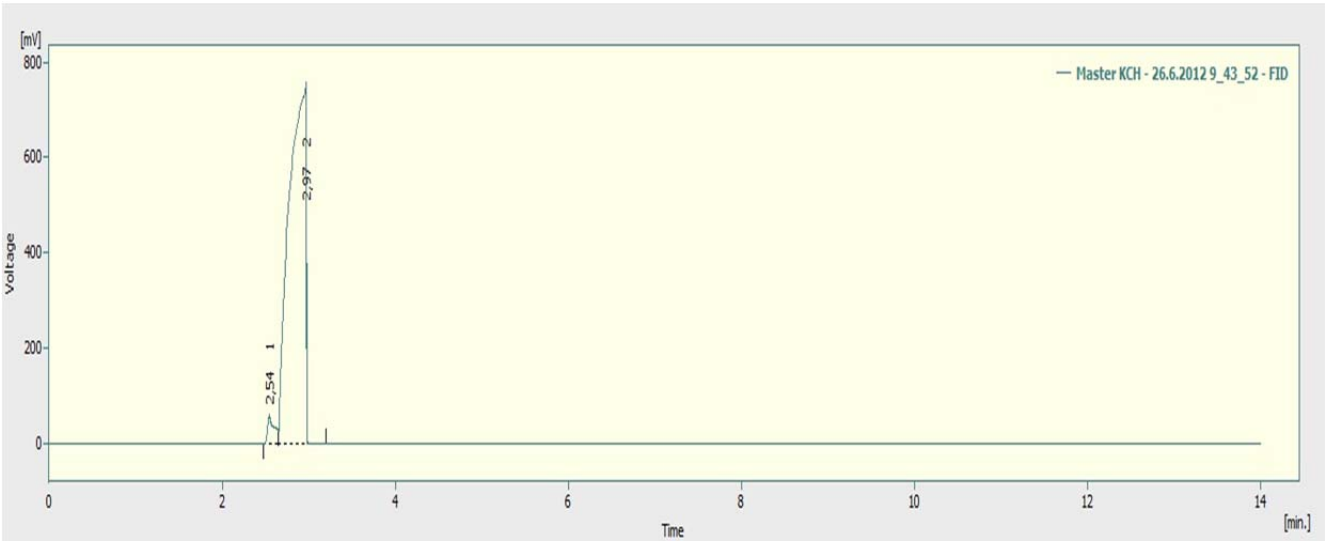
Příloha 7: Chromatogram analýzy 2 dle teplotního programu č. 3 - průtok nosného plynu zvýšen na 1 ml/min



Příloha 8: Teplotní program č. 4

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	40	7	10
2	60	0	50
3	230	1,40	0

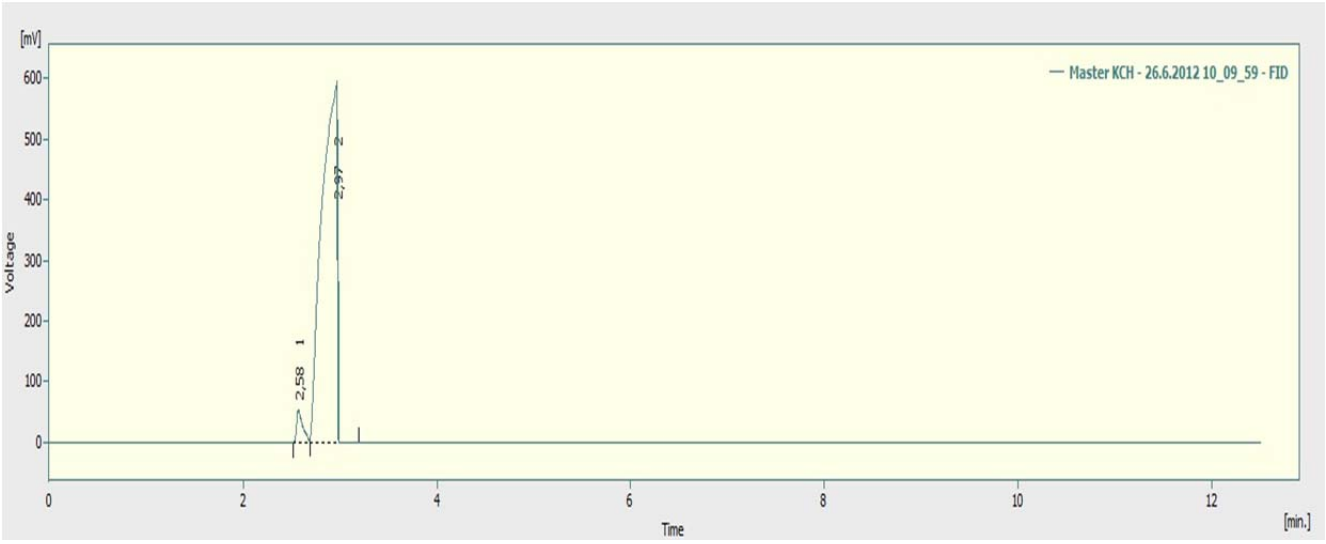
Příloha 9: Chromatogram získaný na základě teplotního programu č. 4 (split 1:50)



Příloha 10: Teplotní program č. 5 (split 1:70)

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	37	5	10
2	60	0	50
3	230	1,40	0

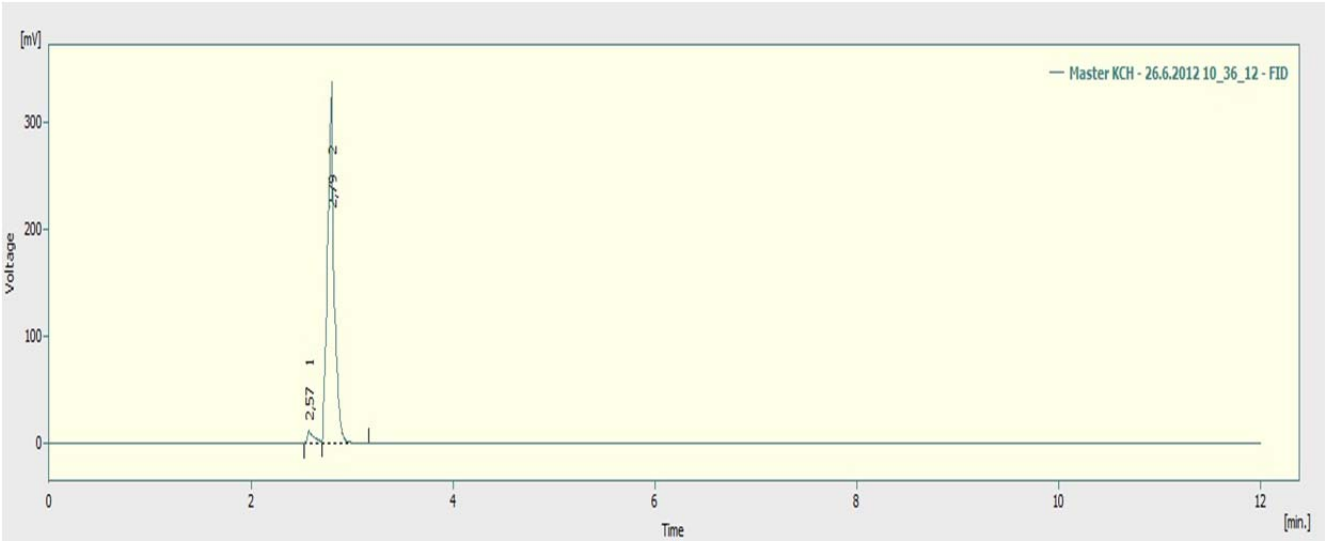
Příloha 11: Chromatogram analýzy dle nastavení teplotního programu č. 5



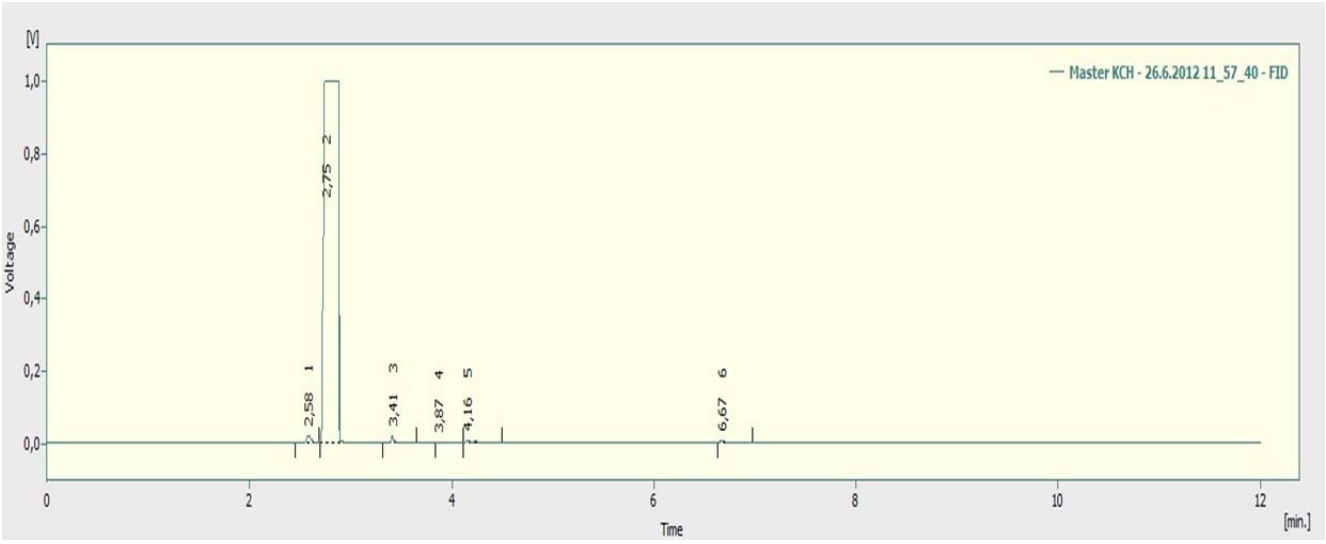
Příloha 12: Teplotní program č. 6 (split 1:100)

Stupeň č.	Teplota (°C)	Čas (min)	Vzestup teploty (°C/min)
1	37	4,50	10
2	60	0	50
3	230	1,40	0

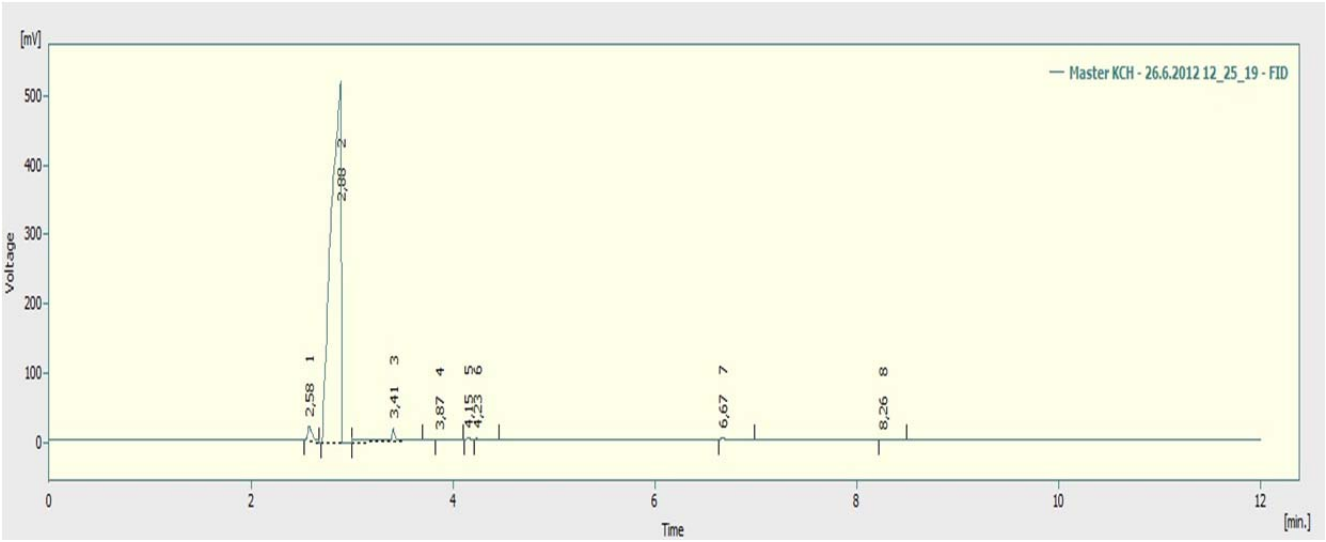
Příloha 13: Chromatogram analýzy dle teplotního programu č. 6 (split 1:100)



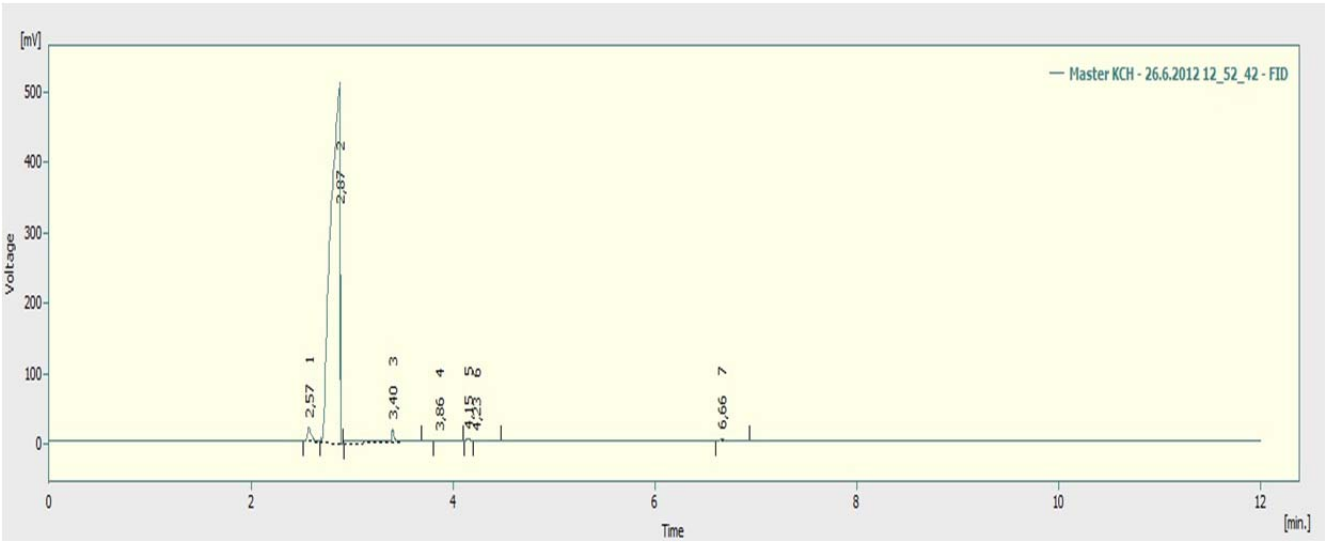
Příloha 14: Chromatogram získaný na základě teplotního programu č. 6 (split 1:100) se změněnou citlivostí detektoru z 10x na 1x (analýza vzorku slivovice)



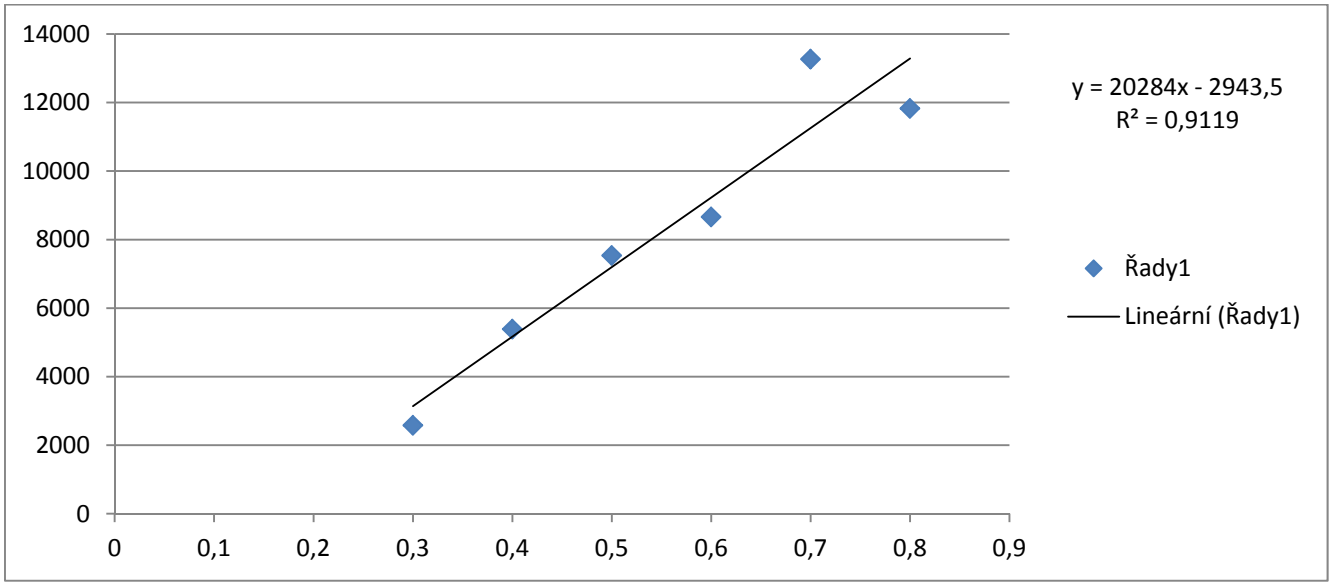
Příloha 15: Chromatogram analýzy vzorku slivovice po časové změně citlivosti detektoru (teplotní program č. 6)



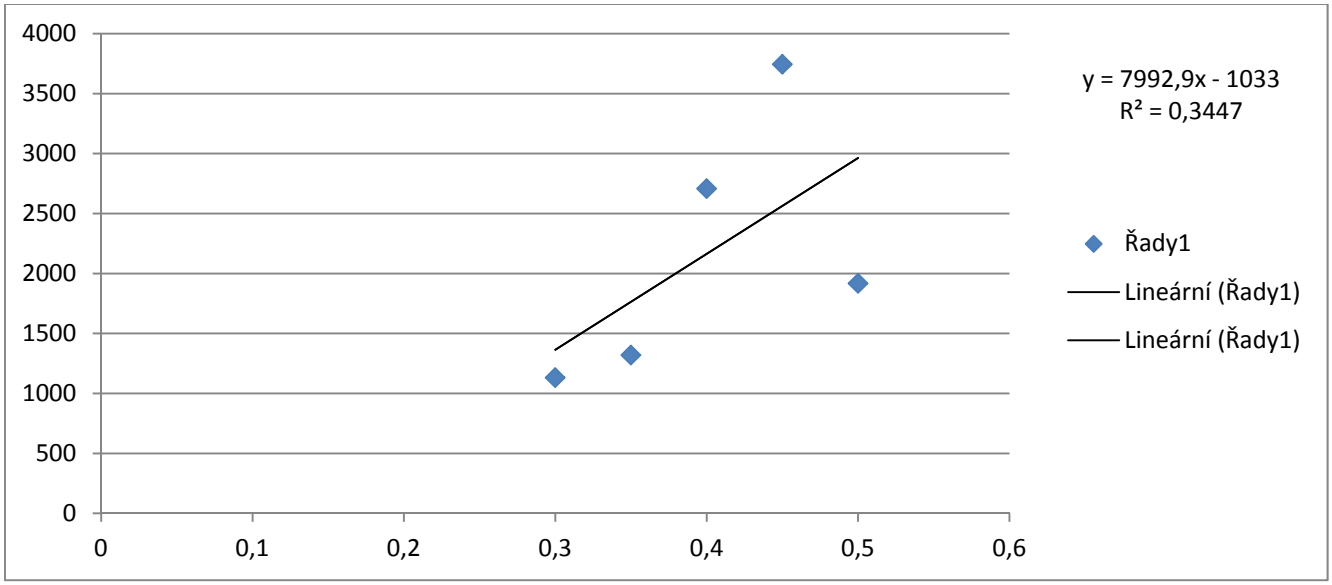
Příloha 16: Chromatogram získaný po zpřesnění časových úseků změny citlivosti detektoru (teplotní program č. 6).



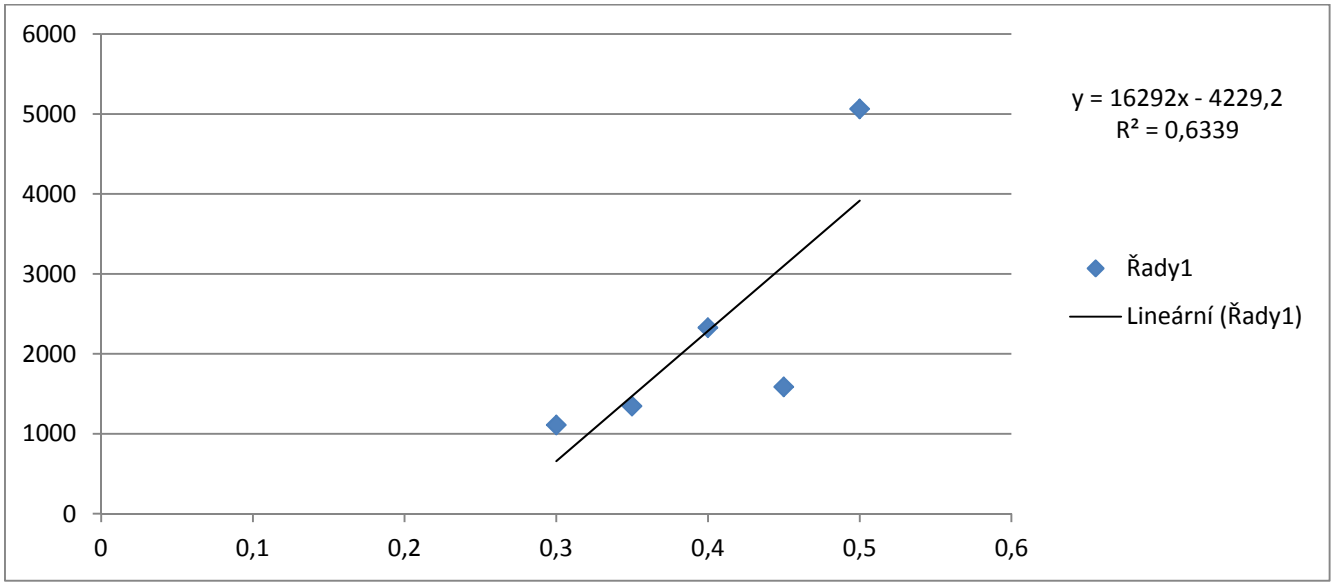
Příloha 17: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 1) - závislost plochy píku (mV.s) na koncentraci ethanolu.



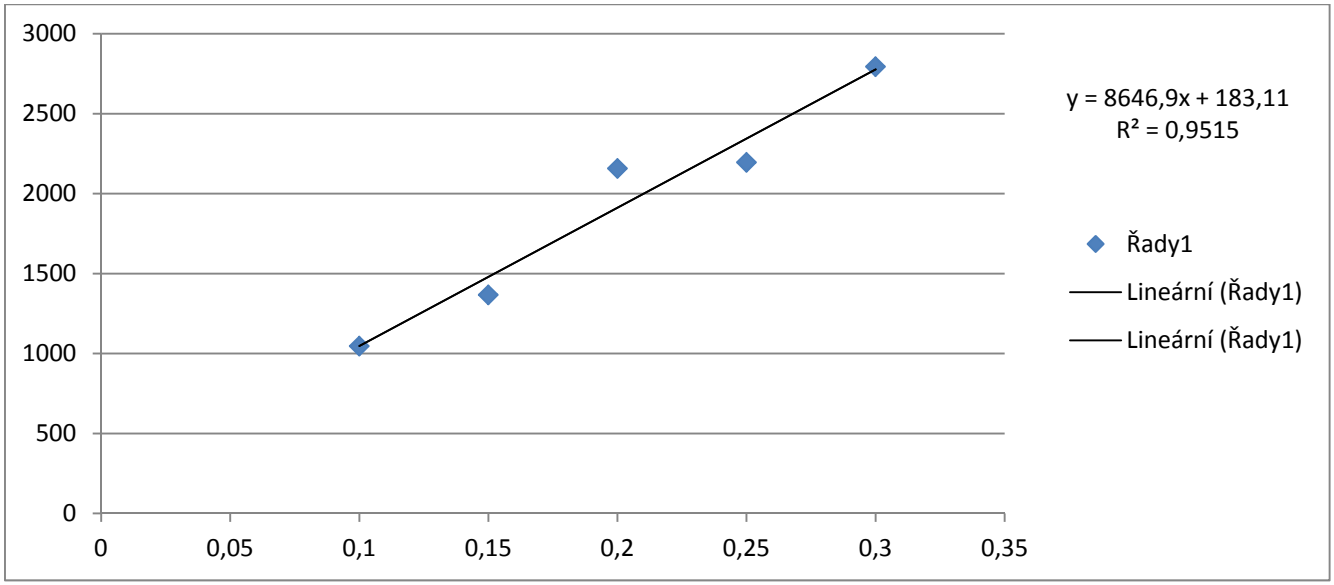
Příloha 18: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 2) - závislost plochy píku (mV.s) na koncentraci ethanolu. První měření.



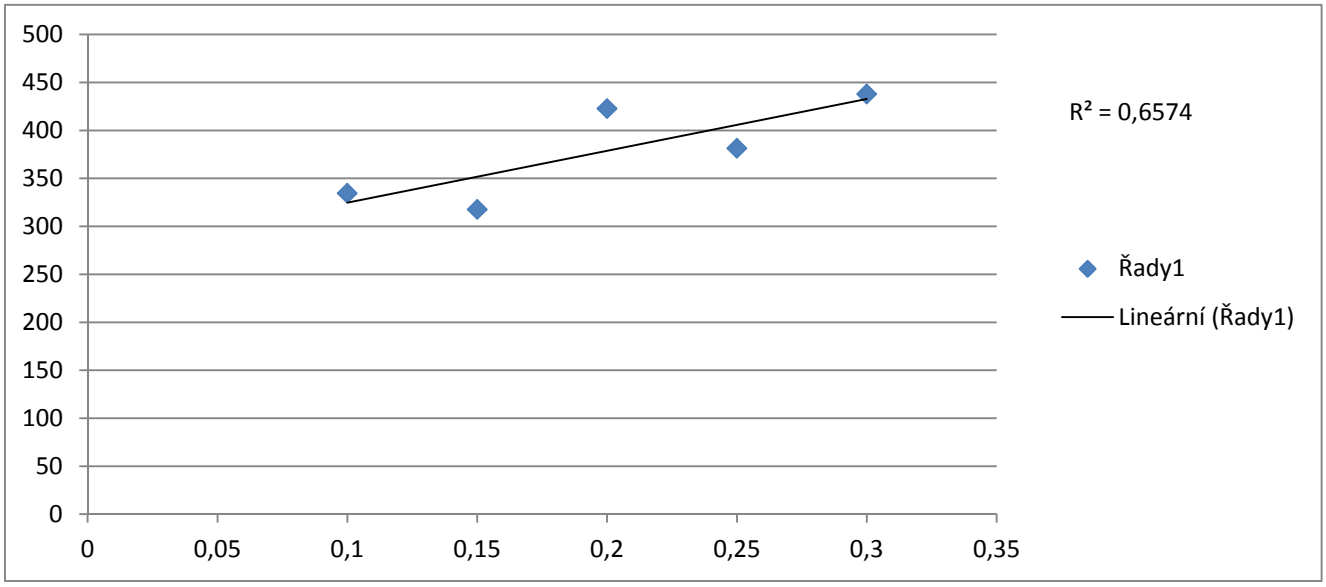
Příloha 19: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 2) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu. Druhé měření.



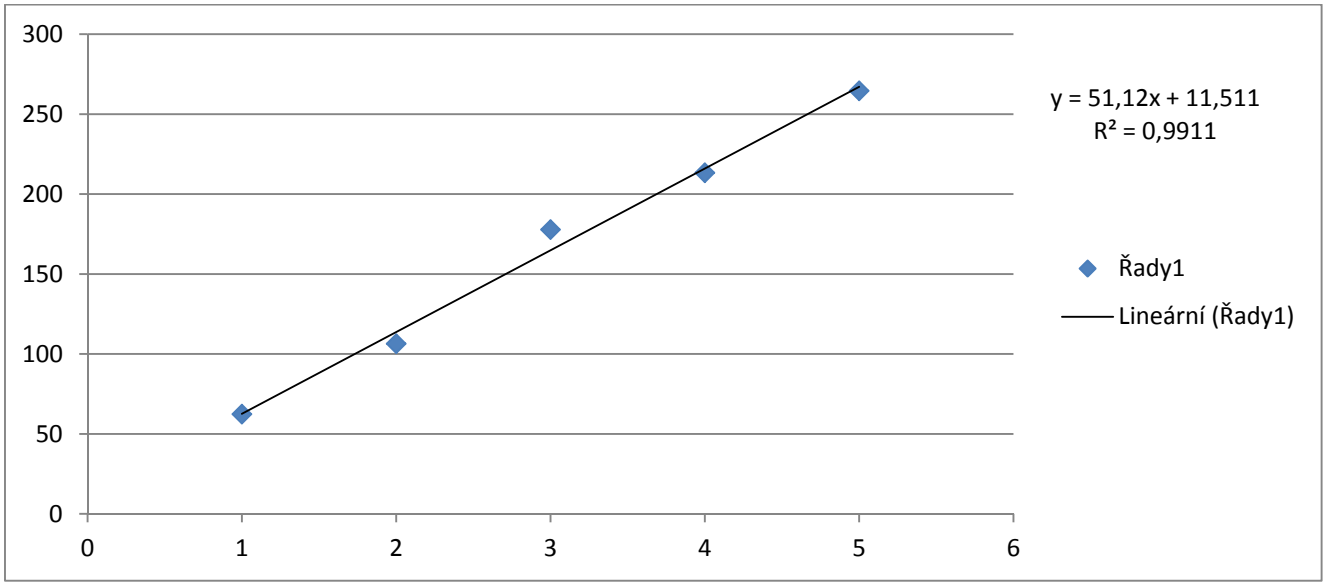
Příloha 20: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 5) - závislost plochy píku na koncentraci ethanolu.



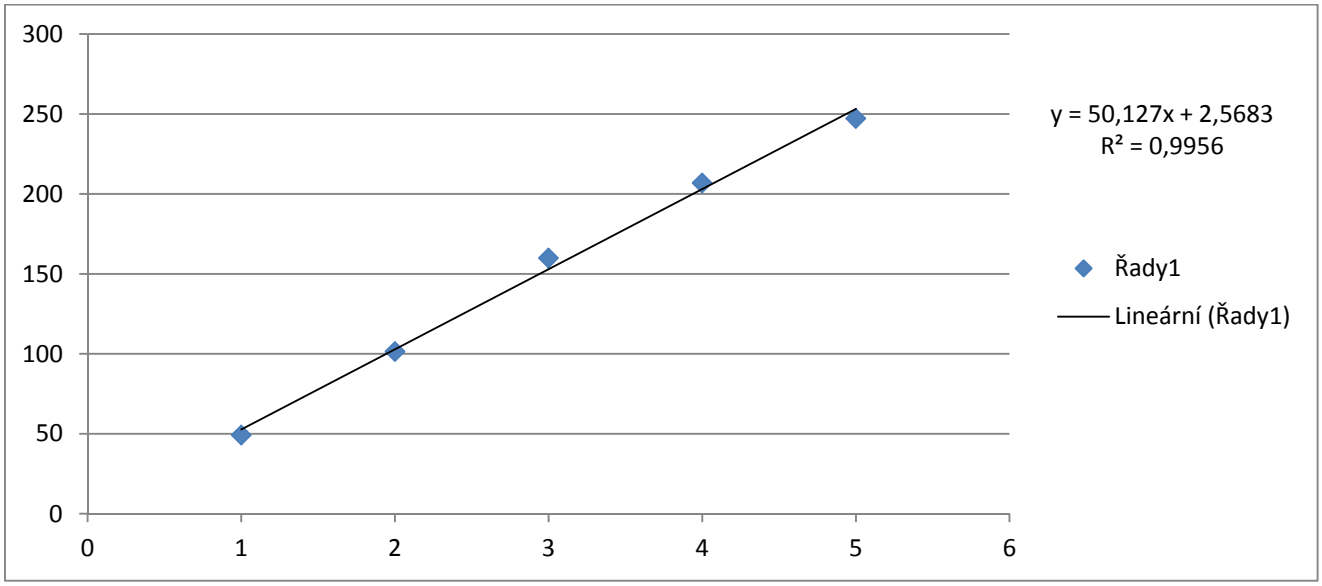
Příloha 21: Kalibrační křivka ethanolových standardů (sada č. 5) - závislost výšky píku na koncentraci ethanolu.



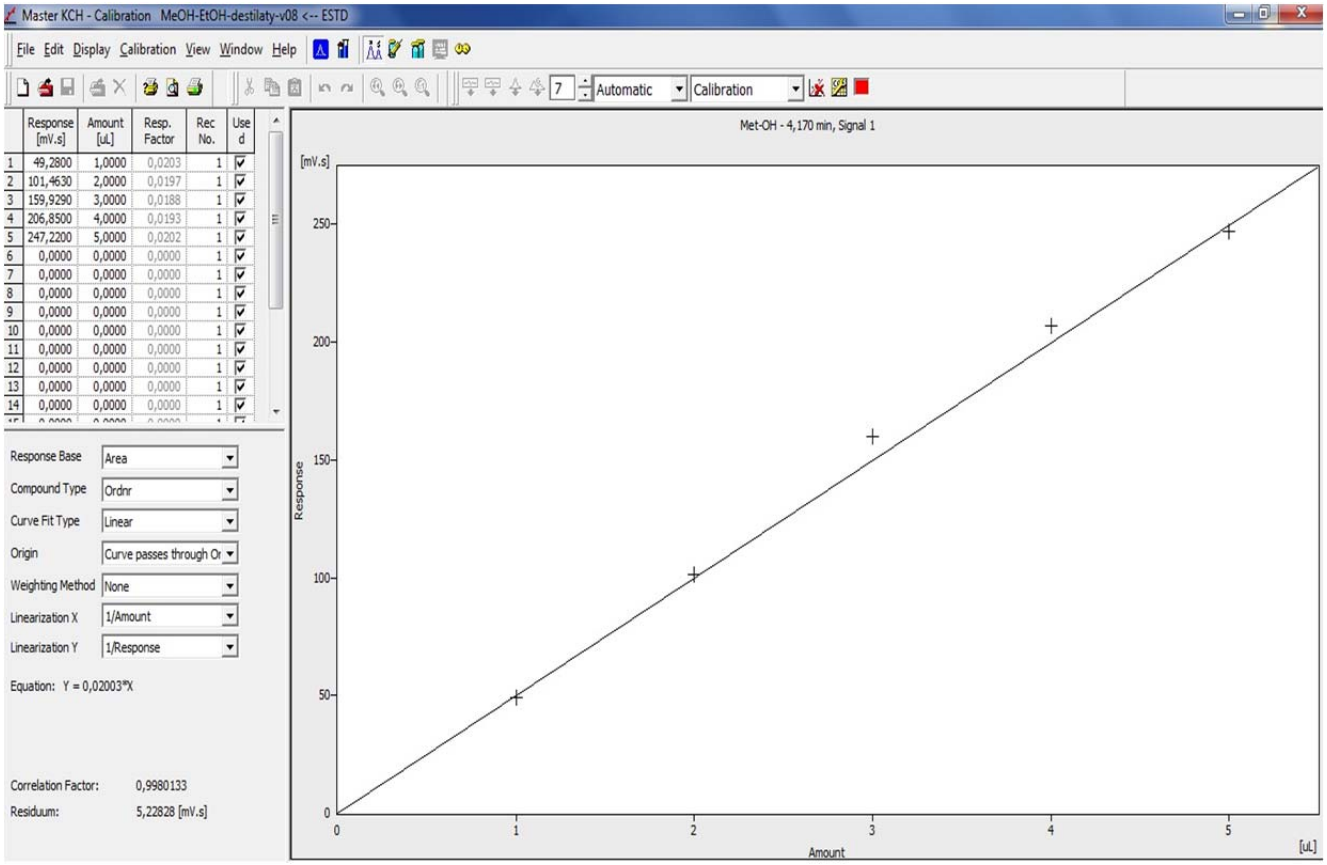
Příloha 22: Kalibrační křivka methanolových standardů - závislost plochy píku na koncentraci methanolu



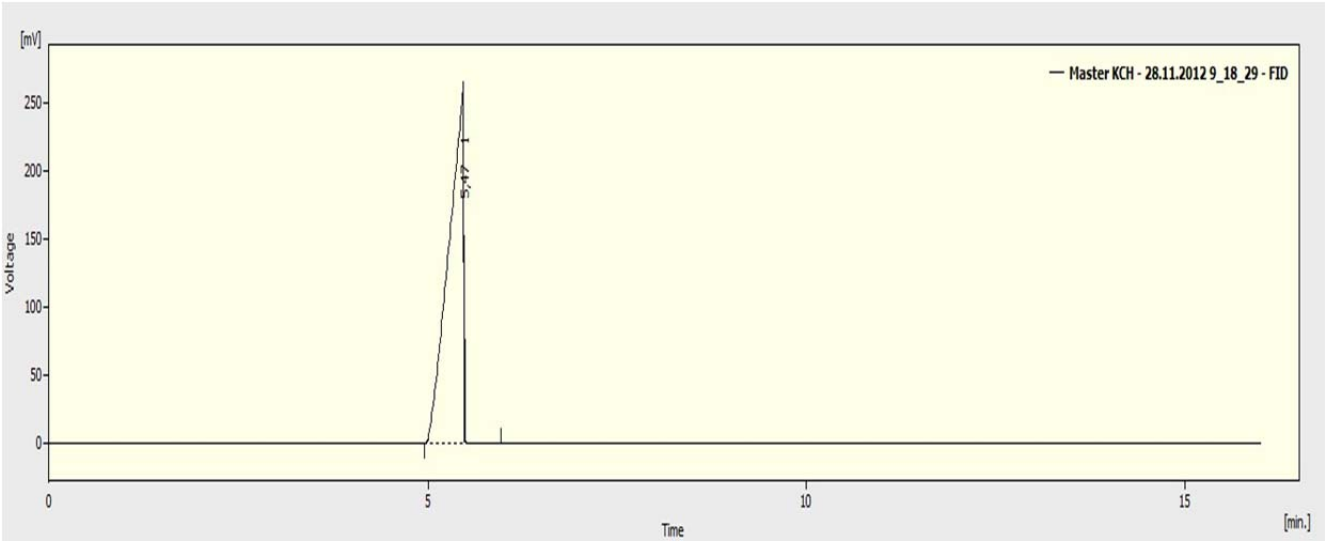
Příloha 23: Kalibarční křivka methanolových standardů - závislost plochy píku na koncentraci methanolu. Druhé měření.



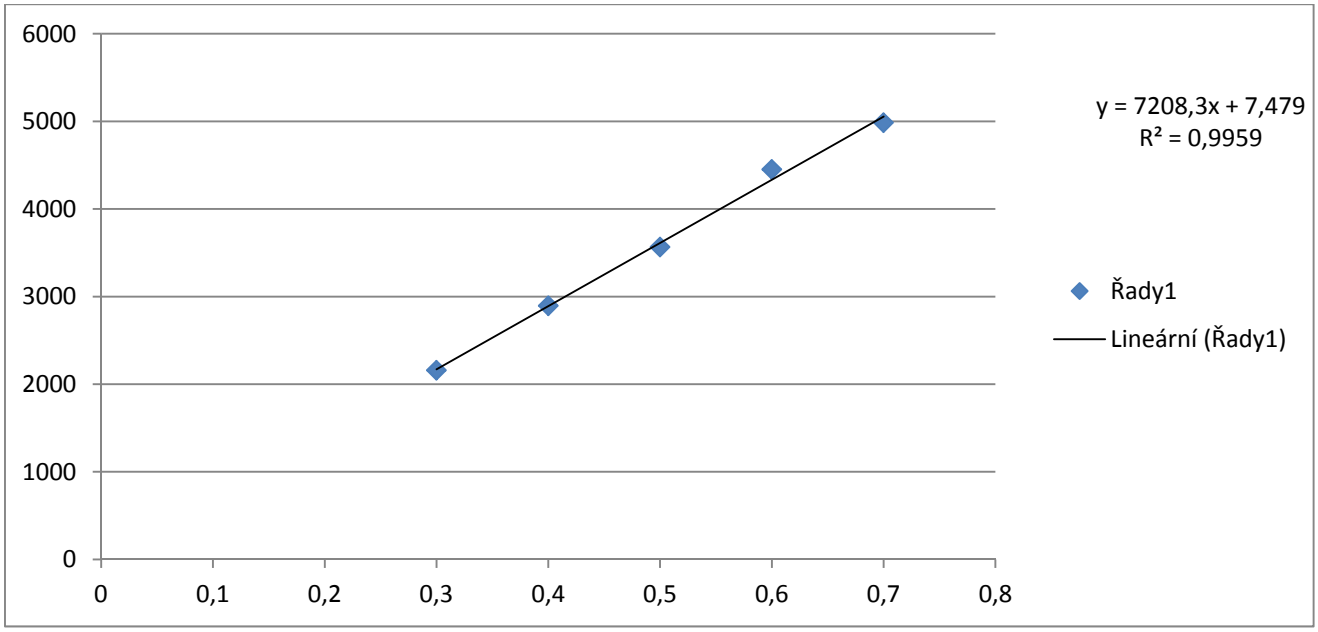
Příloha 24: Podokno kalibračního souboru programu Clarity a zaznamenané údaje o methanolových standardech.



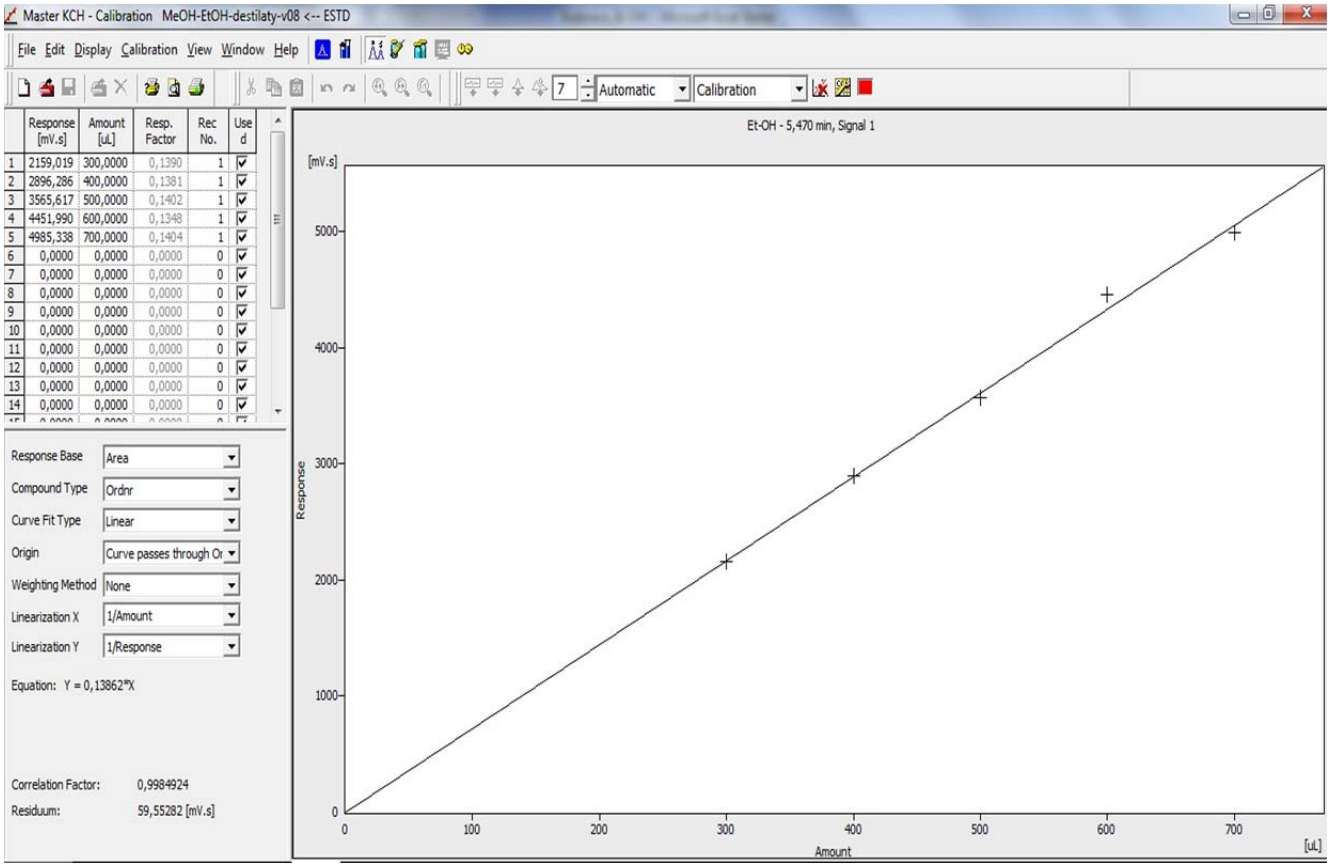
Příloha 25: Chromatogram 50% roztoku ethanolu získaný při citlivosti detektoru 1:10.



Příloha 26: Kalibrační křivka standardních roztoků ethanolu (sada č. 6).

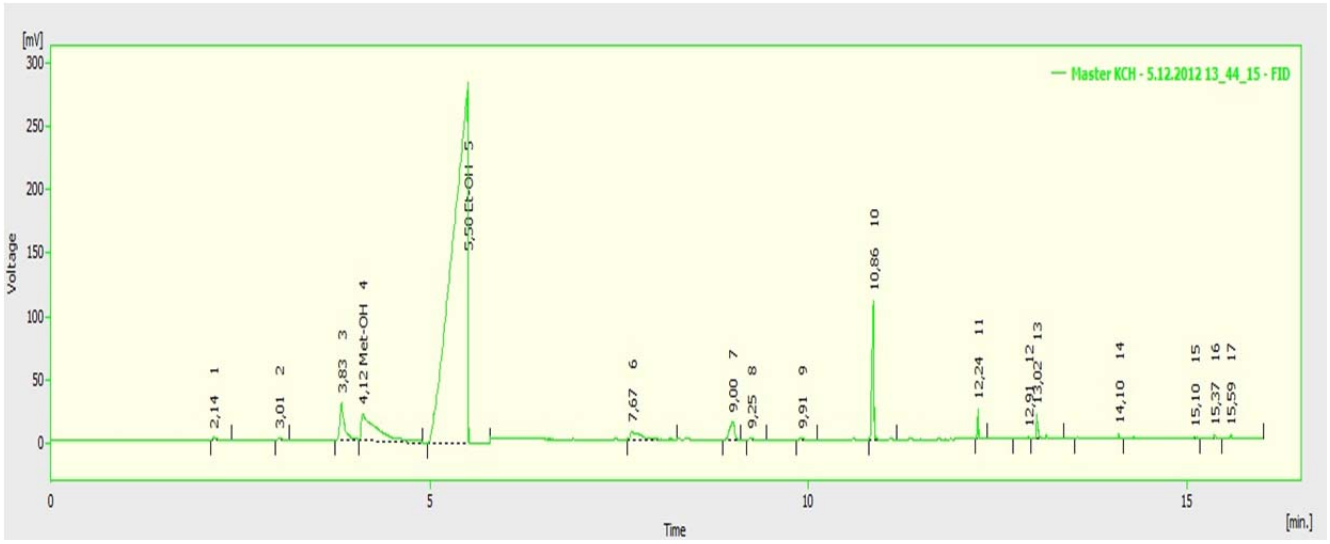


Příloha 27: Podokno kalibračního souboru programu Clarity a zaznamenané údaje o ethanolových standardech.

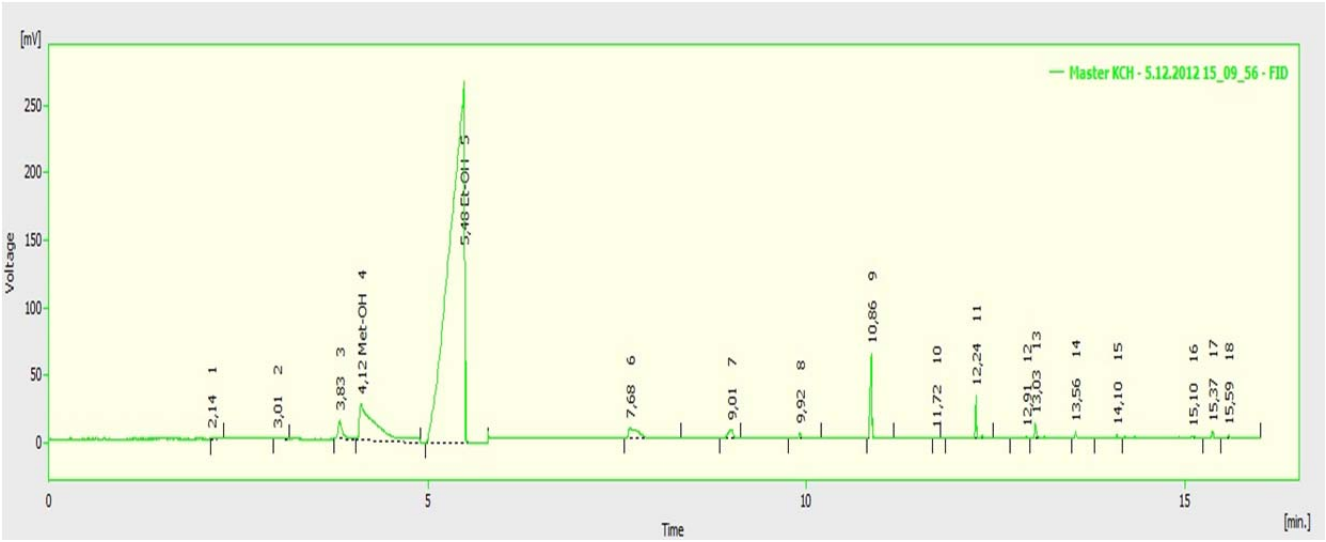


	Response [mV.s]	Amount [uL]	Resp. Factor	Rec No.	Used
1	2159,019	300,0000	0,1390	1	☑
2	2896,286	400,0000	0,1381	1	☑
3	3565,617	500,0000	0,1402	1	☑
4	4451,990	600,0000	0,1348	1	☑
5	4985,338	700,0000	0,1404	1	☑
6	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
7	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
8	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
9	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
10	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
11	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
12	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
13	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑
14	0,0000	0,0000	0,0000	0	☑

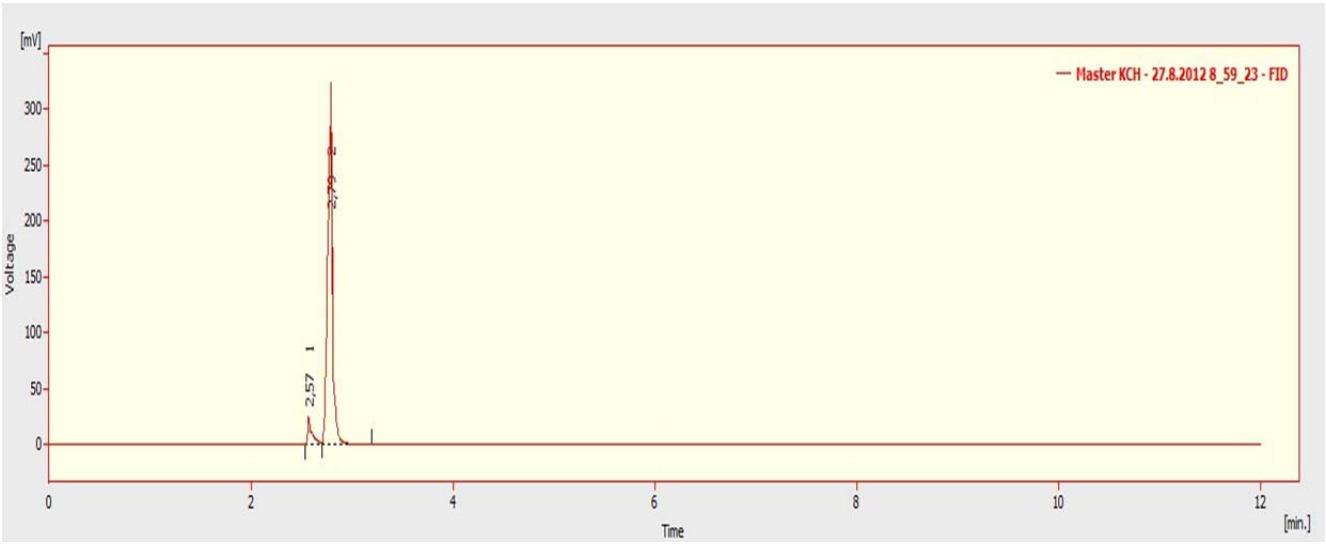
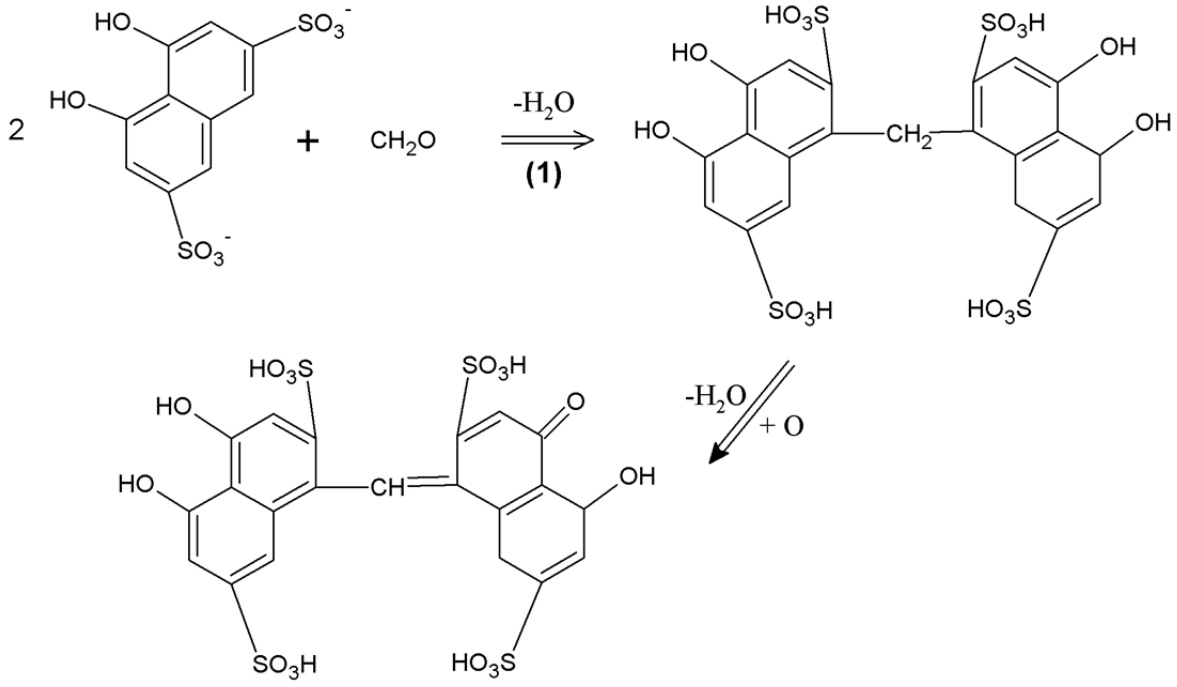
Příloha 28: Chromatogram analýzy vzorku destilátu, ze kterého byly vypočítány redukované retenční časy methanolu a ethanolu a jejich retenční faktory



Příloha 29: Chromatogram, ze kterého byly odečteny šířky píku methanolu a ethanolu pro výpočet rozlišení na koloně Zebron ZB-WAXPlus



Příloha 30: Chromatogram, ze kterého byly získány retenční časy methanolu a ethanolu a šířky píků těchto analytů na koloně Restek RXI-35 Sil MS



Příloha 31: Reakční mechanismus spojení dvou molekul kyseliny chromotropové methylenovou skupinou formaldehydu.