Газовая хроматография

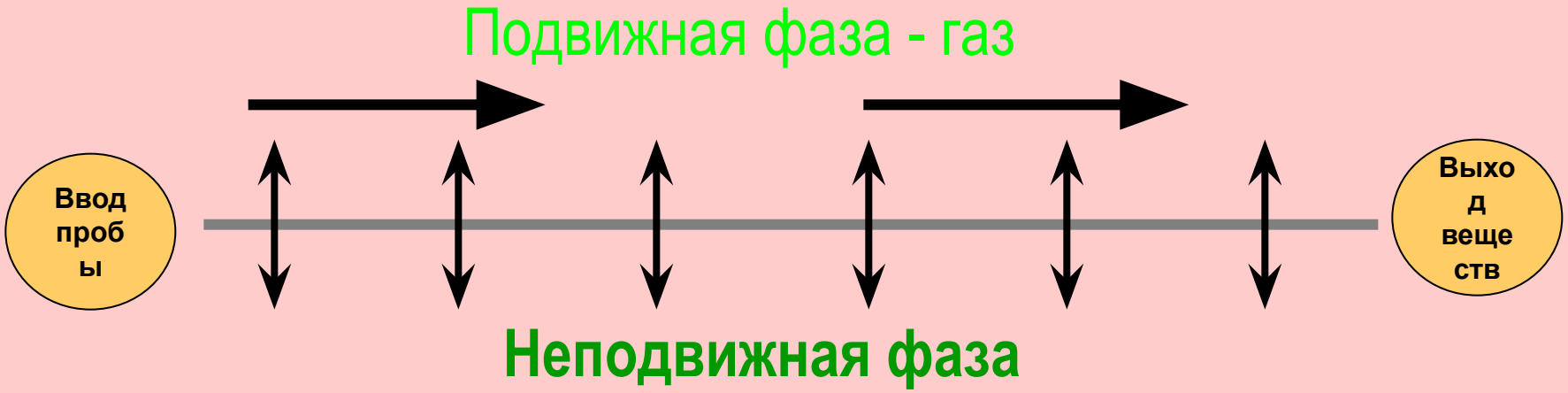
полное наименование:

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

Это хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара, называясь газ-носитель. Неподвижной фазой (НЖФ) является в основном высокомолекулярная жидкость, закрепленная на пористый носитель или на стенки длинной капиллярной трубки.

Газовая хроматография

Предназначена для разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся в пределах 40-350 °С без разложения.



(жидкость, нанесенная (привитая) на твердую подложку)

- По мере движения по хроматографической колонке компоненты разделяемой пробы многократно распределяются между газом-носителем и неподвижной жидкой фазой, нанесенной на инертный материал, которым заполнена колонка.
- Принцип разделения - неодинаковое химическое сродство веществ к неподвижной фазе.

Область применения

- **Летучие,термостабильные соединения либо летучие производные веществ**

- лишь 5% известных органических соединений,

- но 70-80 % соединений, используемых человеком в сфере производства и быта.

Углеводороды, амины, серусодержащие соединения, пестициды, полихлорированные бензолы, эфирные масла, жирные кислоты, сложные эфиры, алкалоиды, лекарственные препараты, галогенсодержащие соединения, стероиды, ароматические соединения.

Достоинства газовой хроматографии

1) возможность идентификации и количественного определения индивидуальных компонентов сложных смесей, например нефтей;

2) высокая четкость и быстрота разделения, обусловленные низкой вязкостью подвижной фазы - газа;

3) микропробы и автоматическая запись результатов, благодаря высокой чувствительности и малой инерционности приборов;

4) возможность анализа широкого круга объектов — от легких газов до высокомолекулярных органических соединений и некоторых металлов;

5) возможность изучения различных свойств веществ и физико-химических взаимодействий в газах, жидкостях и на поверхности твердых тел.

Недостатки газовой хроматографии

1) Ограничение лишь парообразными пробами;

2) Вещества должны иметь точку кипения ниже 350 ^{o}C; не быть термолабильными;

3) Нередко необходима интенсивная пробоподготовка;

4) Для идентификации пиков часто необходимы сложные методы – масс спектрометрия;

Но!
Газовая хроматография сейчас – одна из самых распространенных аналитических техник;

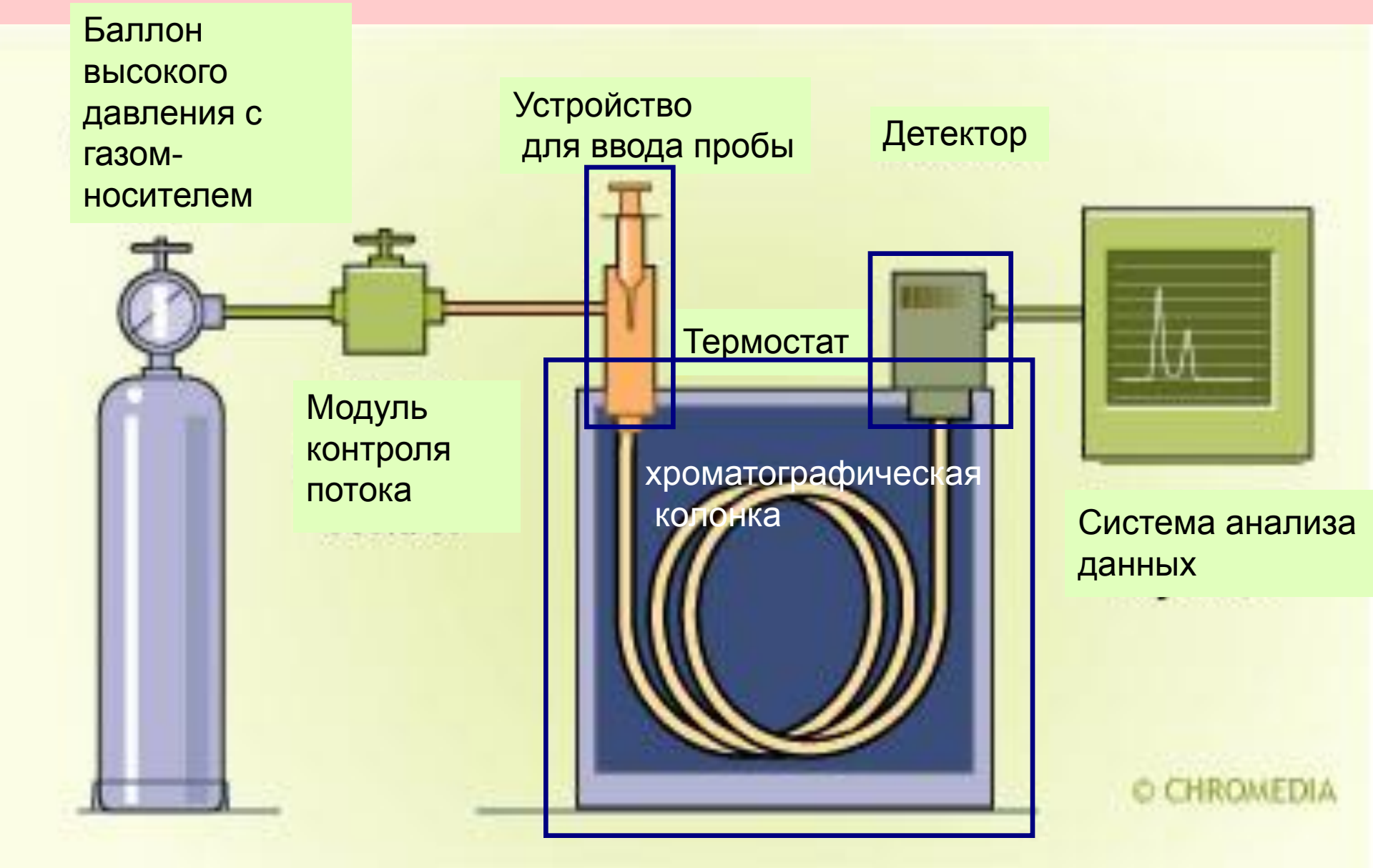
более 50 тыс. действующих в мире приборов.

Фирмы, выпускающие газовые хроматографы:

~ 130 производителей в мире:
Thermo Fisher Scientific, Agilent, Perkin-Elmer, Shimadzu, Brucker, Chromtech, Dionex

3 производителя в России и СНГ: Хроматек, Аналитприбор, ЦветАналитик

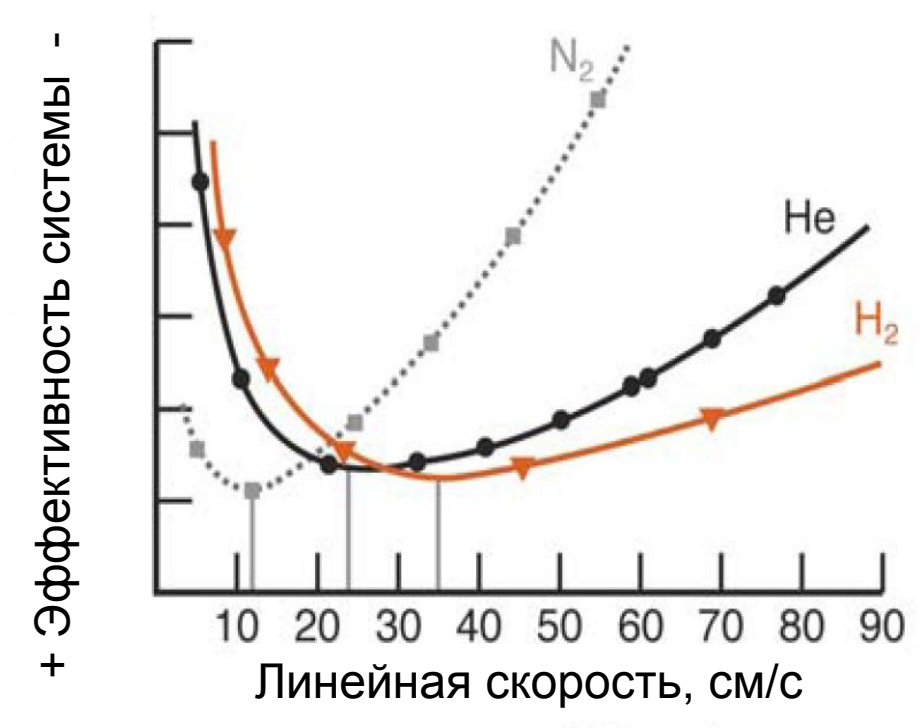
Принципиальная схема газового хроматографа



Термостатируемые элементы заключены в пунктирный контур.

Система подготовки газов служит для установки, стабилизации и очистки потоков газа-носителя и дополнительных газов. Включает блок регулировки расходов газов.

Газ-носитель:
гелий, азот,
водород, аргон



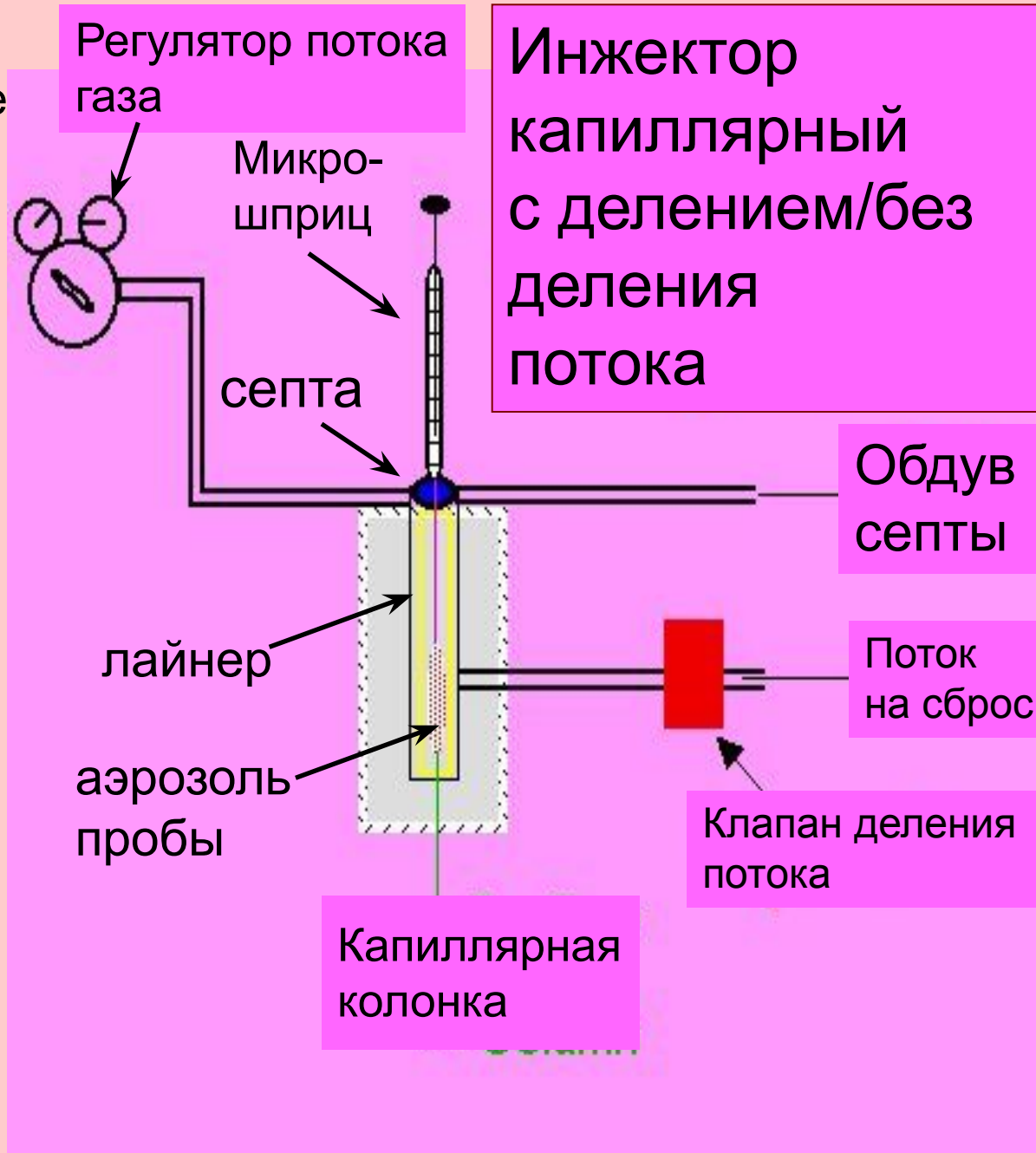
Газ-носитель переносит разделяемые компоненты по колонке, не взаимодействуя ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой.

Вспомогательные газы: кислород, водород, воздух, азот, необходимые для работы детектора.

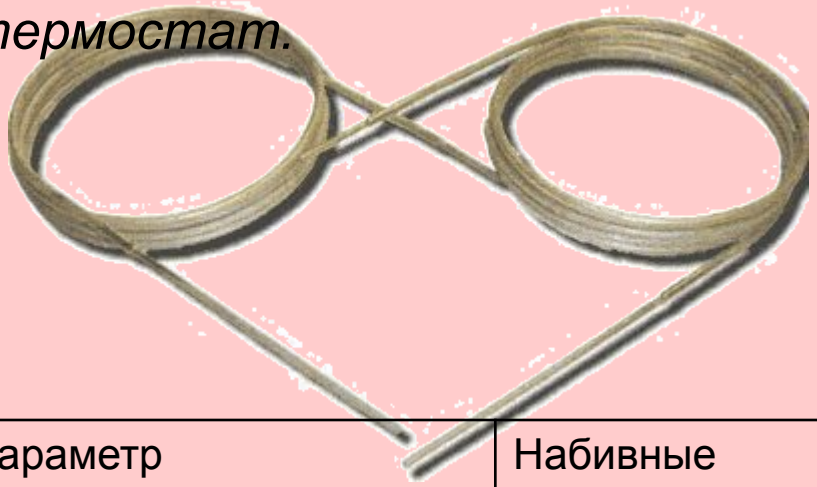
В России принята цветовая маркировка баллонов, содержащих различные газы.

Газовый реду́ктор — устройство для понижения давления газа на выходе, находящегося в какой-либо ёмкости (*баллоне* или газопроводе), до рабочего и для автоматического поддержания этого давления постоянным, независимо от изменения давления газа в емкости.

Система дозирования позволяет вводить в поток газа-носителя определенное количество анализируемой смеси в газообразном или жидком состоянии. Представляет собой устройство с самоуплотняющейся резиновой мембраной или кран-дозатор. Ввод пробы осуществляется с помощью микрошприца или дозирующей петли. Устройство ввода пробы термостатировано при температуре, равной температуре колонки или выше на 20 − 30°С.



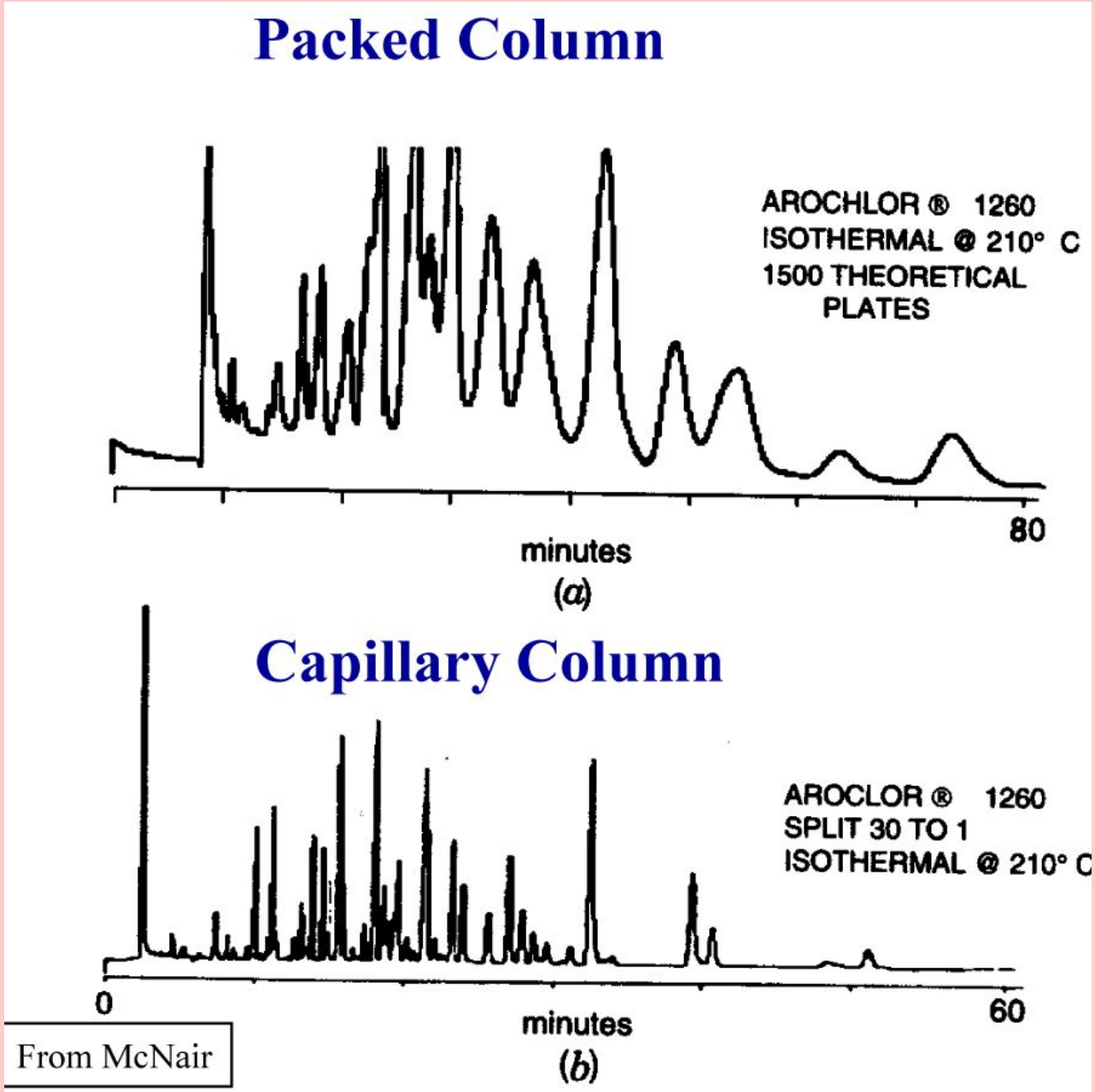
С потоком газа-носителя проба из инжектора переносится в ***колонку****, которая помещена в термостат.*



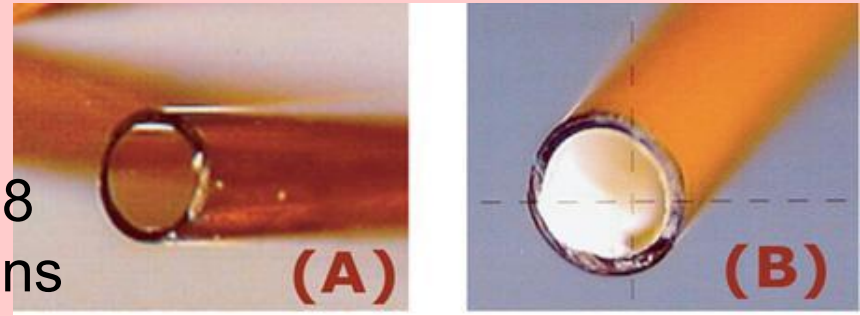
Параметр	Набивные	Капиллярные
Длина колонки, м	1-6	10-100
Внутренний диаметр, мм	2-4	0,25-0,55
Среднее число теоретических тарелок	5 000	150 000
Толщина пленки, мкм	1-10	0,005-0,5

Материалом для изготовления колонок служат стекло, нержавеющая сталь, медь, иногда фторопласт. В последнее время наибольшее распространение получили капиллярные колонки, изготовленные из кварца с полиамидными пленками.

Разделение на набивной и капиллярной колонках одной и той же смеси



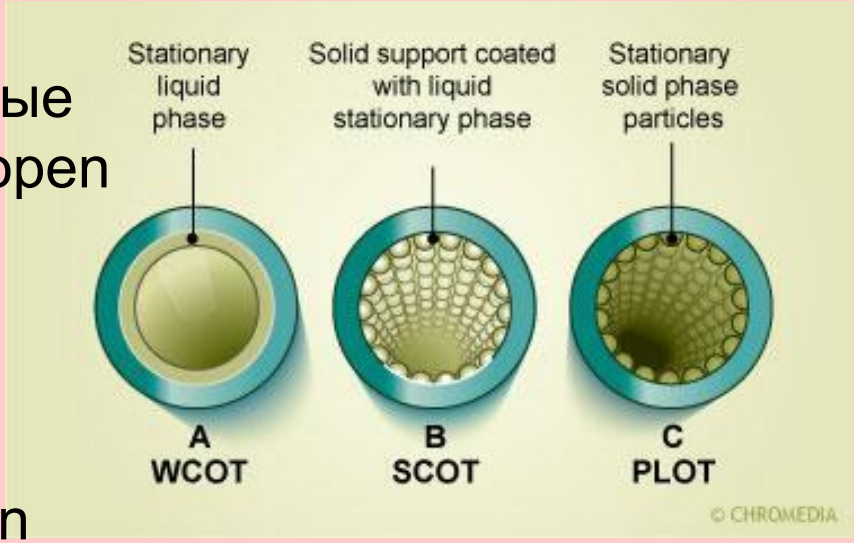
Типы капиллярных колонок



WCOT PLOT

− открытые с пленочной НЖФ (0.1-0.8 мкм) - wall-coated open tubular columns (**WCOT**) - классические;

− открытые с пористым слоем (адсорбенты Al_2O_3/KCl, молекулярные сита или полимеры) – porous layer open tubular columns (**PLOT**) - для газов;



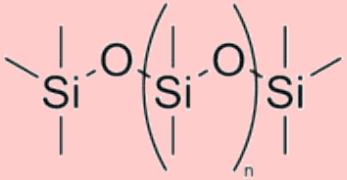
− открытые с твердым носителем, «пришитым» к стенкам, на который нанесена НЖФ - support-coated open tubular columns (**SCOT**).

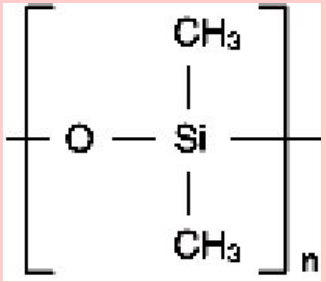
Классификация неподвижных фаз по максимально допустимой рабочей температуре:

- органическая до 240°С;
- кремнийорганическая до 360°С.

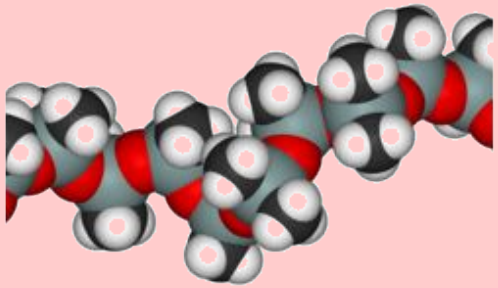
Верхний предел температуры обычно определяется величиной испарения, при медленном уносе неподвижной жидкой фазы потоком газа-носителя.

Неподвижные жидкие фазы

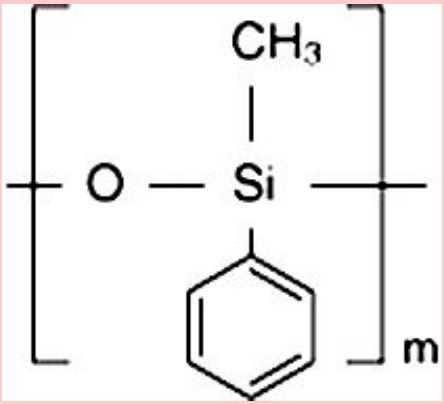


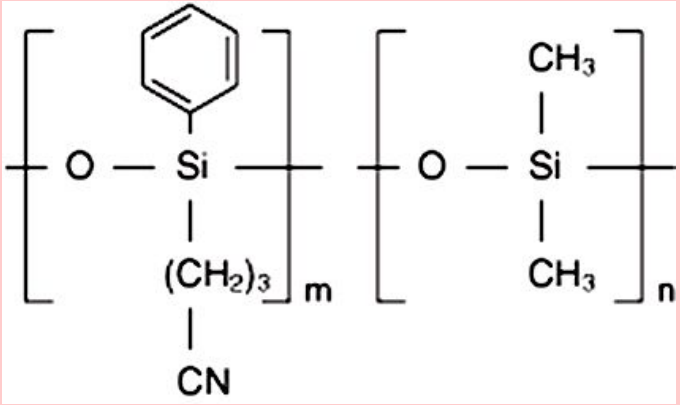


- 60 до 360 °С



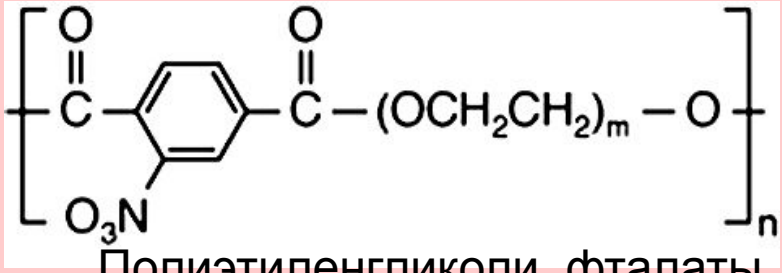
Метил-полисилоксаны





- 60 до 320 °С

Фенил, циано, пропил-полисилоксаны и т.п.



- 20 до 260 °С

Полиэтиленгликоли, фталаты

П О Л Я Р Н О С Т Ь

Неподвижные фазы, применяемые для разделения соединений различных классов	
Класс соединений	Неподвижная фаза
Алкалоиды	Силиконы Е-30, F-1
Амины алифатические	Карбовакс 400 + КОН
Амины ароматические	Силиконы OV-1, OV-101
Аминокислоты	Нитрилсиликоны
Эфиры жирных кислот	Метилфенилсиликоны
Полихлорированные бифенилы	
Полициклические ароматические углеводороды	Метилсиликоны Силиконы SE-30, SE-54 Карбовакс 1500
Гербициды	Силиконы SE-30, SE-50 Силиконы, SP-1000
Инсектициды	Апиезоны L,M, Силикон Е-52 Силиконы, карбоваксы
Спирты С1-С5	Силиконы
Пестициды	
Фенолы	
Углеводороды	
Эфиры	
Металлорганические соединения	

Принцип «Подобное растворяется в подобном; а разделяется противоположным»

Факторы, влияющие на эффективность разделения

Диаметр колонки

малые внутренние диаметры, например 0,25 мм, предпочтительнее

Длина колонки

длину следует увеличивать в 4 раза, чтобы получить в 2 раза большую степень разделения

Газ-носитель

Легкие водород, гелий лучше применять для колонок с малым содержанием НЖФ, которые работают с высокими скоростями потока для быстрых аналитических разделений.
Тяжелые газы-носители (азот, аргон) наиболее пригодны для колонок с высоким содержанием НЖФ, в полупрепаративном режиме.

Скорость газа-носителя

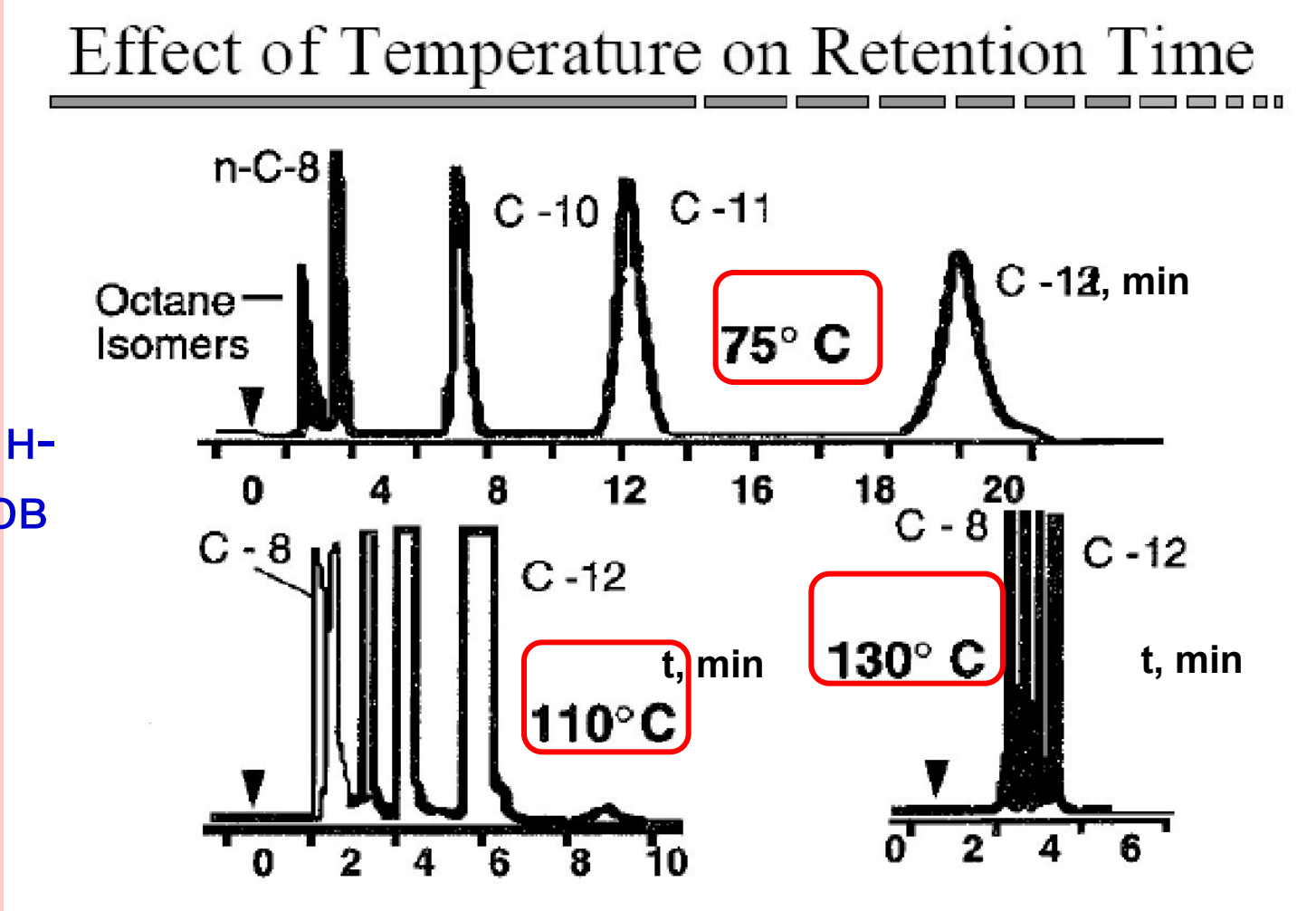
Зависит от конструкции колонки, неподвижной жидкой фазы, газа-носителя, температуры. На практике линейная скорость составляет 1 - 24 см^3/сек.

Факторы, влияющие на эффективность разделения

Температура

Оптимальная температура - компромисс между разделением, которое ухудшается, и скоростью анализа, которая увеличивается с возрастанием температуры.

смесь н-алканов



Факторы, влияющие на эффективность разделения

Режим работы хроматографа

Программирование температуры: вещества проходят по колонке при температуре, оптимальной для их разделения, если соответствующим образом выбраны ***начальная температура и скорость нагрева****. В результате продолжительность анализа значительно снижается, достигается хорошее разрешение, а высота последних пиков возрастает.*

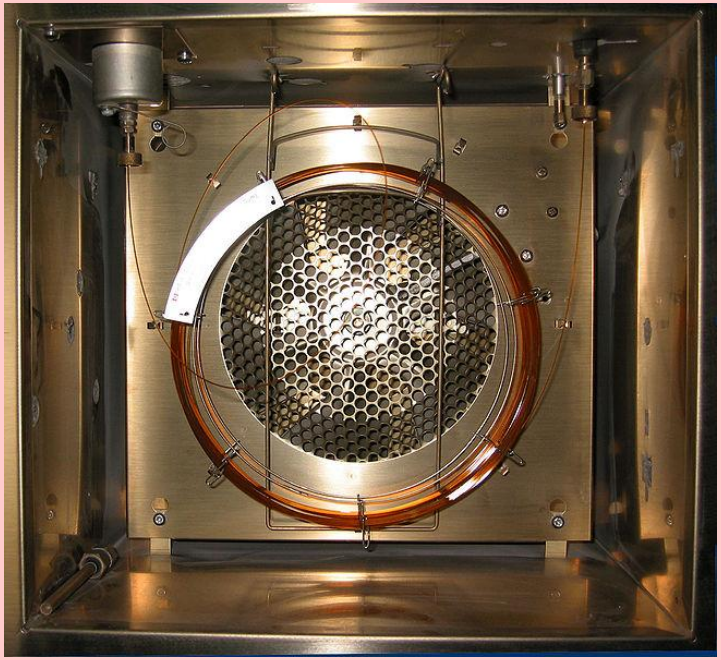
Терморежим хроматографа

Зоны раздельного температурного контроля:

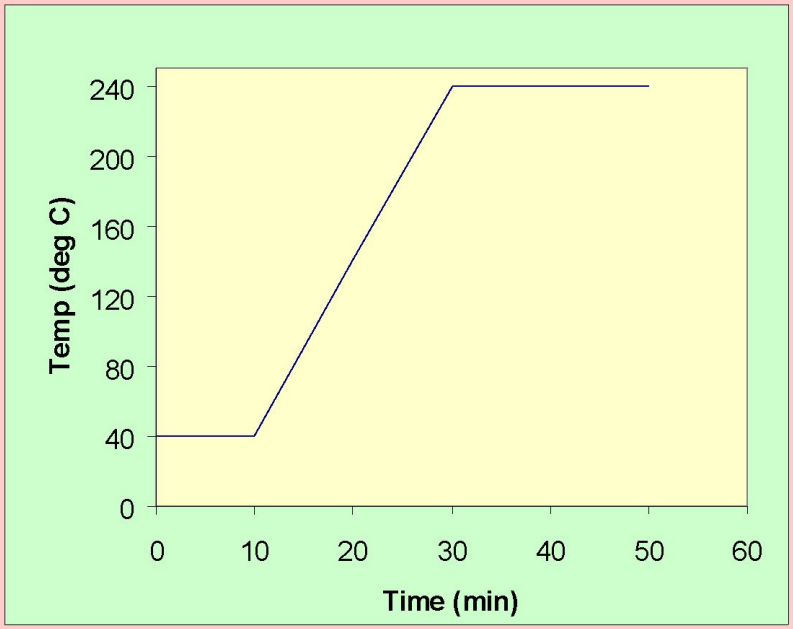
1) инжектор, 2) термостат, 3) детекторы

Температурный контроль термостата

изотермальный



градиентный



Система детектирования измеряет изменения физико-химических свойств выходящей из колонки смеси (компонент + газ-носитель) и преобразует в электрический сигнал. Величина сигнала зависит как от природы компонента, так и от содержания его в анализируемой смеси.

Критерии оценки детекторов:

− чувствительность, минимально детектируемая концентрация;

− уровень шума, дрейфа нулевой линии;

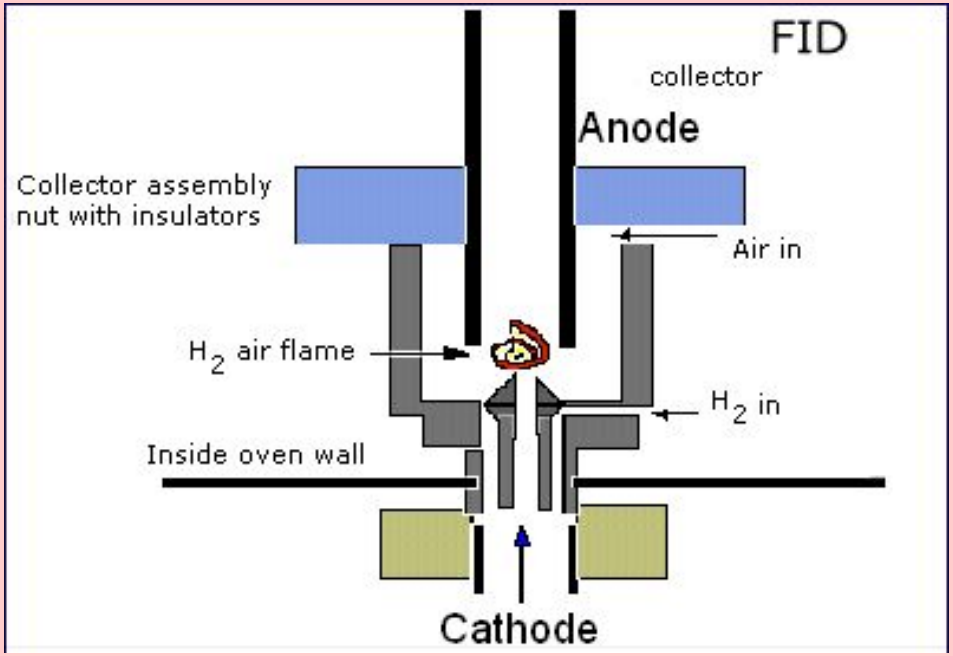
− диапазон линейности;

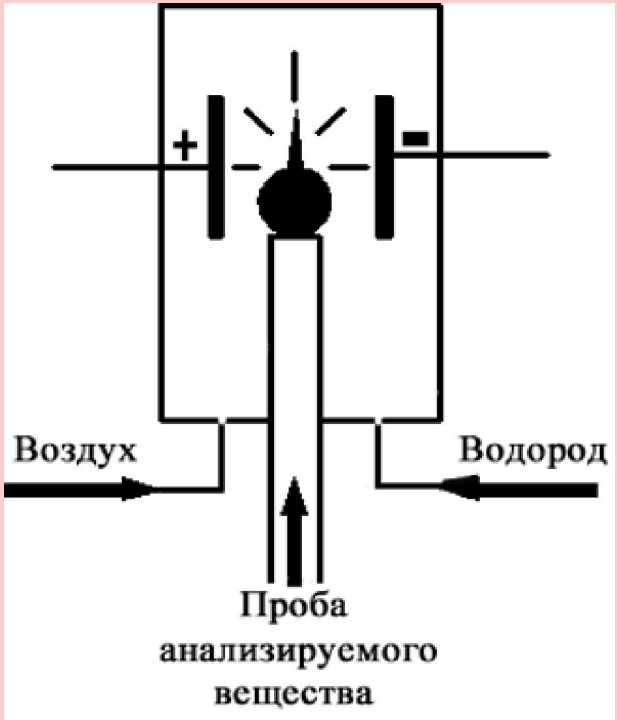
− эффективный объем и время отклика (быстродействие);

− селективность.

Детектор	Вещества	Селек-тивность	Газ-носитель	Чувствитель-ность	Линейный диапазон	Недостатки
Электронного захвата	Галоген-, азот-и ки-слородсодер жащие	Высокосел ективен	Ar, N2+10%C H4, He	$10^{-12} - 10^{-13}$ г $5 \cdot 10^{-9} - 10^{-4}$%	$10 - 10^{2}$	Работа с разбавленными растворами; МДРТ для ЗН< 150°С; высокие требования к г-н; зависимость от скорости г-н и т-ры, применение в основном для качественного анализа.
Пламенно-ионизационный	Органические	Универ-сальный	He, H2, N2	10^{-10} г $10^{-6} - 99$%	$10^{6} - 10^{8}$	Особые условия стабильности и постоянство потока г-н и воздуха; слабый отклик на соединения, насыщенные кислородом.
Термо ионный	Фосфор-, серу-и азот-содержащие	Селекти-вен	He, N2	10^{-12} г 10^{-6}%	$10^{3} - 10^{4}$	Необходимость калибровки.
Пламенно Фотометричес-кий	Серу-, фосфор содержащие	Высокосе-лективен	He, N2	10^{-11} г $10^{-6} - 10^{-2}$%	$10^{2} - 10^{3}$	
Теплопроводный (катарометр)	Органические, неорганически е	Универ-сальный	He, N2	$10^{-6} - 10^{-9}$ г $10^{-3} - 100$%	10^{4}	Чувствительность к температуре; используется только для некорродирующих веществ.

Схема пламенно-ионизационного детектора



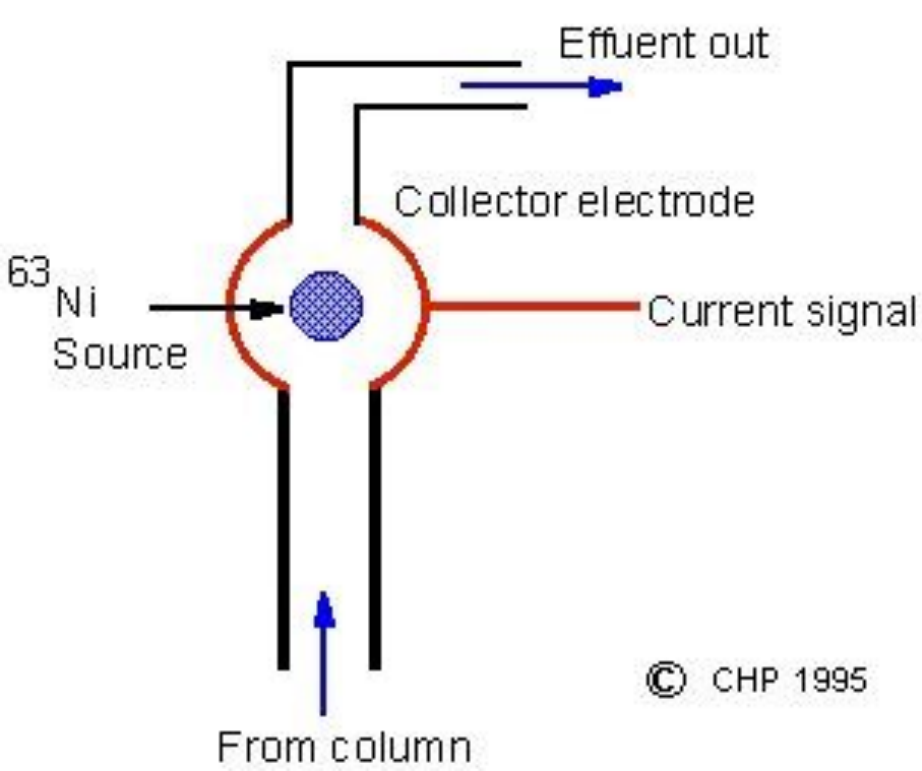


$$CH\bullet + O\bullet \rightarrow CHO^{+} + e^{-}$$

$$CHO^{+} + H_2O \rightarrow H^3O^{+} + CO$$

Принадлежит к ионизационным детекторам, принцип работы которых основан на изменении ионного тока, вызванного введением в детектор анализируемого вещества. Ионный ток возникает под действием источника ионизации и электрического поля между электродами детектора.

Схема детектора электронного захвата



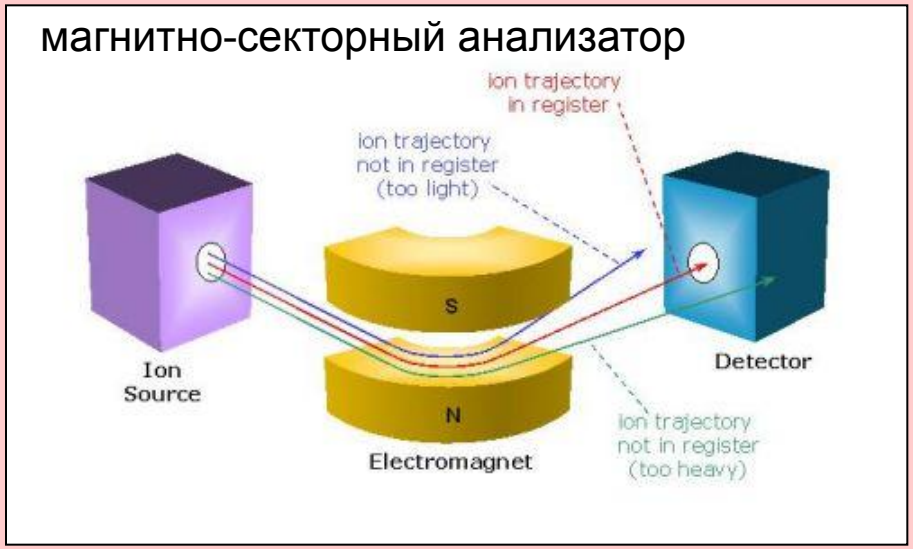
$N^2 \rightarrow N^{2+} + e^-$

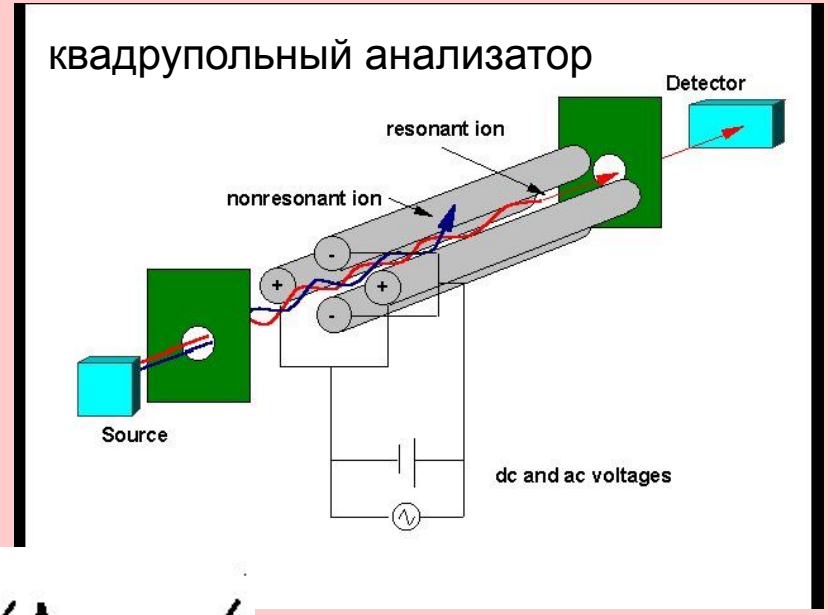
$AB + e^- \rightarrow AB^-$

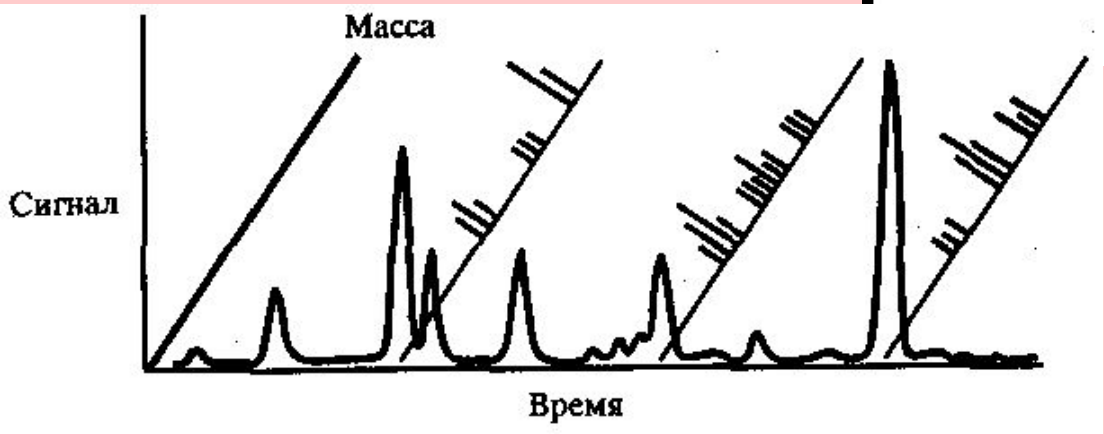
$AB^- + N^{2+} \rightarrow AB + N^2$

Радиоактивный источник испускает β-частицы, ионизирующие молекулы газа-носителя, с образованием ионов и тепловых электронов, которые формируют электрический ток в камере детектора. Принцип действия этого детектора основан на уменьшении проводимости, вызываемом захватом электронов веществом, содержащим атомы с высокой электроотрицательностью.

Масс-спектрометрический детектор



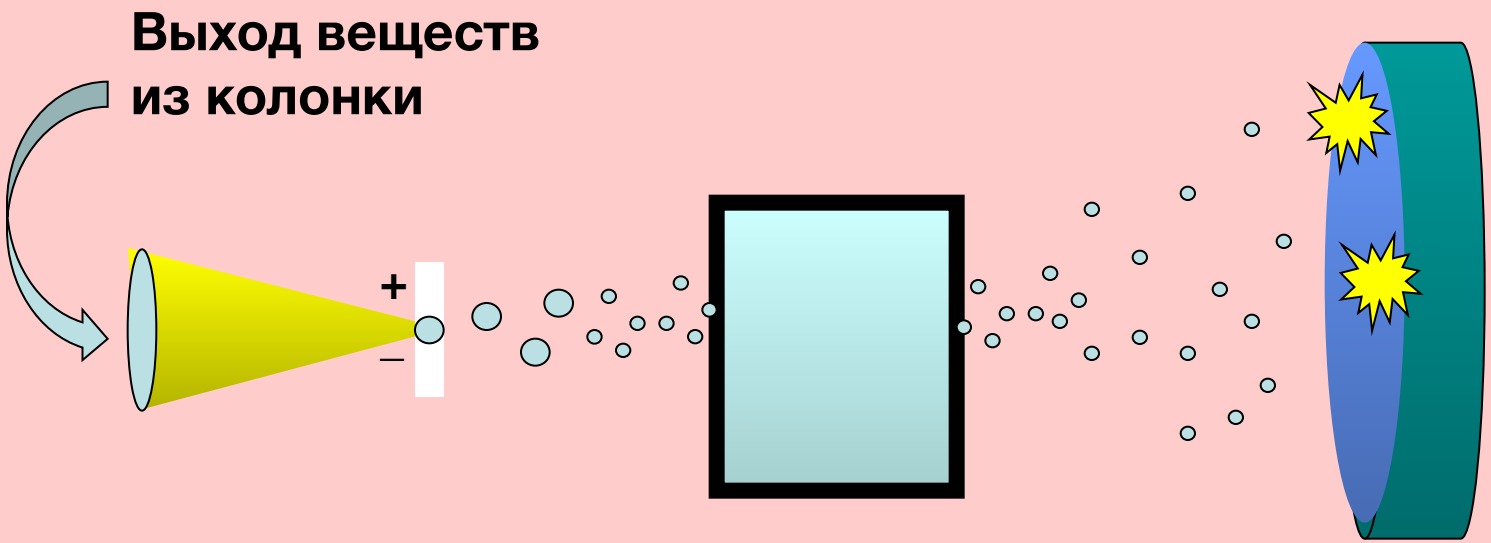




Пример хроматограммы по всем ионам.

Наиболее информативный детектор. Принцип действия: при ионизации молекулы в вакууме образуется группа характеристических ионов. Число образующихся ионов пропорционально количеству поступающего вещества, регистрируется изменение полного ионного тока. Одновременно с записью хроматограммы в любой ее точке, может быть зарегистрирован масс-спектр (зависимость интенсивности ионного тока от массы иона).

Как работает масс-спектрометрический детектор?



Источник ионов:
химический,
электронного удара,
электроспрей,
малди

Масс-анализатор:
Магнитно-секторный,
квадрупольный,
времяпролетный,
ловушки

Детектор

Пример масс-спектра фенолсодержащего вещества

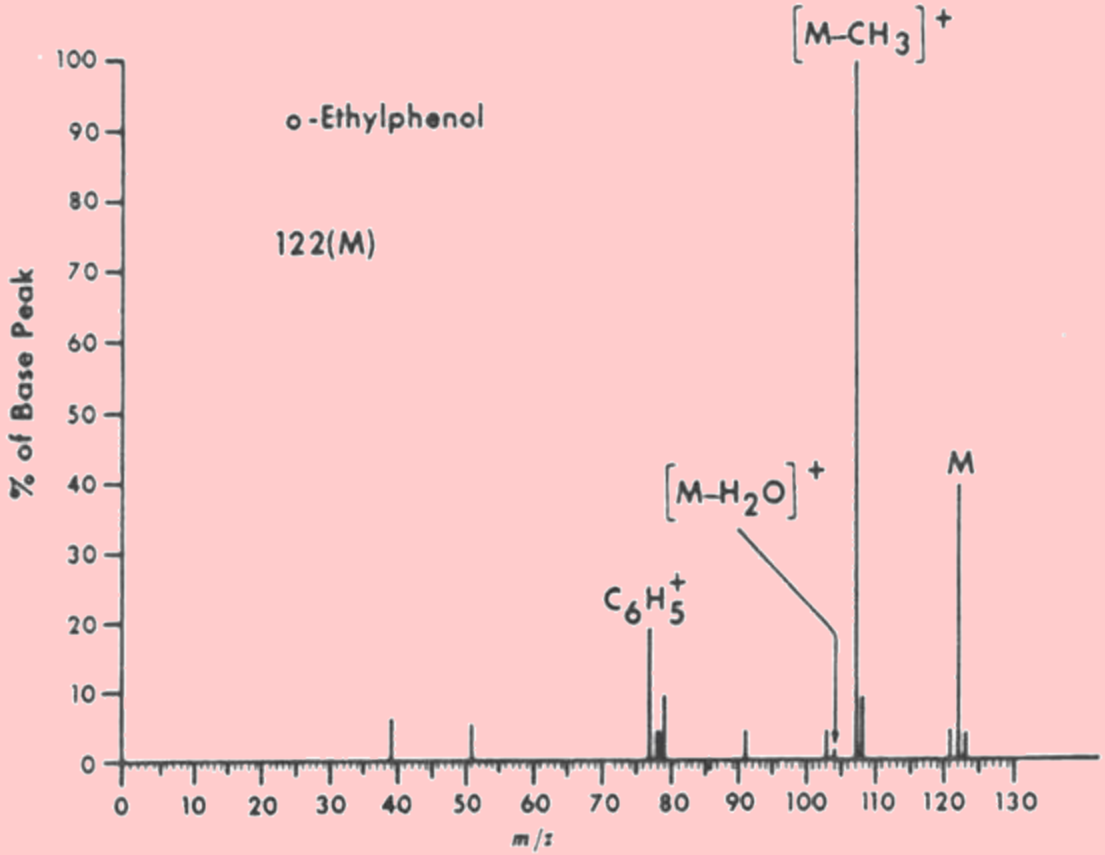
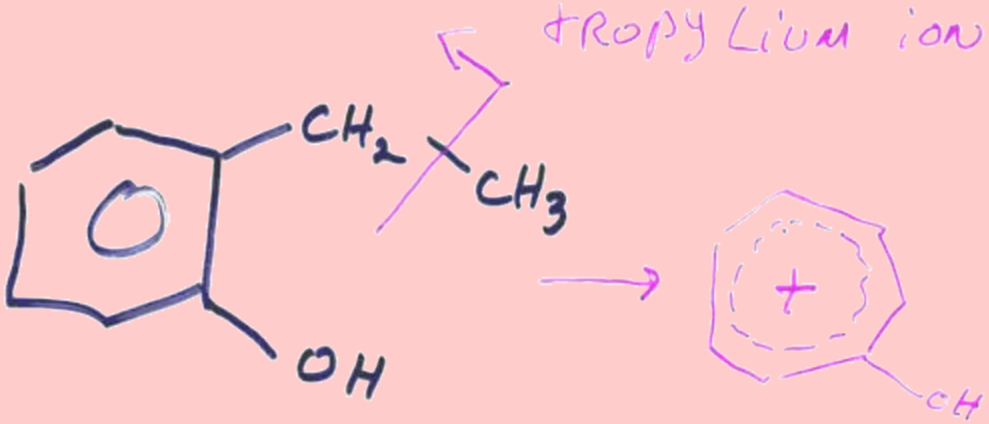
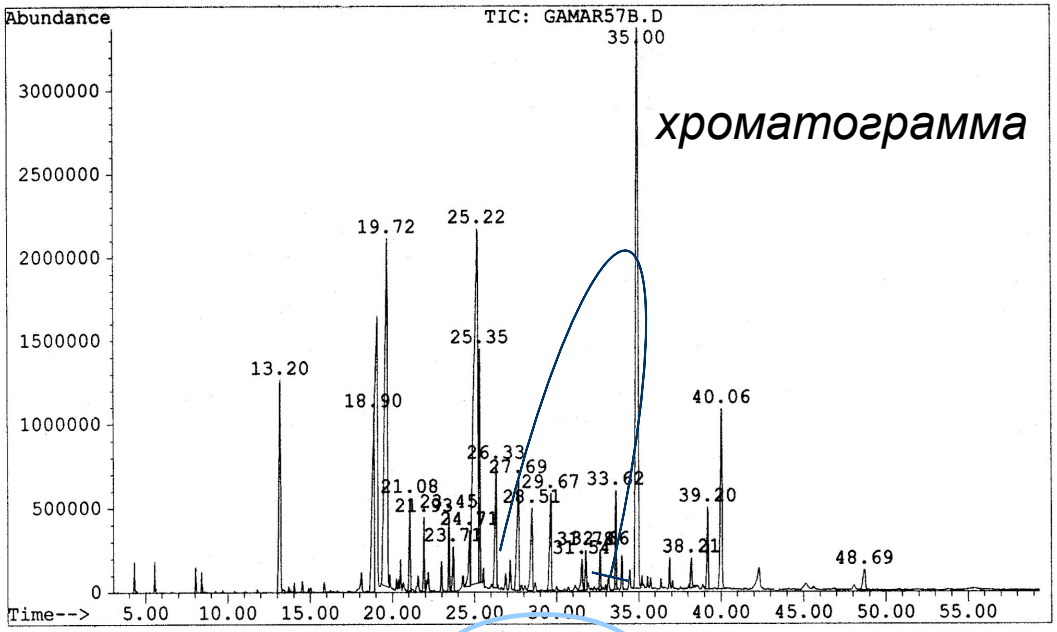
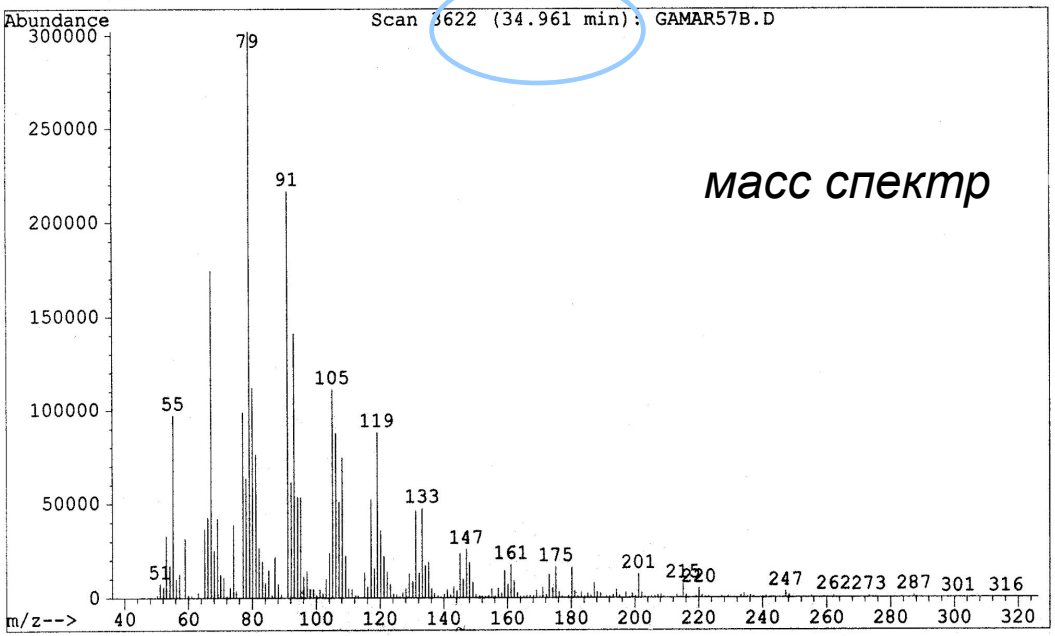


FIGURE 2.10. *o*-Ethylphenol.



Хроматомасс спек





Подготовка биологических образцов для хроматографических анализов

Биологические пробы часто не подходят для прямого анализа газовой хроматографией !

- Низкие концентрации определяемых веществ;
- Многокомпонентная матрица, мешающая разделению;
- Матрица вредна или несовместима с хроматографической колонкой;
- Интересующие вещества нелетучи либо разрушаются при высоких температурах.

Методические приемы подготовки биологических образцов

Гомогенизация (измельчение)

Добавление реагентов

Установка pH

Смешивание (встряхивание)

Нагревание (охлаждение)

Осаждение

Жидкофазная и твердофазная экстра

Фильтрование

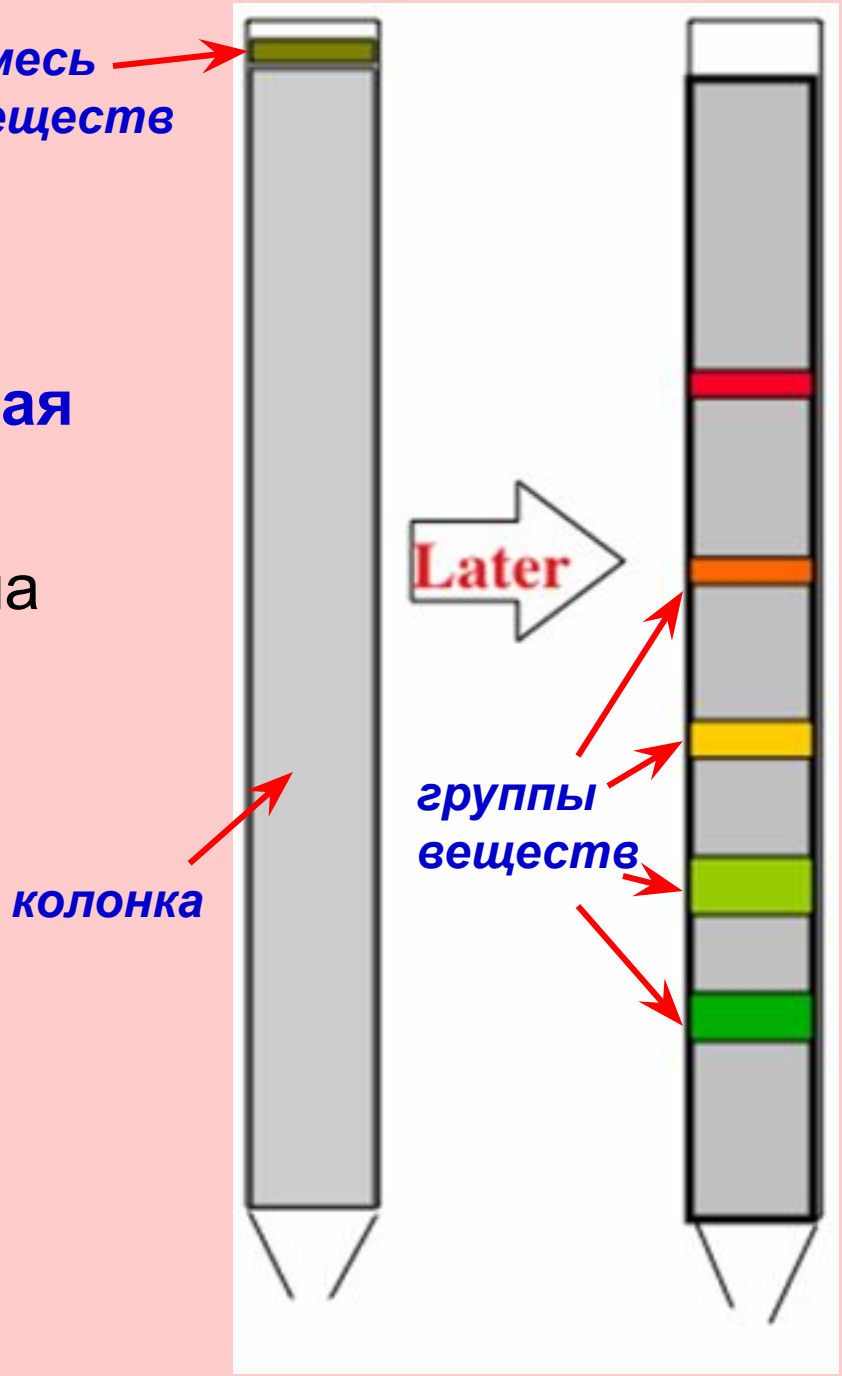
Центрифугирование

Выпаривание

Дериватизация

Очистка на колонках или в тонком слое

Для разделения и выделения групп веществ из сложных матриц применяется **колоночная и (или) тонкослойная хроматография.** Нужная группа элюируется, т.е. смывается с силикагеля, и далее используется для более подробного анализа газовой хроматографией.



Реакционная газовая хроматография

Это направленные химические превращения нелетучих соединений в летучие, а также неустойчивых в устойчивые для дальнейшего ГХ анализа.

Один из способов: получение сложных эфиров

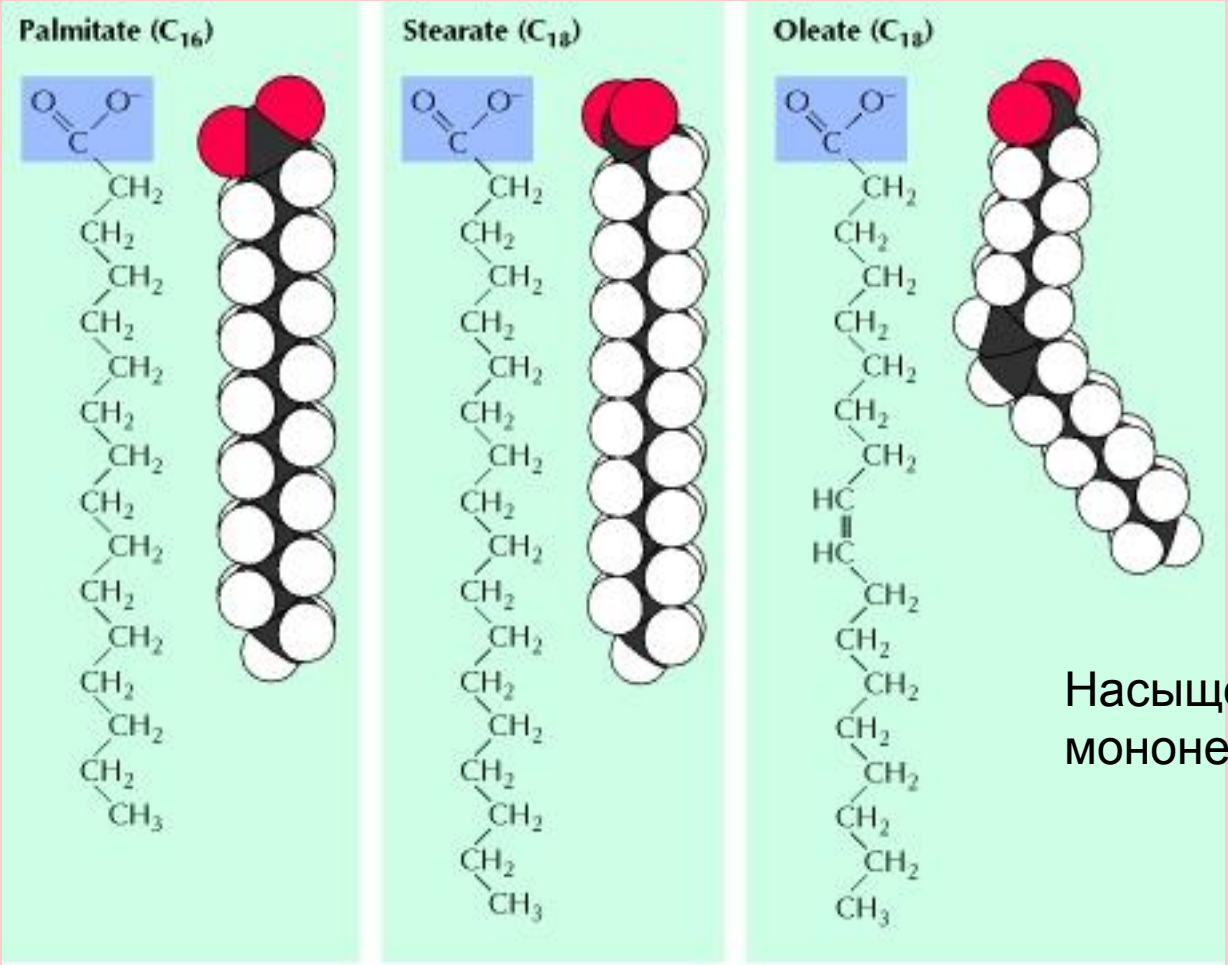
На практике используют:

диазометановый метод, $\mathbf{RCOOH + CH_2N_2 \rightarrow RCOOCH_3 + N_2}$,

метанольный метод, $\mathbf{RCOOH + CH_3OH \rightarrow RCOOCH_3}$

Хотя теория дает солидную основу для хроматографических процессов, когда дело доходит до практической работы, хроматография все еще является искусством. Она требует умения и опыта для обращения с системой колонок и манипулирования с пробой, скоростью потока газа-носителя и температурой, часто на основании метода проб и ошибок ☺

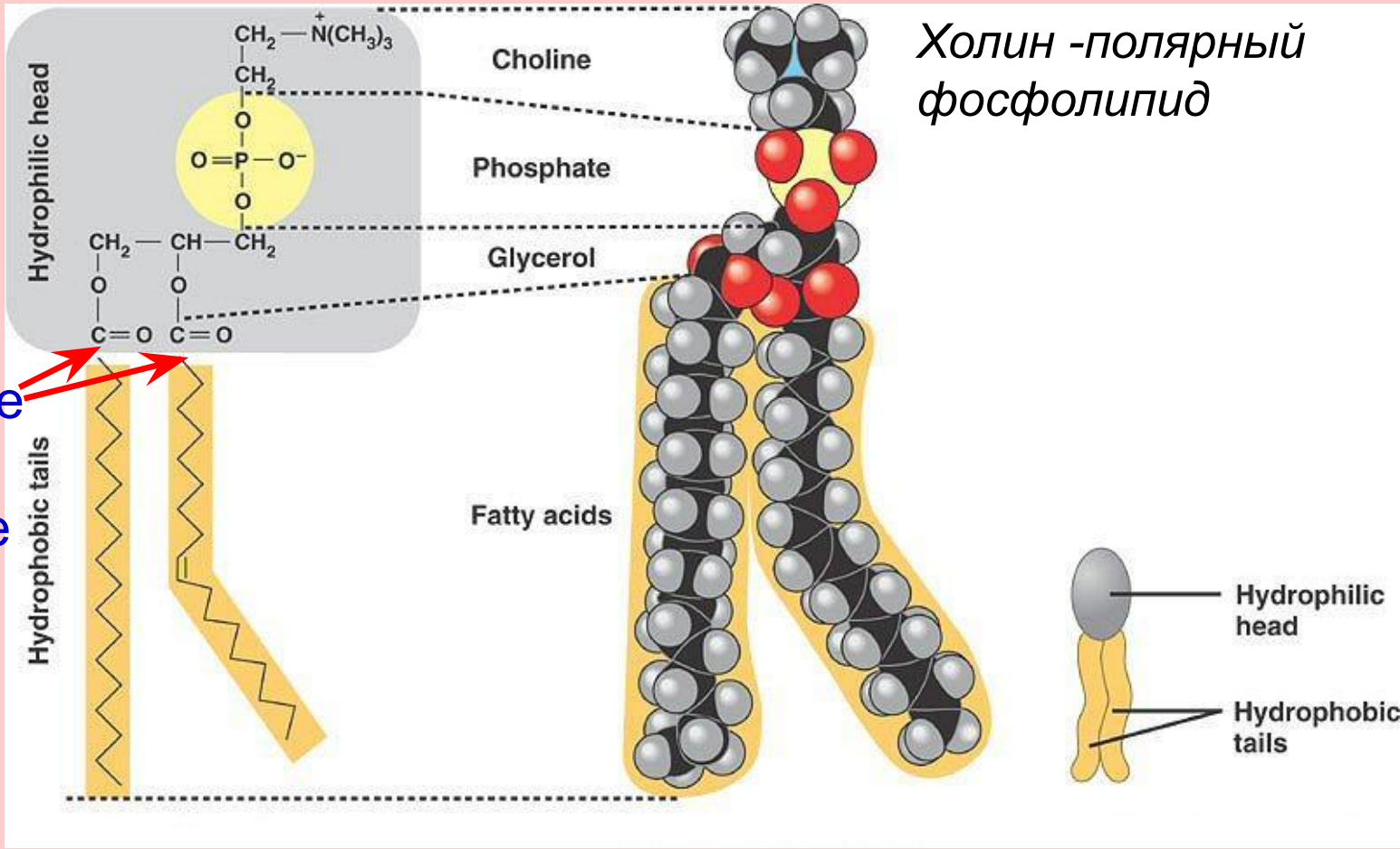
Исследуемые смеси:
метиловые эфиры жирных кислот



Насыщенные и
мононенасыщенные ЖК

Жирные кислоты – составляющие сложных липидов, в том числе полярных липидов

Отщепление при метанолизе



Холин -полярный фосфолипид

Классификация жирных кислот: длина и форма углеродной цепи; степень ненасыщенности; присутствие полярных групп.

1. *Насыщенные кислоты*

лауриновая 12:0
кокосовое масло >50%

миристиновая 14:0

пальмитиновая 16:0
пальмовое масло, животные жиры - 50%

стеариновая 18:0
бараний жир >30%

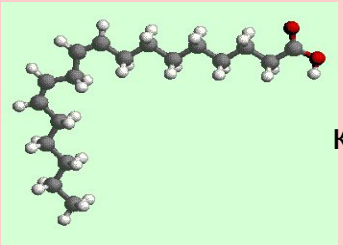
3. *Насыщенные разветвленные кислоты*

изопентадекановая i15:0
мембраны бактерий > 25%

2. *Моноеновые кислоты*

олеиновая 18:1ω9
оливковое и салатное подсолнечное масло - 80%

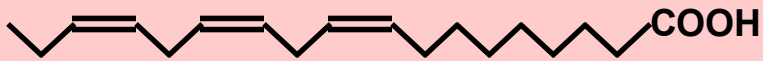
4. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК)



линолевая

18:2ω6

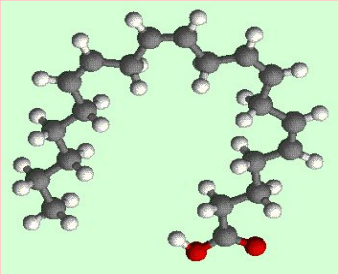
подсолнечное, соевое, кукурузное масло - 50-70%

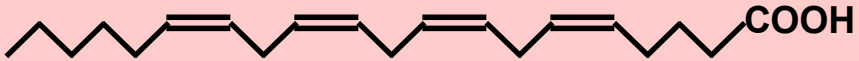


линоленовая

18:3ω3

льняное масло 40-60%

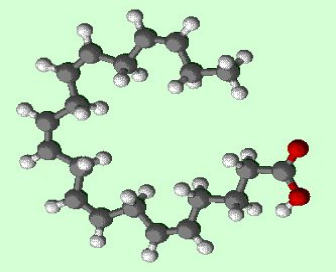




арахидоновая

20:4ω6

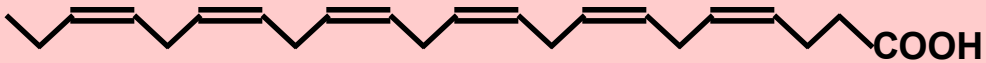
печень наземных животных

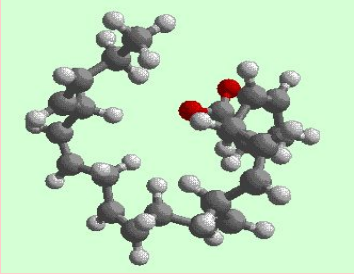


эйкозапентаеновая

20:5ω3

рыба, водные беспозвоночные





докозагексаеновая

22:6ω3

рыба, некоторые водоросли