

Газовая хроматография

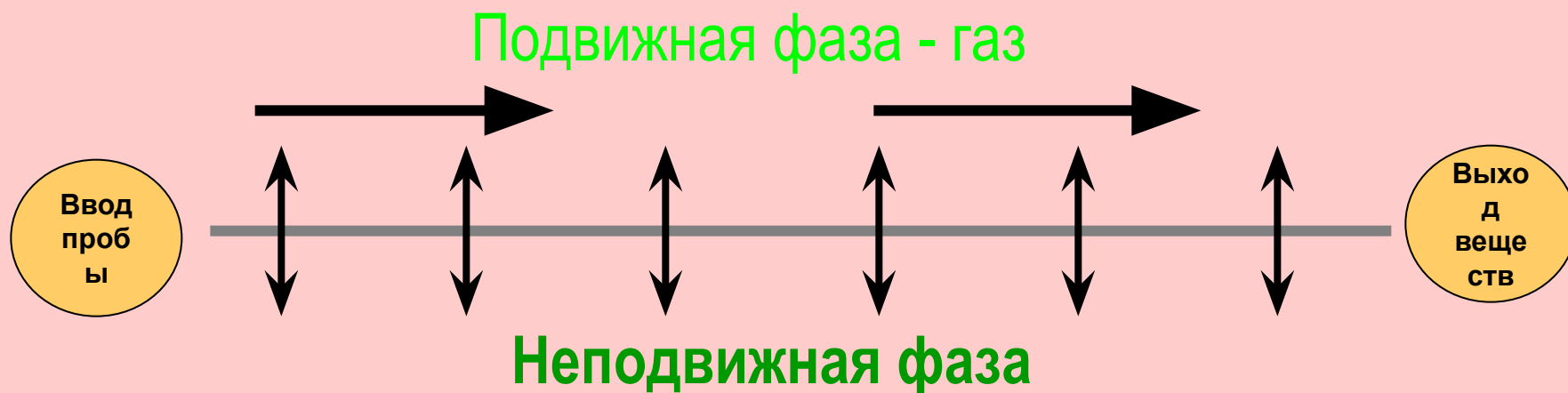
полное наименование:

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 °С; 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:

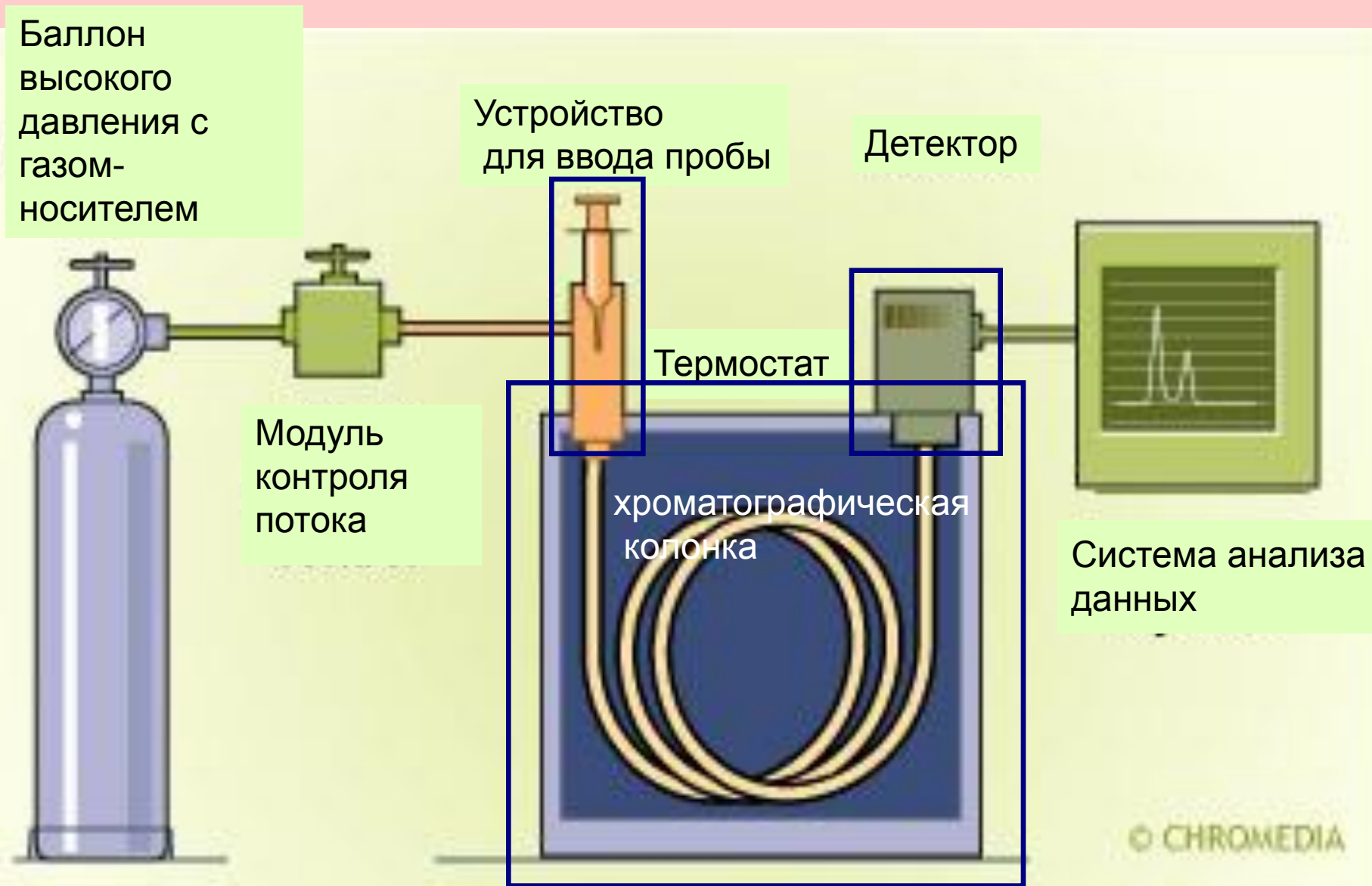
~ 130 производителей в мире:

Thermo Fisher Scientific, Agilent, Perkin-Elmer, Shimadzu, Brucker, Chromtech, Dionex



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

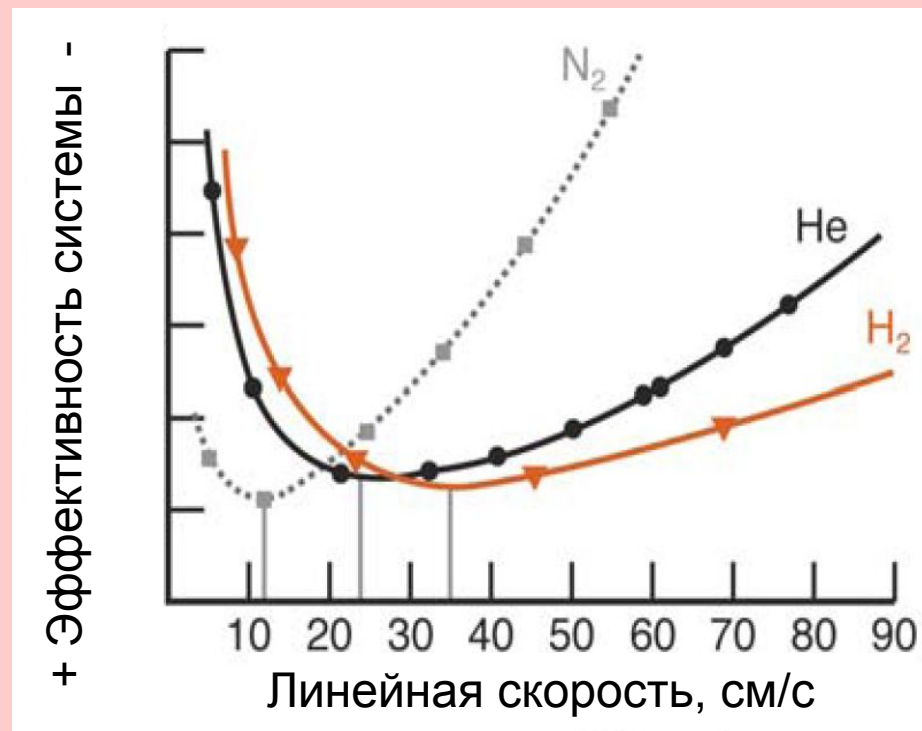
Принципиальная схема газового хроматографа



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.

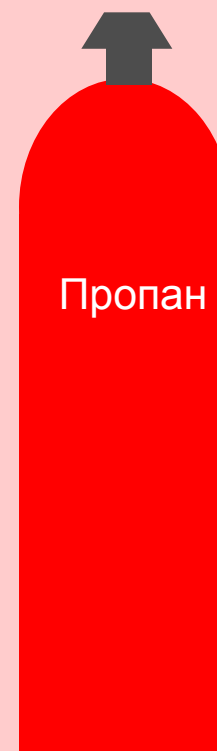
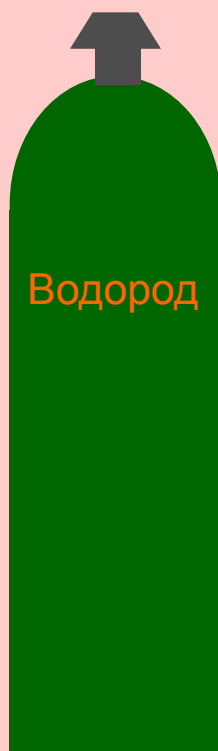
Газ-носитель:
гелий, азот,
водород, аргон



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.

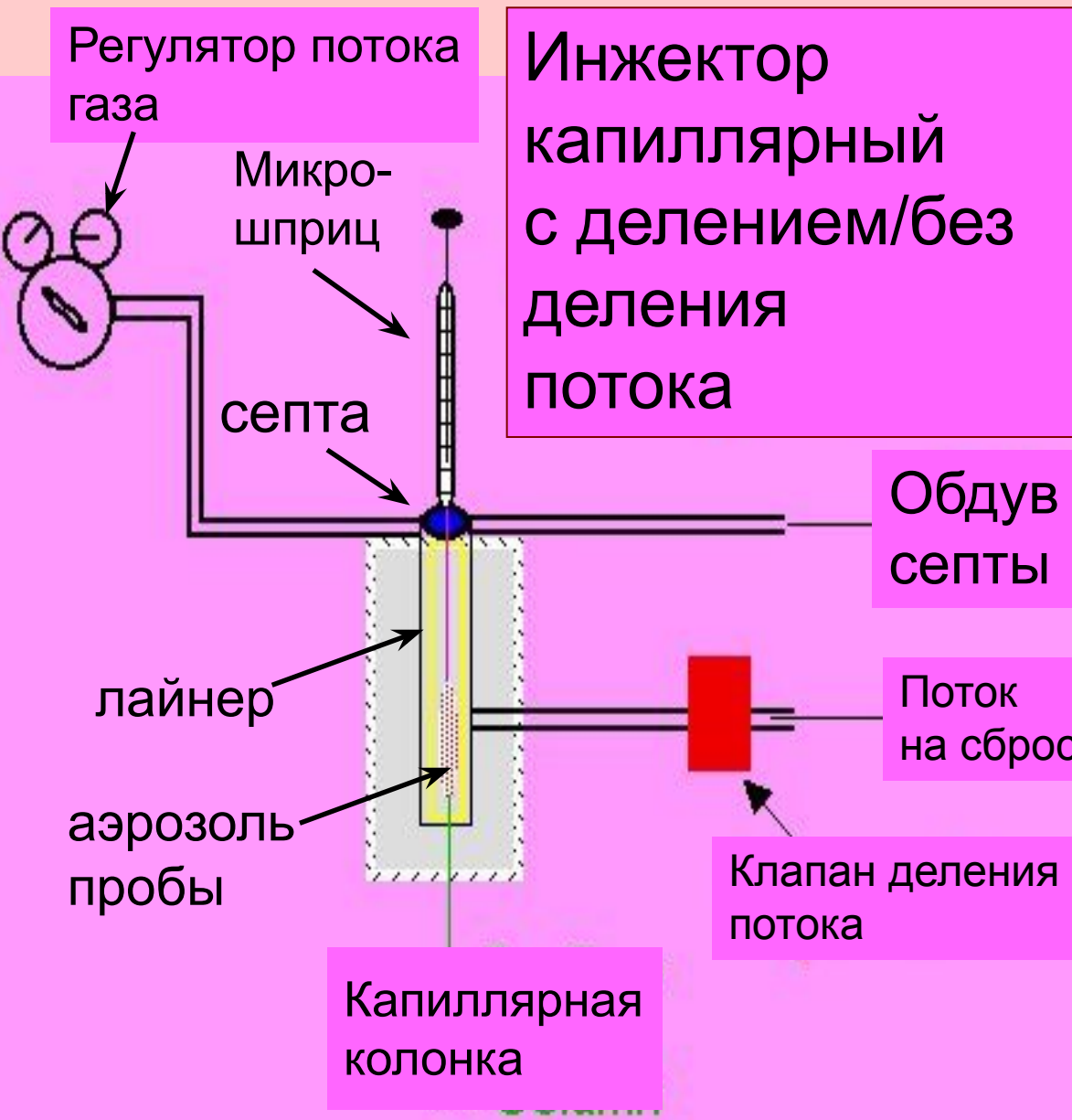
В России принята цветовая маркировка баллонов, содержащих различные газы.



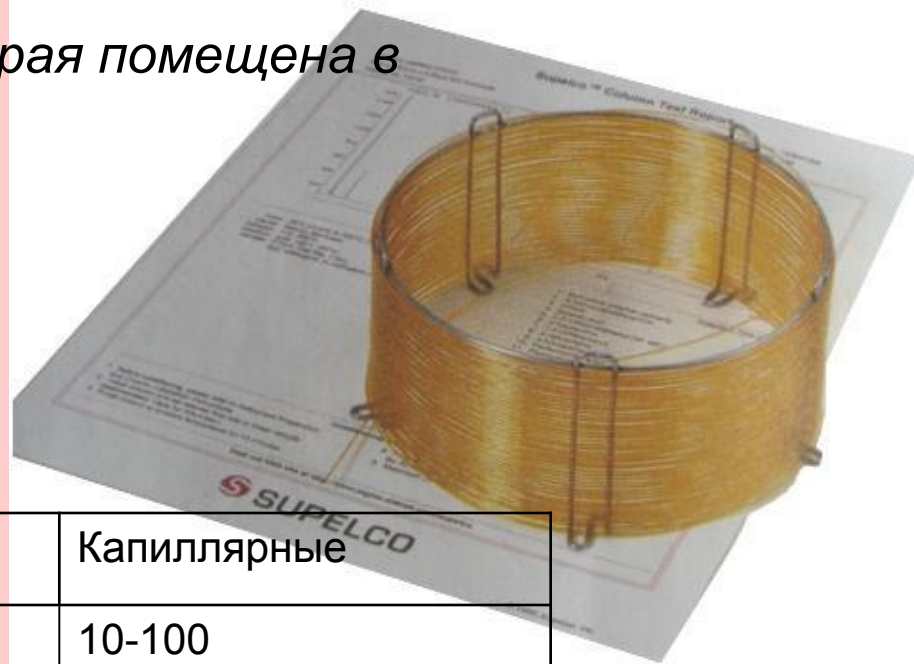
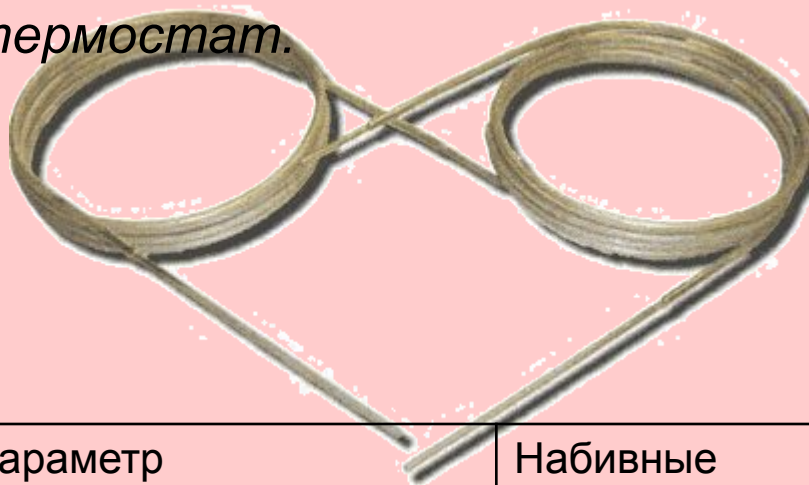
Газовый редуктор — устройство для понижения давления газа на выходе, находящегося в какой-либо ёмкости (баллоне или газопроводе), до рабочего и для автоматического поддержания этого давления постоянным, независимо от изменения давления газа в ёмкости.

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°C.



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

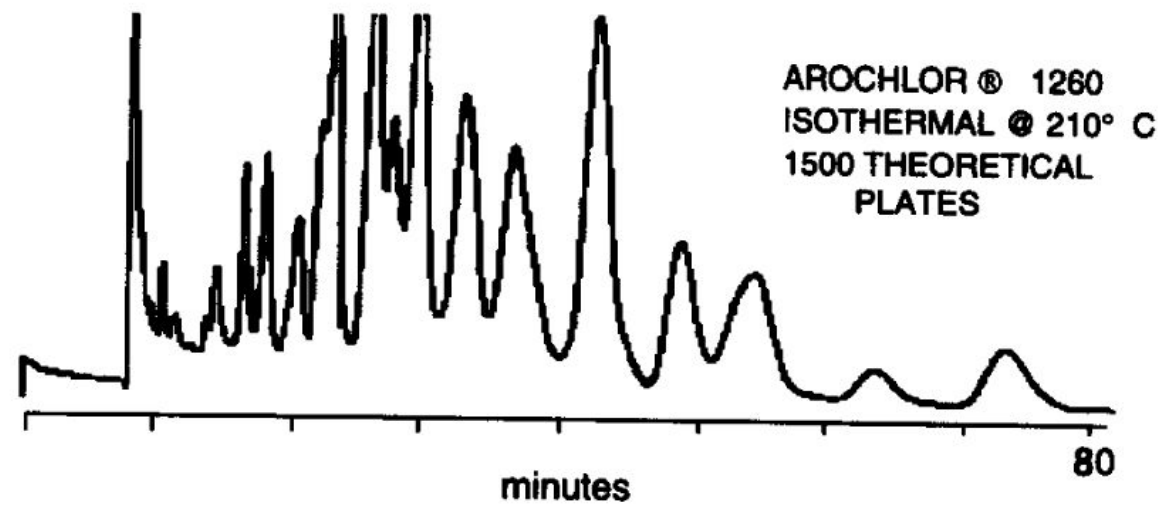


Параметр	Набивные	Капиллярные
Длина колонки, м	1-6	10-100
Внутренний диаметр, мм	2-4	0,25-0,55
Среднее число теоретических тарелок	5 000	150 000
Толщина пленки, мкм	1-10	0,005-0,5

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.

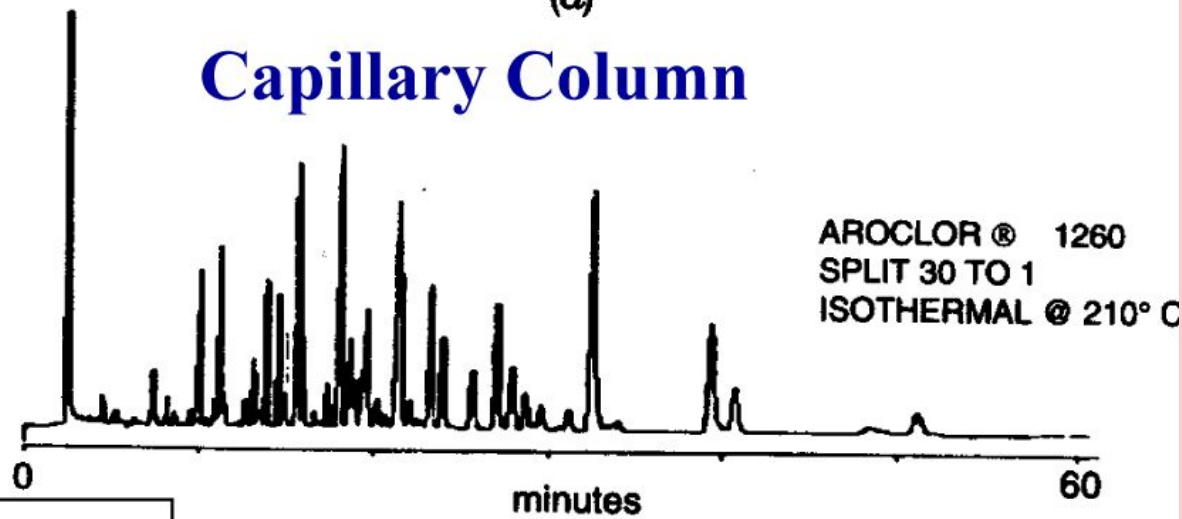
Разделение на набивной и капиллярной колонках одной и той же смеси

Packed Column



(a)

Capillary Column

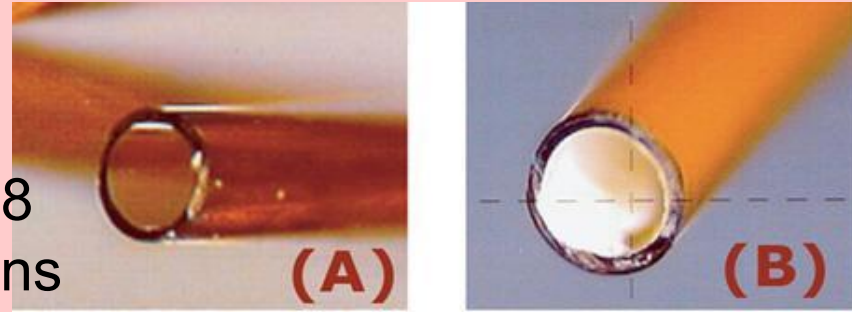


(b)

From McNair

Типы капиллярных колонок

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

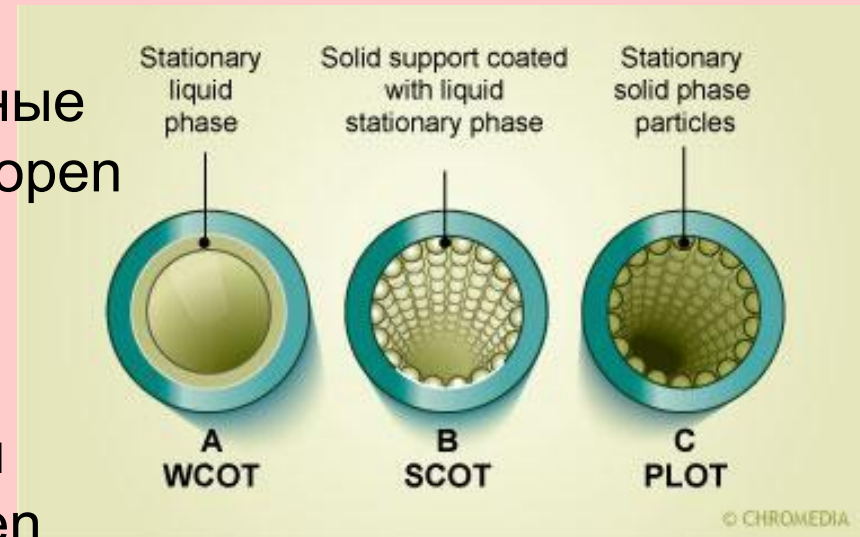


WCOT

PLOT

– 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**).

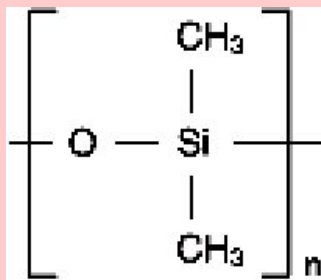
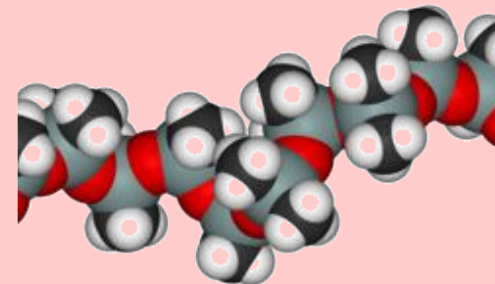
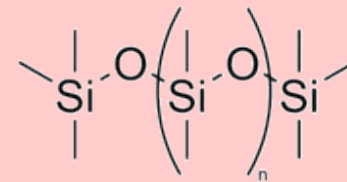


Классификация неподвижных фаз по максимально допустимой рабочей температуре:

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

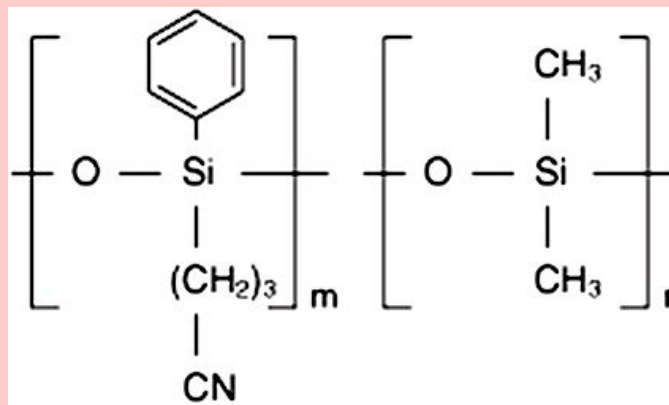
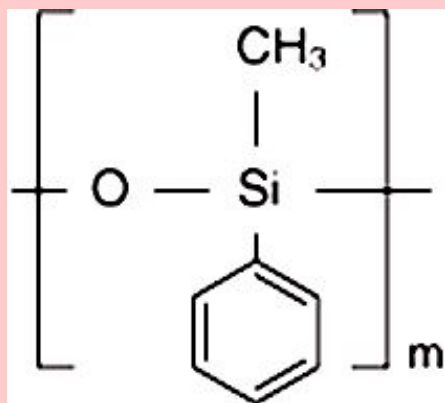
Верхний предел температуры обычно определяется величиной испарения, при медленном уносе неподвижной жидкой фазы потоком газа-носителя.

Неподвижные жидкие фазы



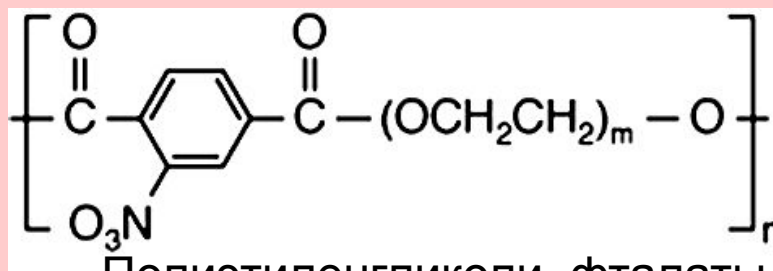
- 60 до 360 °C

Метил-полисилоксаны



- 60 до 320 °C

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



- 20 до 260 °C

Полиэтиленгликоли, фталаты

ПОЛ Я Р Н О С Т Ъ

Неподвижные фазы, применяемые для разделения соединений различных классов

Класс соединений	Неподвижная фаза
Алкалоиды	Силиконы E-30, F-1
Амины алифатические	Карбовакс 400 + KOH
Амины ароматические	Силиконы OV-1, OV-101
Аминокислоты	Нитрилсиликоны
Эфиры жирных кислот	Метилфенилсиликоны
Полихлорированные бифенилы	
Полициклические ароматические углеводороды	Метилсиликоны
Гербициды	Силиконы SE-30, SE-54 Карбовакс 1500
Инсектициды	Силиконы SE-30, SE-50 Силиконы, SP-1000
Спирты C1-C5	Апиезоны L, M, Силикон E-52 Силиконы, карбоваксы
Пестициды	Силиконы
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

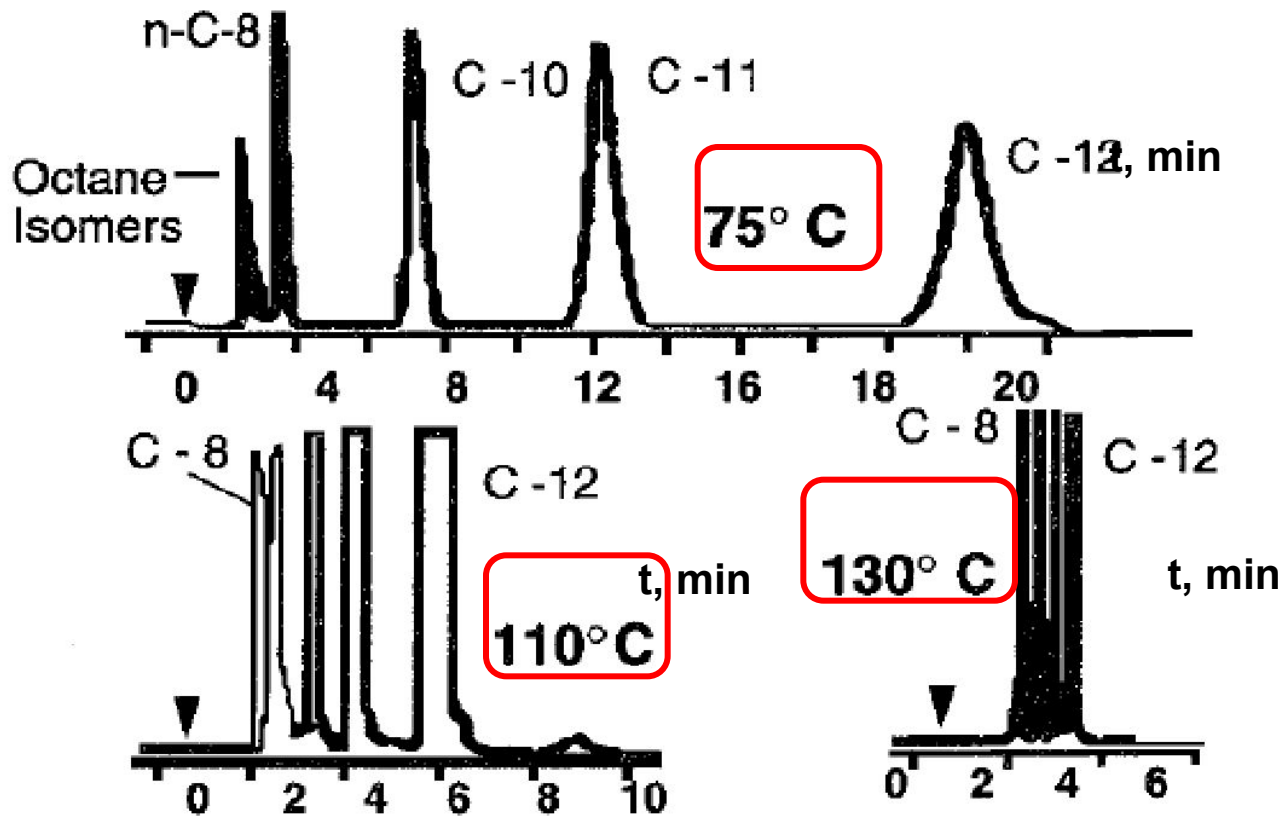
Зависит от конструкции колонки, неподвижной жидкой фазы, газа-носителя, температуры. На практике линейная скорость составляет 1 - 24 см³/сек.

Факторы, влияющие на эффективность разделения

Температура

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

Effect of Temperature on Retention Time



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.*

Терморезим хроматографа

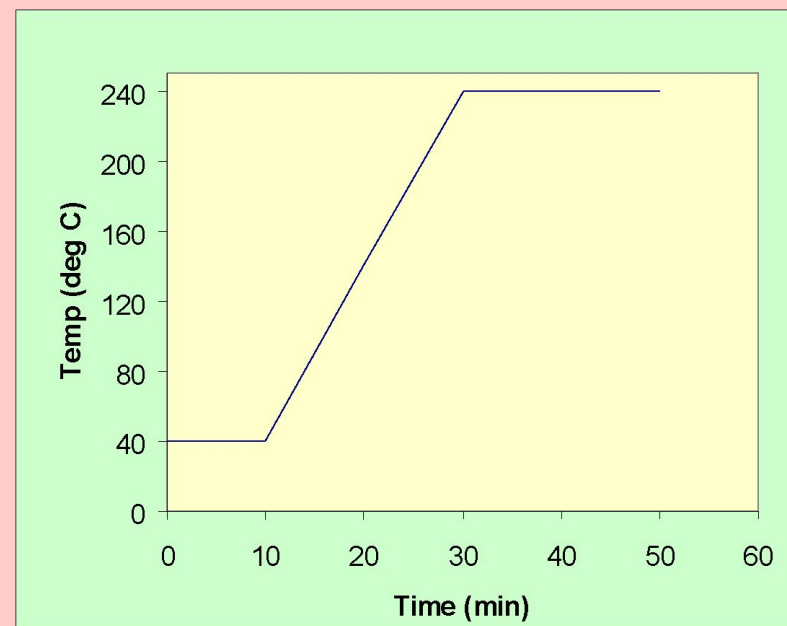
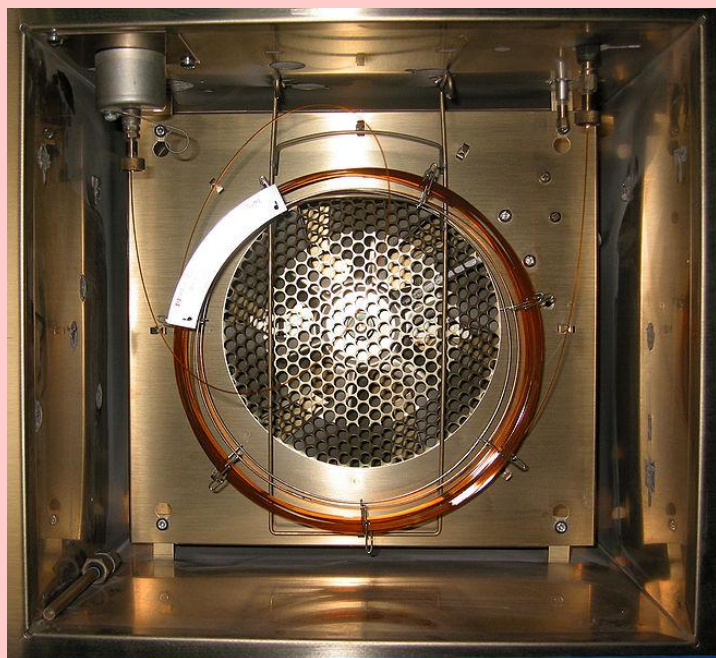
Зоны раздельного температурного контроля:

1) инжектор, 2) термостат, 3) детекторы

Температурный контроль термостата

изотермальный

градиентный



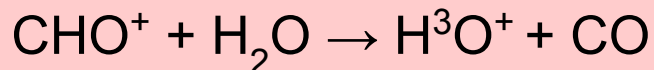
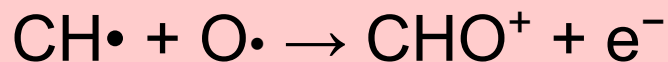
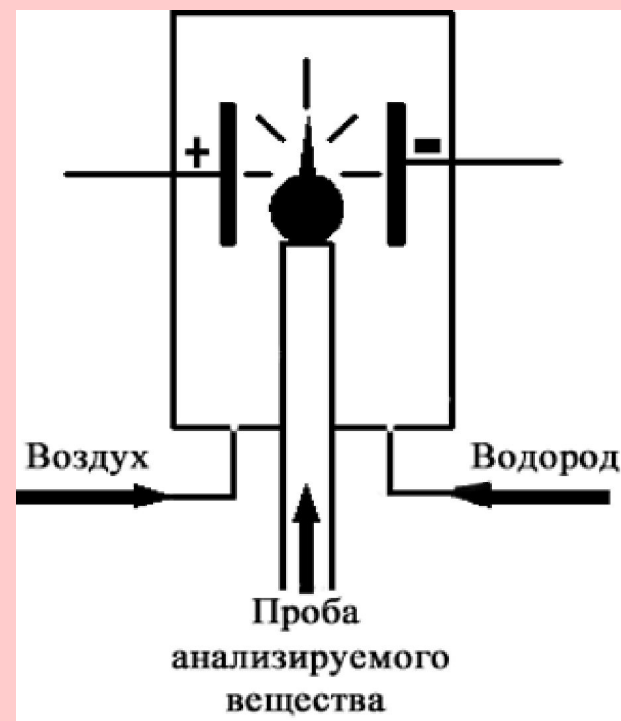
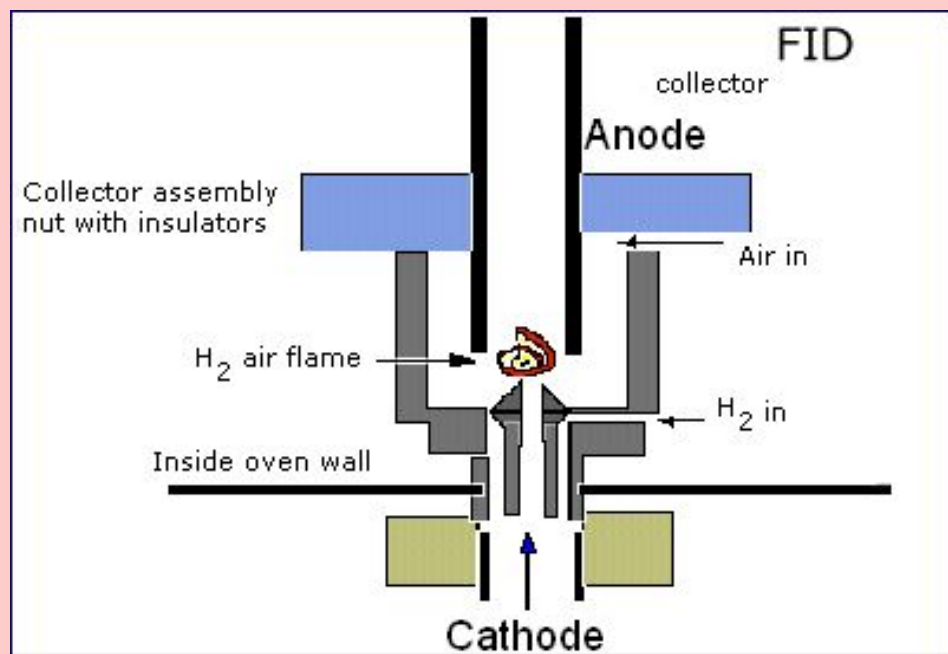
Система детектирования измеряет изменения физико-химических свойств выходящей из колонки смеси (компонент + газ-носитель) и преобразует в электрический сигнал. Величина сигнала зависит как от природы компонента, так и от содержания его в анализируемой смеси.

Критерии оценки детекторов:

- чувствительность, минимально детектируемая концентрация;
- уровень шума, дрейфа нулевой линии;
- диапазон линейности;
- эффективный объем и время отклика (быстродействие);
- селективность.

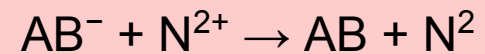
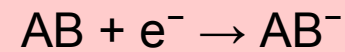
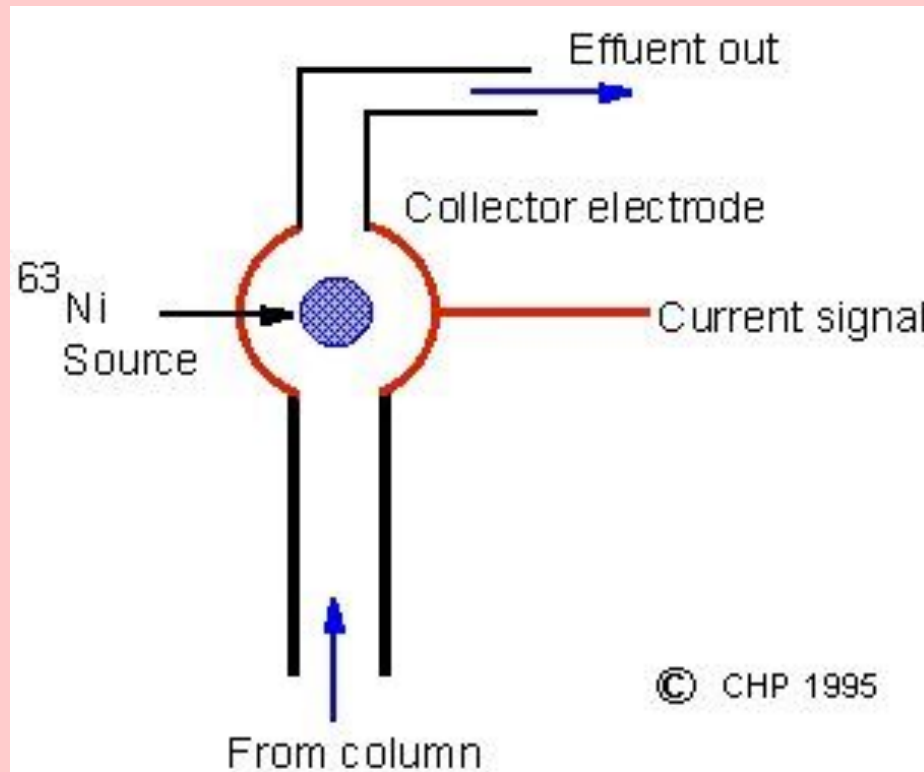
Детектор	Вещества	Селективность	Газ-носитель	Чувствительность	Линейный диапазон	Недостатки
Электронного захвата	Галоген-, азот-и кислородсодержащие	Высокоселективен	Ar, N ₂ +10%СН ₄ , He	10 ⁻¹² – 10 ⁻¹³ г 5 · 10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴ %	10 – 10 ²	Работа с разбавленными растворами; МДРТ для ЗН < 150°С; высокие требования к г-н; зависимость от скорости г-н и т-ры, применение в основном для качественного анализа.
Пламенно-ионизационный	Органические	Универсальный	He, N ₂ , N ₂	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.
Термоионный	Фосфор-, серу-и азотсодержащие	Селективен	He, N ₂	10 ⁻¹² г 10 ⁻⁶ %	10 ³ – 10 ⁴	Необходимость калибровки.
Пламенно-Фотометрический	Серу-, фосфорсодержащие	Высокоселективен	He, N ₂	10 ⁻¹¹ г 10 ⁻⁶ – 10 ⁻² %	10 ² – 10 ³	
Теплопроводный (катарометр)	Органические, неорганические	Универсальный	He, N ₂	10 ⁻⁶ – 10 ⁻⁹ г 10 ⁻³ – 100%	10 ⁴	Чувствительность к температуре; используется только для некорродирующих веществ.

Схема пламенно-ионизационного детектора



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.

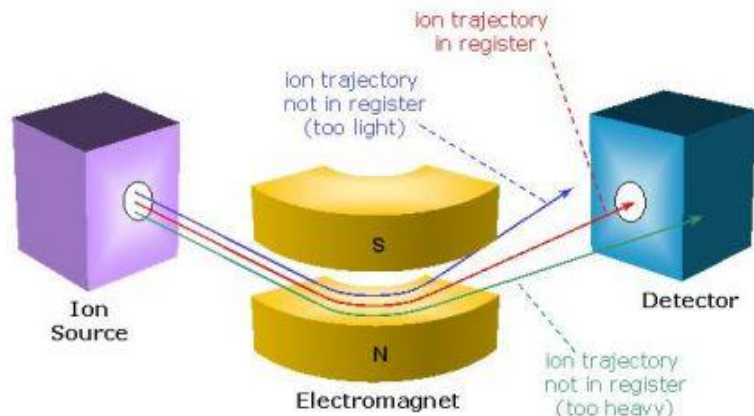
Схема детектора электронного захвата



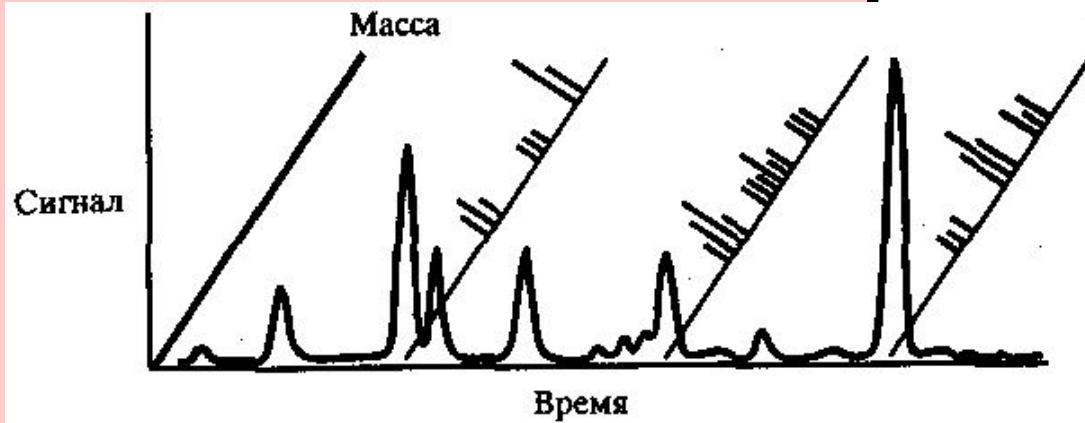
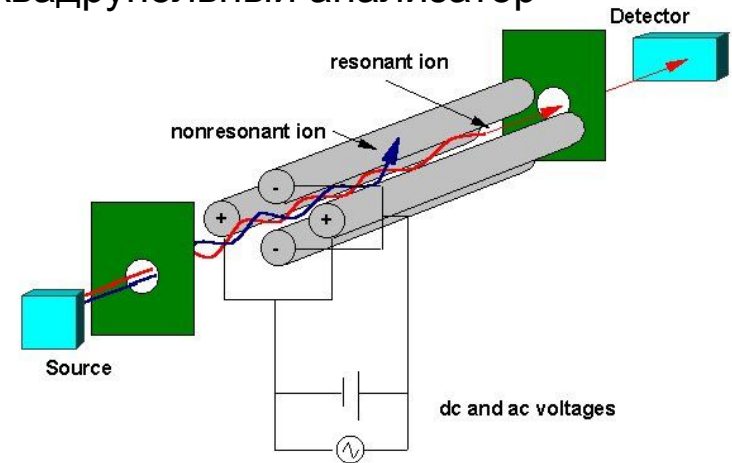
Радиоактивный источник испускает β -частицы, ионизирующие молекулы газа-носителя, с образованием ионов и тепловых электронов, которые формируют электрический ток в камере детектора. Принцип действия этого детектора основан на уменьшении проводимости, вызываемом захватом электронов веществом, содержащим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

Масс-спектрометрический детектор

магнитно-секторный анализатор



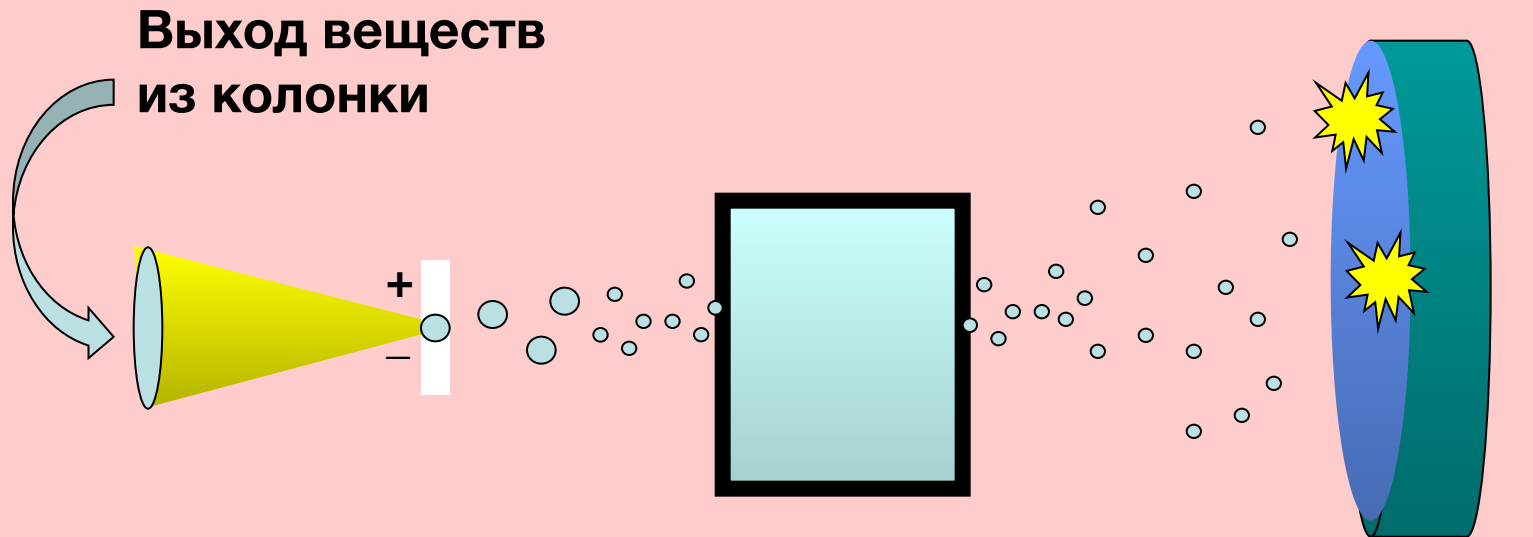
квадрупольный анализатор



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

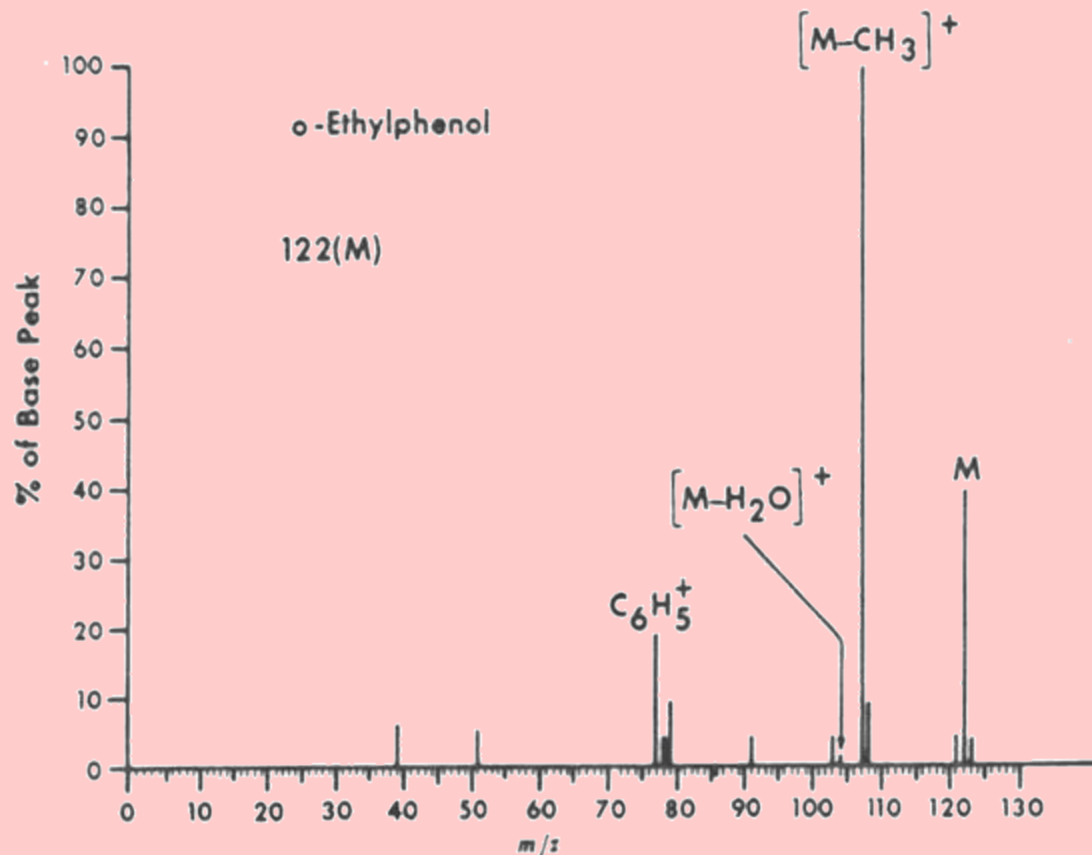
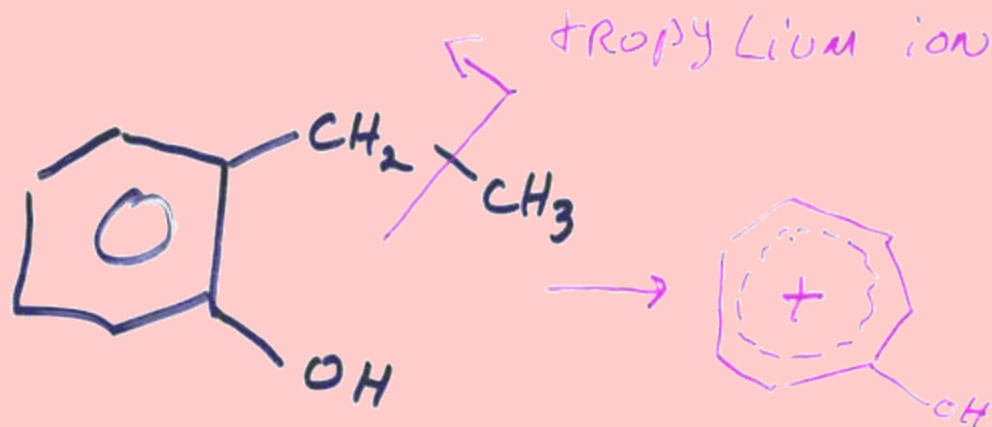
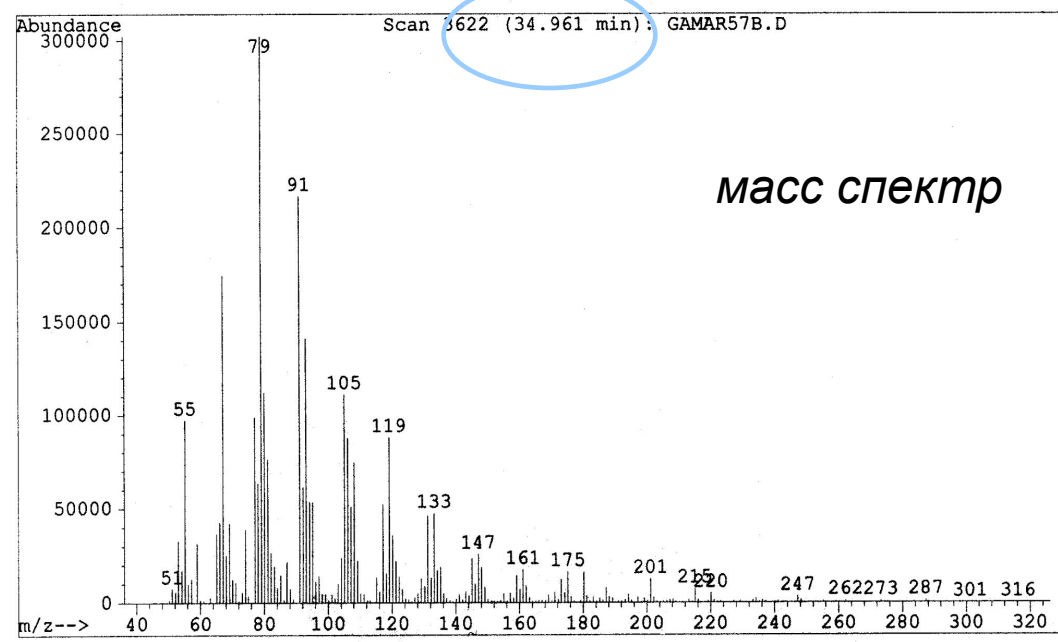
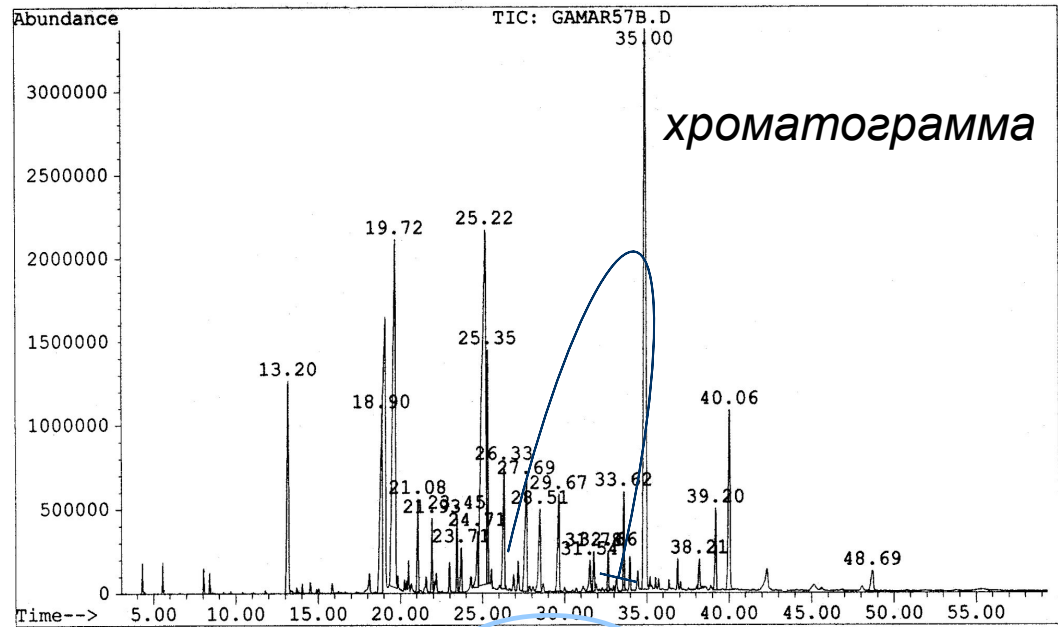


FIGURE 2.10. *o*-Ethylphenol.



Хроматомасс спек



хроматограмма

масс спектр

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 экстракция

Фильтрация

Центрифугирование

Выпаривание

Дериватизация

Очистка на колонках или в тонком слое



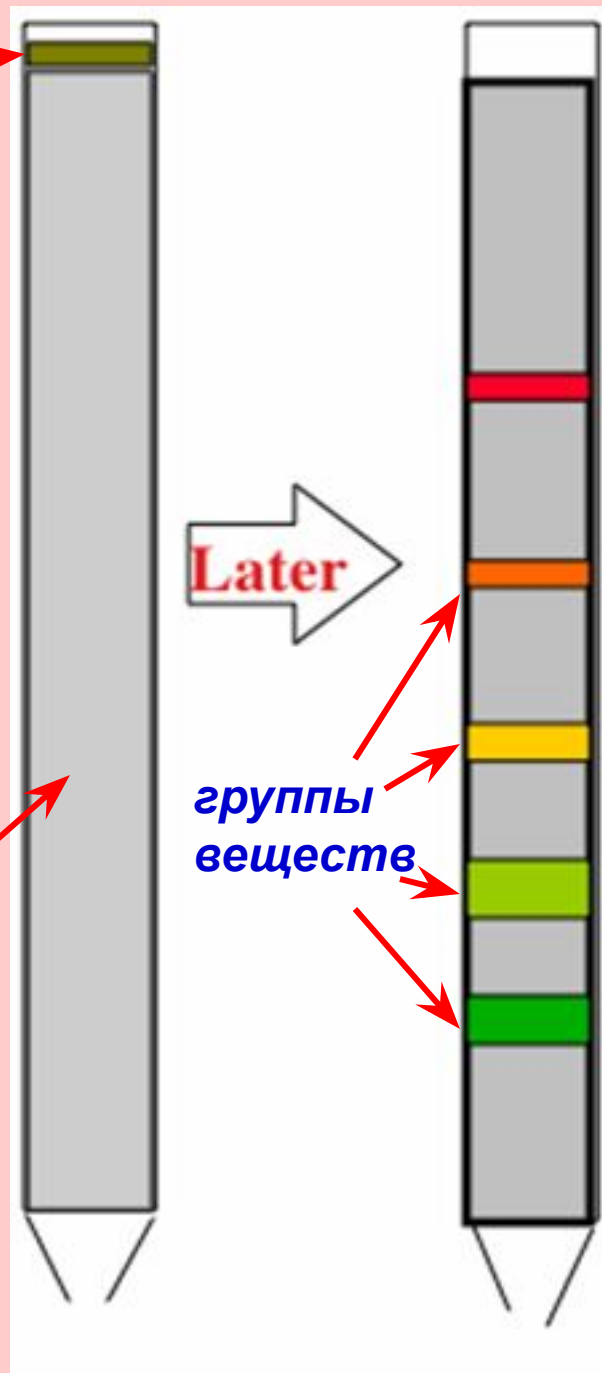
Для разделения и выделения групп веществ из сложных матриц применяется **колоночная и (или) тонкослойная хроматография**. Нужная группа элюируется, т.е. смывается с силикагеля, и далее используется для более подробного анализа газовой хроматографией.

смесь веществ

колодка

Later

группы веществ



Реакционная газовая хроматография

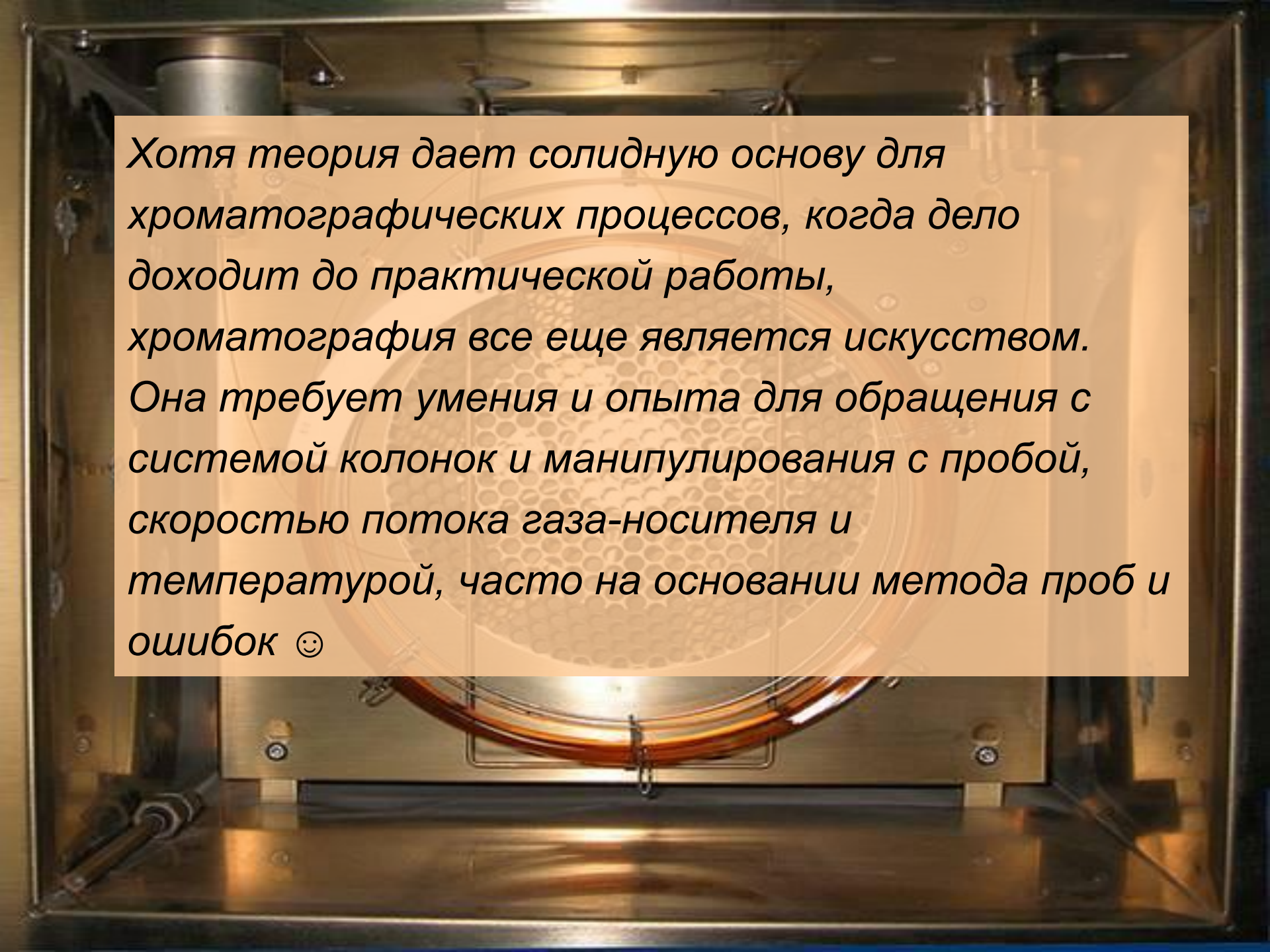
Это направленные химические превращения нелетучих соединений в летучие, а также неустойчивых в устойчивые для дальнейшего ГХ анализа.

Один из способов: получение сложных эфиров

На практике используют:

дiazометановый метод, $\text{RCOON} + \text{CH}_2\text{N}_2 \rightarrow \text{RCOONCH}_3 + \text{N}_2$,

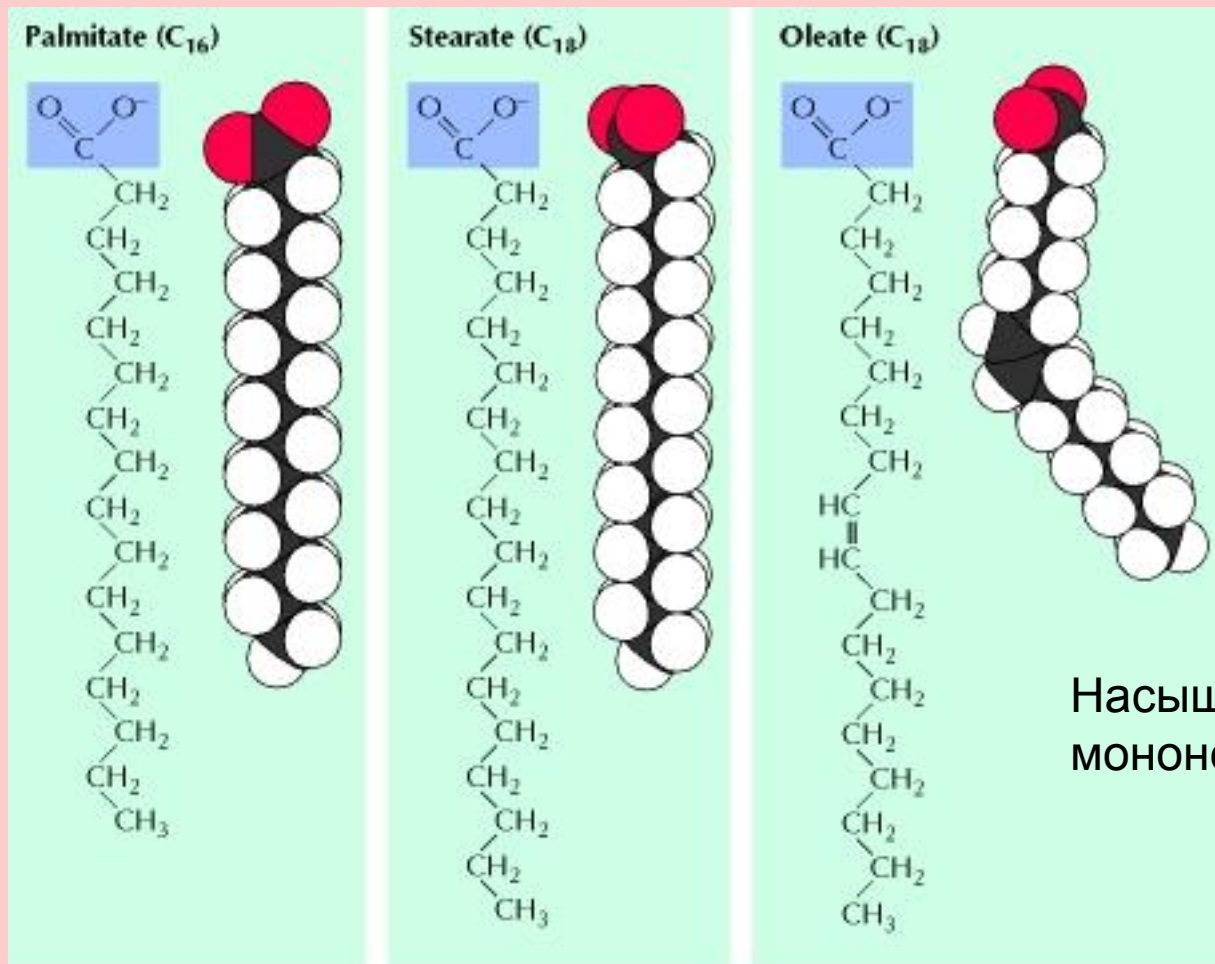
метанольный метод, $\text{RCOON} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{RCOONCH}_3$



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 😊

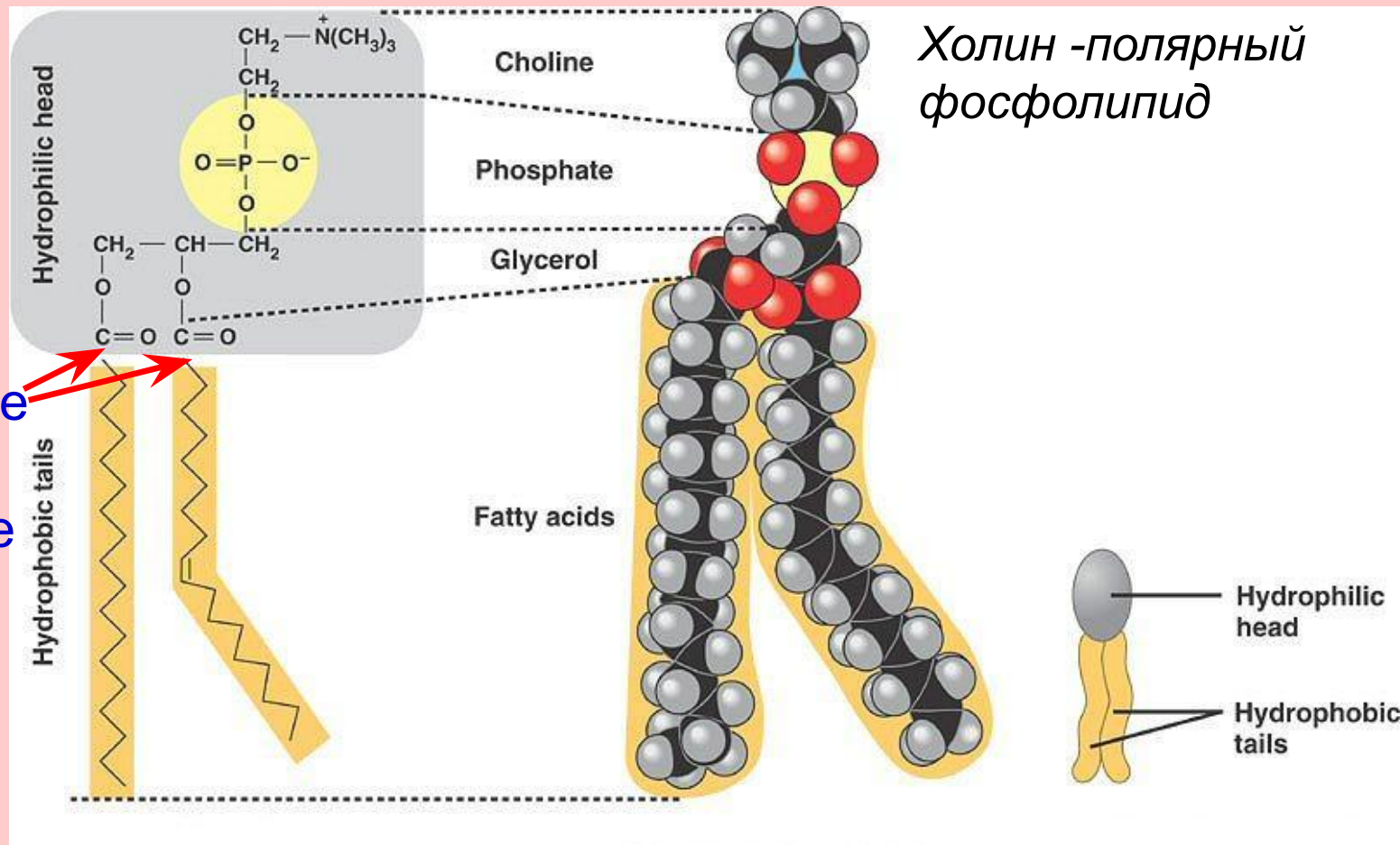
Исследуемые смеси:

метилловые эфиры жирных кислот



Насыщенные и
мононенасыщенные ЖК

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



Отщепление при метанолизе

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%

2. Моноеновые кислоты



олеиновая 18:1 ω 9

оливковое и салатное подсолнечное масло - 80%

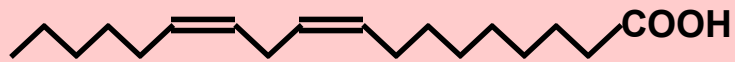
3. Насыщенные разветвленные кислоты



изопентадекановая i15:0

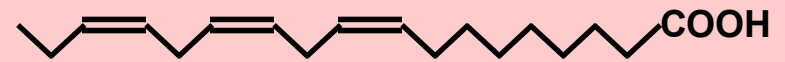
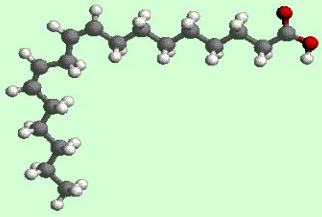
мембраны бактерий > 25%

4. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК)



линолевая

18:2 ω 6
подсолнечное, соевое,
кукурузное масло - 50-70%



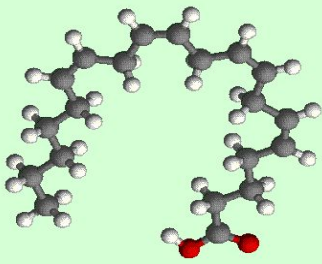
линоленовая

18:3 ω 3
льняное масло 40-60%



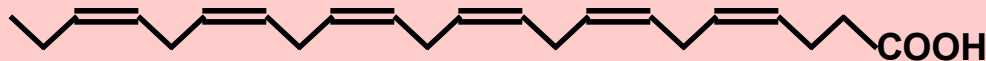
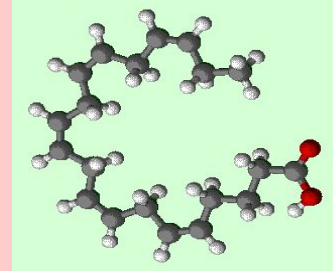
арахидоновая

20:4 ω 6
очень наземных животных



эйкозапентаеновая

20:5 ω 3
рыба, водные беспозвоночные



докозагексаеновая

22:6 ω 3
рыба, некоторые водоросли

