

АО «Медицинский университет Астана»

Газовая хроматография.

*Подготовила: Рахимова Л.
Проверила: Т.А. Арыстанова*

Астана 2016

План

- I.** Газовая хроматография
 - II.** Оборудование
 - Устройство ввода проб (инжекторы)
 - Колонки (подвижные и неподвижны фазы)
 - Детекторы
 - III.** Идентификация
 - IV.** Количественное определение
 - V.** Контроль примесей
 - VI.** Методика:
 - Коэффициент симметрии
 - Коэффициент разделения
 - Число теоретических тарелок
 - Коэффициент емкости
 - Отношение сигнал/шум
 - VII.** Достоинства и недостатки метода ГХ
 - VIII.** Область применения ГХ
 - IX.** Парофазная ГХ
 - X.** Оборудование
 - XI.** Методика
 - XII.** Условие хроматографического анализа
 - XIII.** Список литературы
-

Газовая хроматография (ГХ)

Газовая хроматография- это метод хроматографического разделения, основанный на разности распределения веществ между двумя несмешивающимися фазами, в котором газ-носитель, являющийся подвижной фазой, проходит через неподвижную фазу, находящуюся в колонке.

Метод применяется для анализа к летучим и другим веществ, которые можно перевести в газообразное состояние без разложения

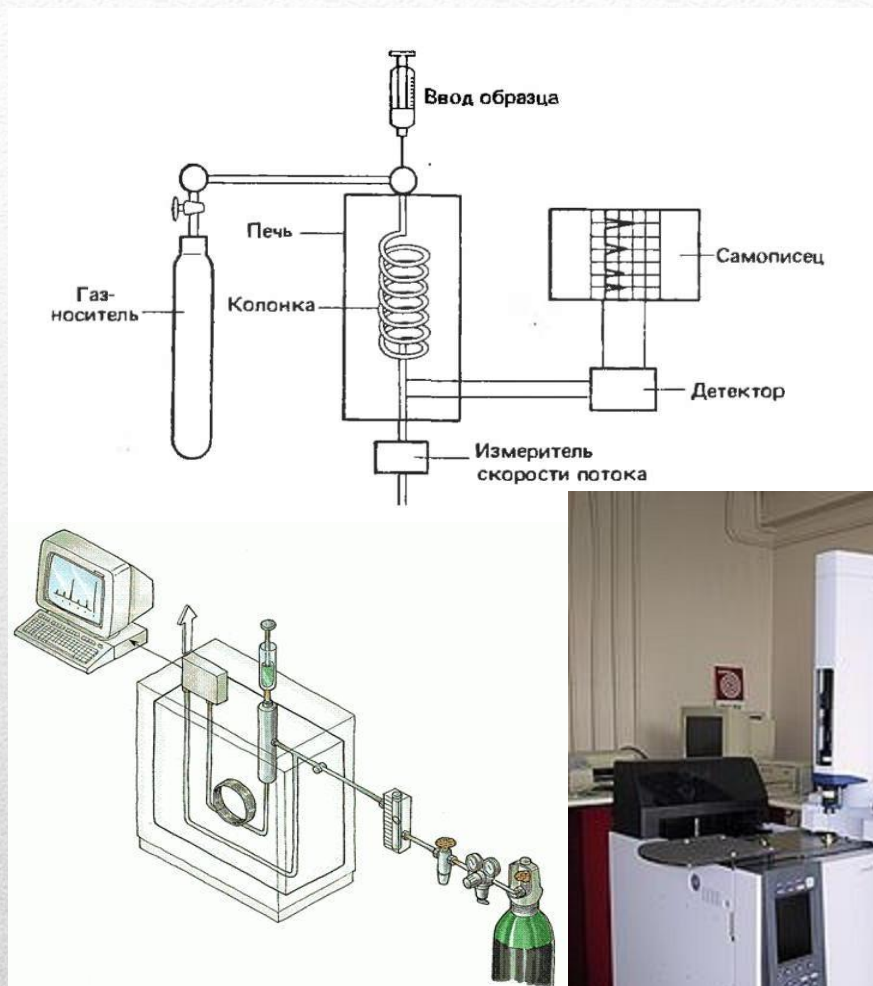


Газовая хроматография — один из многих видов хроматографии. Описанная впервые в 1952 г. она стала популярной благодаря:

- скорости и легкости, с которой могут быть проанализированы сложные смеси;
- очень малой требуемой пробы для анализа;
- гибкости и надежности используемого оборудования.

В фармацевтическом анализе ГХ используется для идентификации, количественного определения ЛС и контроля примесей

Хроматограф состоит из устройства ввода проб (инжектора) хроматографической колонки, помещенной в печь, детектора и регистрирующей системы (интегратора и самописца). Газ-носитель проходит с заданной скоростью через устройства ввода пробы, колонку, а затем через детектор. Определение проводят при постоянной температуре или в соответствии с заданной температурной программой.



Оборудование



Устройство ввода проб (инжекторы)

- Прямое введение растворов является обычным способом инъекции при отсутствии других указаний в частной статье. Пробу вводят с помощью шприца или инъекционного клапана либо непосредственно в верхнюю часть колонки, либо в испарительную камеру, снабженную распылителем.
 - Введение паровой фазы проводят с помощью статического или динамического устройства ввода проб
-

Динамические парофазные устройства ввода проб

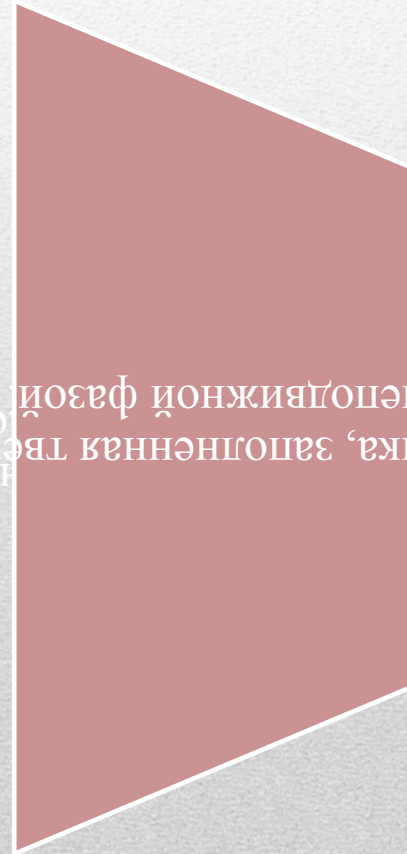
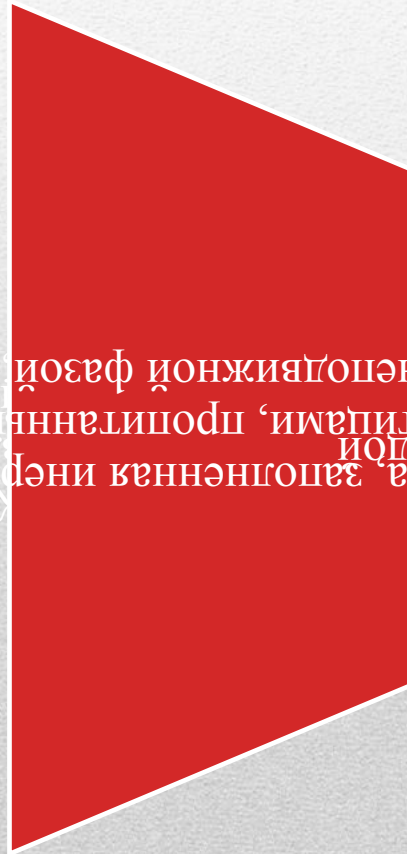
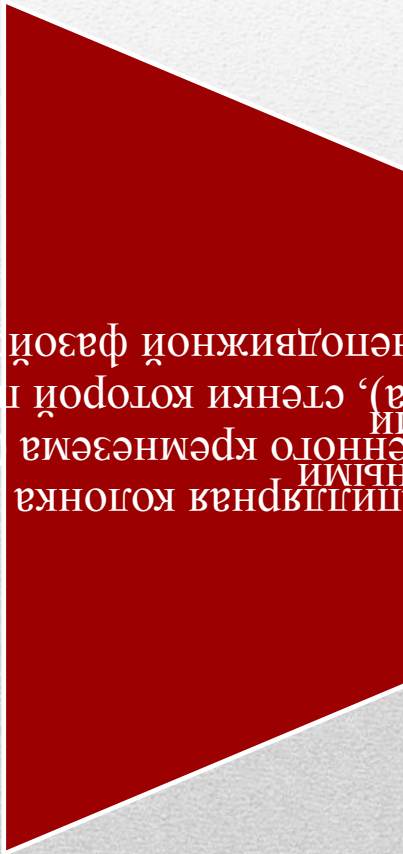
- (очиститель и ловушка) включают распылитель, с помощью которого летучие вещества продувают в колонку, которую выдерживают при низкой температуре. Затем удерживаемые адсорбентом вещества десорбируют в подвижную фазу путем его быстрого нагревания

Статические парофазные устройства ввода проб

- Включают пробоотборник, термостатирующую нагревательную камеру, в которой выдерживают определенное время закрытые флаконы, содержащие твердые или жидкие пробы, для установления равновесия между летучими компонентами проб и негезообразной, и паровой фазами. После установления равновесия заданное количество летучих компонентов во флаконах продувают в газовый хроматограф.
-

Неподвижные фазы

Типы колонок, заполняемые неподвижной фазой:



- Время удерживания и четкость пика зависит от скорости движения газа-носителя. Время удерживания прямо пропорционально длине волны колонки, а коэффициент разделения пропорционален корню квадратному от длины волны. Скорость газа-носителя через заполненную колонку обычно выражают в мкл в минуту при атмосферном давлении и комнатной температуре. Скорость потока измеряют на выходе детектора либо с помощью калиброванного механического устройства, либо клапанного устройства при рабочей температуре колонки. Линейная скорость газа-носителя через заполненную колонку обратно пропорциональна корню квадратному от внутреннего диаметра колонки для заданного протекающего объема.

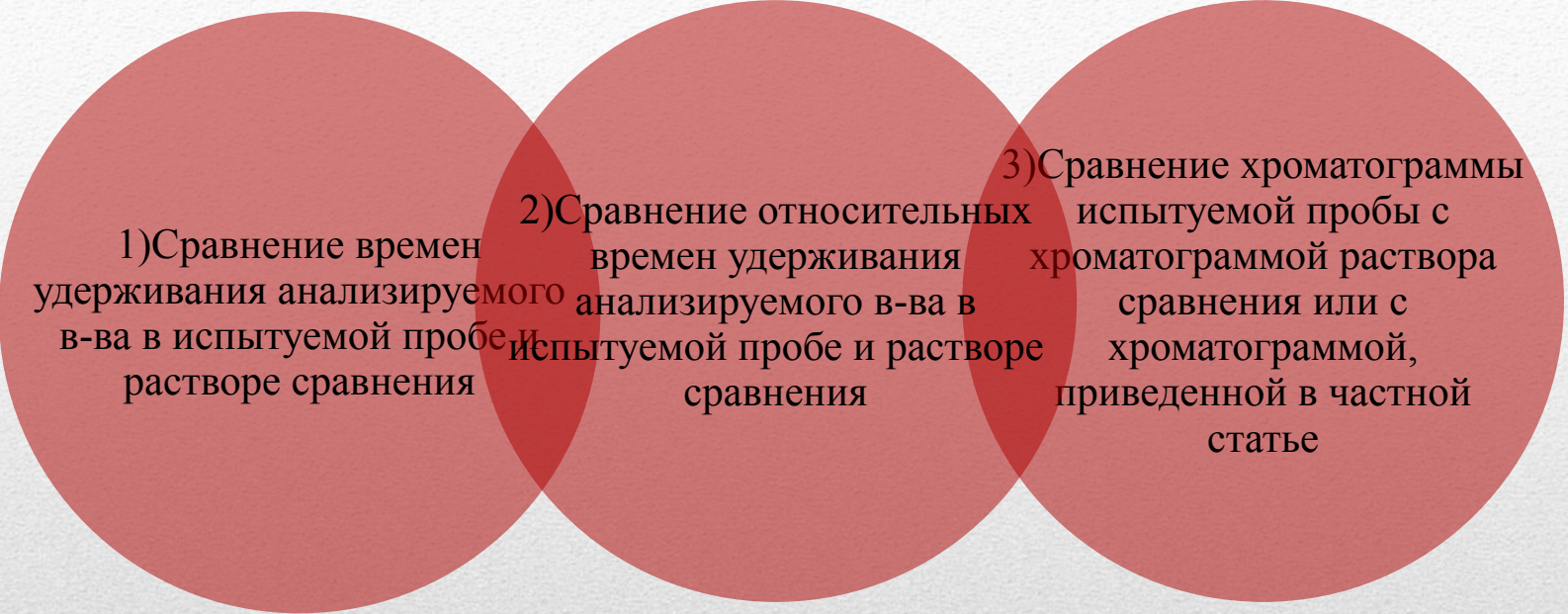
Для заполненных колонок в качестве газа носителя обычно используют гелий и азот, а для капиллярных колонок-азот, гелий и водород

Подвижные фазы

Детекторы:

Для детекции веществ обычно применяют пламенно-ионизационные детекторы. Допускается использование детекторов электронного захвата, азотно-фосфорных, масс-спектрометрических, по теплопроводности, инфракрасных спектрометрических с Фурье-преобразованием и др. в зависимости от цели анализа

Наименование детектора	Абре в.	Принцип работы	Классификация
По теплопроводности	ДТП	Регистрируется различие в теплопроводности анализируемого вещества и газа-носителя	Универсальный, неdestructивный, неионизационный
Пламенно-ионизационный	ДПИ	Образование и регистрация ионов при сгорании анализируемых веществ в пламени	Универсальный для соединений, содержащих С и Н, destructивный, ионизационный
Электронзахватный	ДЭЗ	Захват анализируемым веществом тепловых электронов, образованных при облучении β -частицами или высокоэнергетическими электронами газа-носителя	Селективный, неdestructивный, ионизационный
И К-спектрометр	ИКД	Поглощение света в ИК-области анализируемым веществом	Селективный, destructивный, неионизационный
Масс-спектрометр	МС	Образование молекулярных и фрагментарных ионов при электронном ударе или химической ионизации	Универсальный, destructивный, ионизационный

- 
- 1) Сравнение времен удерживания анализируемого в-ва в испытуемой пробе и в растворе сравнения
 - 2) Сравнение относительных времен удерживания анализируемого в-ва в испытуемой пробе и в растворе сравнения
 - 3) Сравнение хроматограммы испытуемой пробы с хроматограммой раствора сравнения или с хроматограммой, приведенной в частной статье

**Идентификацию проводят
одним из следующих способов**

Абсолютной калибровки

- для испытуемого р-ра и р-ра сравнения рассчитывают средние значения площадей или высот пиков анализируемого в-ва. По полученным средним значениям рассчитывают концентрацию анализируемого в-ва в испытуемом р-ре

Внутреннего стандарта

- для каждой хроматограммы рассчитывают отношение площади или высоты пика анализируемого в-ва к площади или высоте пика внутреннего стандарта. Полученные отношения усредняют для испытуемого р-ра и р-ра сравнения и по найденным средним значениям определяют концентрацию анализируемого в-ва в испытуемом р-ре

**Количественное определение
проводят двумя методами**

Контроль примесей

Для контроля примесей используют следующие подходы:

1) Количественное определение примеси с использованием раствора сравнения с известной концентрацией примеси (обычно в варианте абсолютной калибровки);

- 2) Способ внутренней нормализацией;

3) Сравнение с разбавленным раствором основного вещества;

- 4) Способ стандартных добавок.
-

Методика

- Колонку, устройство ввода проб и детектор уравнивают при температурах и скоростях потока газа до достижения устойчивого исходного состояния в соответствии с указаниями в частной статье. Готовят испытуемый раствор(ы) и раствор(ы) сравнения в соответствии с описанием в частной статье. Растворы не должны содержать твердых частиц. Используя растворы сравнения, настраивают прибор и подбирают объемы вводимых проб, которые позволяют получить необходимый сигнал. Выполняют повторные введения для проверки сходимости сигнала и проверяют при необходимости число теоретических тарелок.
- Вводят растворы и регистрируют результаты хроматографирования. Для проверки сходимости сигнала выполняют повторные введения. Определяют площади пиков анализируемых компонентов. В случае, если коэффициент симметрии, вычисленный, как описано ниже, имеет значение от 0.8 до 1.20, то допускается определение по высоте пиков. При использовании программирования температуры необходимо проводить определение по площадям пиков. При использовании внутреннего стандарта следует удостовериться, что ни один из пиков, относящихся к анализируемому веществу или его примеси, не маскируется пиком внутреннего стандарта. Из полученных значений вычисляют содержание анализируемого компонента или компонентов. Если указано в частной статье, процентное содержание одного или нескольких компонентов анализируемой пробы определяют посредством вычисления процентной доли площади соответствующего пика или пиков в суммарной площади всех пиков, исключая пики растворителей или добавленных реактивов (метод внутренней нормализации). В этих случаях рекомендуется использование широкодиапазонного усилителя и автоматического интегратора.

- Коэффициент симметрии пика может быть вычислен по формуле:
$$\frac{b_{0.05}}{2A}$$

где $b_{0.05}$ - ширина пика на одной двадцатой высоты пика; A - расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передней границей пика на одной двадцатой высоты пика.

Коэффициент симметрии

Коэффициент разделения (R_J) может быть вычислен по формуле:

$$R_s = \frac{1.18(t_{Rb} - t_{Ro})}{b_{0.5a} + b_{0.5b}}$$

$$t_{Rb} > t_{Ro}$$

Где,

t(R_b), t(R_o)- расстояния вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков, в миллиметрах;

b(0.5a), b(0.5b)-ширина пиков на половине их высоты в миллиметрах.

При отсутствии других указаний в частной статье результаты анализа считаются достоверными, если коэффициент разделения для измеряемых пиков на хроматограмме больше 1.0.

Коэффициент разделения

- Число теоретических тарелок (n) может быть вычислено из данных, полученных в изотермическом режиме, по формуле:

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{b_{0.5}} \right)^2$$

где $t(R)$ - расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого вещества, в миллиметрах;

$b(0.5)$ - ширина пика на половине высоты в миллиметрах.

Число теоретических тарелок

- Коэффициент емкости /k'(известный также как коэффициент распределения масс D) определяют как:

$$D_m = k' = \frac{KВНФ}{KВПФ} = k * \frac{V_s}{V_m}$$

где КВНФ - количество растворенного вещества в неподвижной фазе; КВПФ - количество растворенного вещества в подвижной фазе;

K - равновесный коэффициент распределения;

V - объем неподвижной фазы; V - объем подвижной фазы.

- Коэффициент емкости компонента может быть определен из данных хроматограммы по формуле:

$$D_m = k' = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}}$$

где t(R) - расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого компонента, β миллиметрах;

t(R')- расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика неудерживаемого компонента, в миллиметрах.

Коэффициент емкости

- Отношение сигнал/шум (S/N) вычисляют по формуле:

$$S / N = \frac{2H}{h_n}$$

где H - высота пика соответствующего компонента на хроматограмме, полученной для указанного раствора сравнения;

$h(n)$ - абсолютное значение наибольшей флуктуации шума базовой линии на хроматограмме холостого раствора, наблюдаемое на промежутке, равном двадцатикратной ширине на полувысоте пика на хроматограмме раствора сравнения, размещенном равномерно вокруг места расположения пика.

Отношение сигнал/шум

Достоинства

- Высокая разделительная способность: возможность разделять на компоненты смеси, состоящие более чем из 100 компонентов.
- Универсальность: разделение и анализ самых различных смесей – от низкокипящих газов до смесей жидких и твердых веществ с температурой кипения до 500 градусов Цельсия и выше.
- Высокая чувствительность: можно определять микропримеси с концентрацией до $10^{-10}\%$.
- Экспрессность: продолжительность разделения в большинстве случаев составляет 10-15 минут, при разделении многокомпонентных смесей 1-1,5 часа. В некоторых специальных случаях время разделения может быть меньше 1 минуты.
- Легкость аппаратного оформления: газовые хроматографы относительно дешевы, достаточно надежны.
- Малый размер пробы.
- Высокая точность анализа: погрешность измерений $\pm 5\%$.

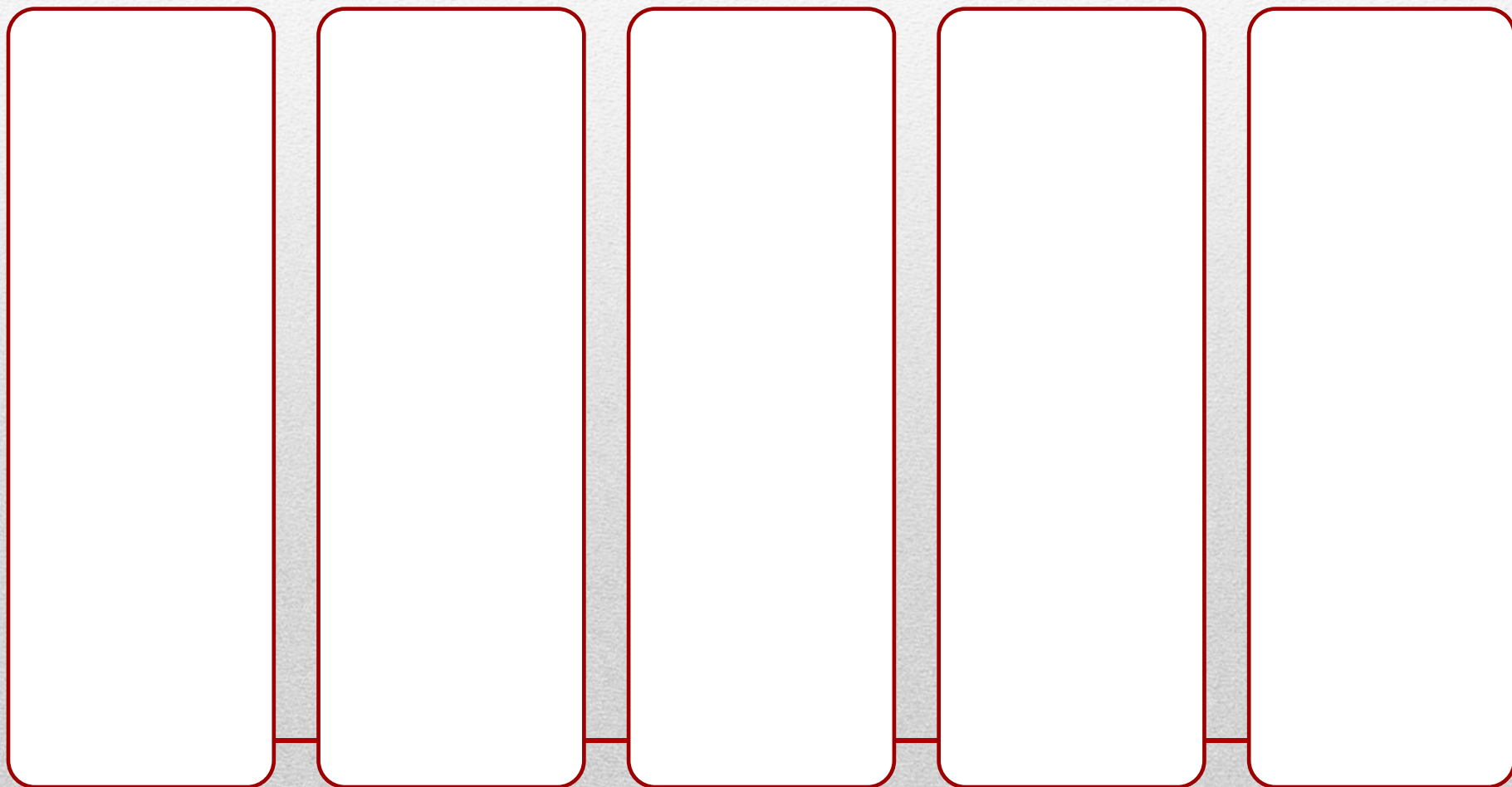
Недостатки

- невозможность разделения и анализа смесей нелетучих соединений;
- осложнения при разделении и анализе термически нестабильных соединений;
- невозможность разделения и анализа соединений, способных к диссоциации в анализируемых растворах (разделение ионов).

Достоинства и недостатки метода
ГХ

Область применения газовой хроматографии

Область применения газовой хроматографии (ГХ) довольно велика – от анализа простых газов до определения комплексов веществ в сложных матрицах.



Парофазная газовая хроматография является методом, наиболее подходящим для разделения и определения летучих соединений, которые присутствуют в твердых или жидких образцах. Метод основан на анализе паровой фазы, находящейся в равновесии с твердой или жидкой фазой.



Парофазная ГХ

- Оборудование состоит из газового хроматографа, снабженного устройством для ввода газовой фазы, находящейся над испытуемым образцом. Устройство ввода может быть подсоединено к блоку, автоматически контролирующему и регулирующие давление и температуру. При необходимости используют устройство для удаления растворителей.

Возможно использование других способов ввода газовой фазы в хроматографическую колонку.

Анализируемую пробу вводят в контейнер, снабженный подходящей пробкой и клапанной системой, которая регулирует прохождение газа-носителя. Контейнер помещают в термостатируемую камеру с температурой, устанавливаемой в соответствии со свойствами анализируемого образца.

Пробу выдерживают при заданной температуре в течение времени, достаточном для установления равновесия между твердой или жидкой фазой и газовой фазой.

В контейнер вводят газ-носитель и по истечении указанного времени открывают клапан, чтобы газ поступал в хроматографическую колонку, перенося с собой перешедшие в газовую фазу компоненты.

Оборудование

- **а) Метод прямой градуировки**

В одинаковые флаконы отдельно помещают анализируемую пробу и каждый из образцов сравнения, приготовленные, как указано в частной статье, избегая контакта между устройством для ввода проб и образцами.

Флаконы герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия газовую фазу хроматографируют в указанных условиях.

- **б) Метод стандартных добавок**

Равные объемы анализируемой пробы помещают в одинаковые указанные в частной статье флаконы. Во все флаконы, кроме одного, прибавляют указанные количества раствора сравнения, содержащего известную концентрацию анализируемого вещества, для получения ряда образцов, с равномерно увеличивающимися концентрациями этого вещества.

Флаконы герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия хроматографируют газовую фазу в указанных условиях.

Уравнение линейной зависимости рассчитывают методом наименьших квадратов. По полученному уравнению определяют концентрацию анализируемого вещества в испытуемой пробе.

- **с) Метод последовательных отборов**

Применение данного метода описывают в частной статье.

Методика

Условие хроматографического анализа

-размеры хроматографической колонки и материал, из которого она изготовлена;

-тип неподвижной фазы и ее количество;

-тип твердого носителя и размер его частиц;

-температуру колонки, испарителя и детектора;

-газ-носитель и его расход;

-тип детектора;

-необходимость использования автосамплера;

-коэффициент деления потока (для капиллярных колонок).

Если введение пробы осуществляется не в испаритель, а непосредственно в колонку, следует давать соответствующее указание в методике, приведенной в частной статье.

Литература

- Т.А. Арыстанова “Общая фармацевтическая химия”
 - ГФ РК
-