

Plynová chromatografie

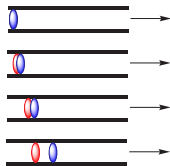
C5060 Metody chemického výzkumu

Jaromír Literák

Ústav chemie PŘF MU

22. září 2017

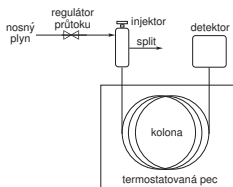
Chromatografie je skupina separačních metod, jejichž společným znakem je rozdělování molekul složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné rychlosti pohybu jednotlivých látek s mobilní fází v důsledku odlišné distribuce látek mezi mobilní a stacionární fázi.



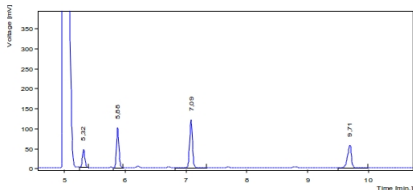
Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) je omezena tenzí par analyzovaných látek a jejich stabilitou za vyšších teplot (při teplotách do 400–450 °C). Odhaduje se, že lze pomocí GC analyzovat 10–20 % všech známých látek.

Plynový chromatograf

Nosný plyn = mobilní fáze; Split = dělič toku; GLC = gas-liquid chromatography; GSC = gas-solid chromatography

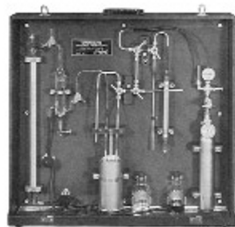
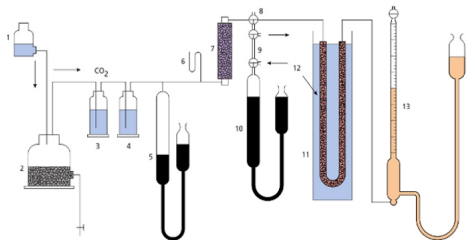


V počátcích plynové chromatografie s **náplňovými kolonami**, v současnosti dominují **kapilární kolony**.



Plynový chromatograf

První patentovaný plynový chromatograf sestavil v Brně v roce 1952 **prof. Jaroslav Janák** (nar. 1924).





Retenční charakteristiky látky

Retenční čas t_r – celkový čas, který analyt stráví v chromatografické koloně.

Mrtvý čas kolony t_m – t_r látky, která není v koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

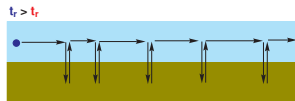
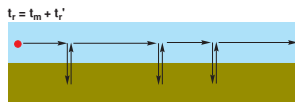
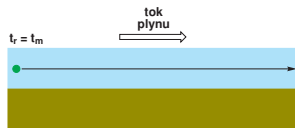
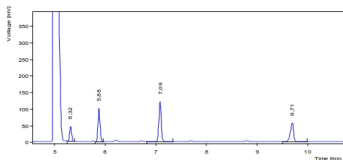
Redukovaný retenční čas t'_r

$$t_r = t_m + t'_r$$

Kapacitní poměr k

$$k_i = \frac{n_{stac}}{n_{mob}} = \frac{t'_r}{t_m}$$

kde n_{stac} a n_{mob} jsou rovnovážná látková množství látky ve stacionární a mobilní fázi.



Kapacitní poměr k je přímo úměrný **distribuční konstantě** K_D látky mezi danou stacionární a mobilní fází.

$$K_D = \frac{c_{stac}}{c_{mob}} = \frac{n_{stac}}{n_{mob}} \times \frac{V_{mob}}{V_{stac}} = k \times \frac{V_{mob}}{V_{stac}}$$

kde c_{stac} a c_{mob} jsou rovnovážné koncentrace dané látky ve stacionární a mobilní fázi, V_{stac} a V_{mob} jsou objemy mobilní a stacionární fáze.

Rozlišení (R):

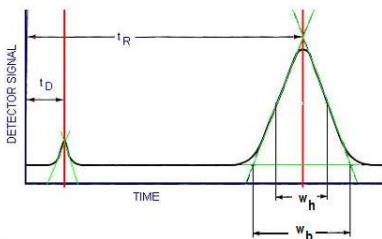
$$R = 2 \times \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,18 \times \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

kde

t_r – retenční čas píku

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky (v jednotkách času)

w_b – šířka píku u základny (v jednotkách času)



Rozlišení je funkcí termodynamických i kinetických faktorů, závisí na **počtu teoretických pater N** a **separačním faktoru α** (kapacitním poměru).

Separační faktor α pro látky i a j :

$$\alpha = \frac{k_i}{k_j}$$

$$k_i > k_j$$

Počet teoretických pater kolony (N):

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2$$

kde t_r je retenční čas píku a w_h – šířka píku v polovině jeho výšky (v jednotkách času).

Počet teoretických pater je ovlivněn retencí látek, N je vyšší pro dříve eluující látky. Závisí také na teplotě. Pro výpočet N se užívají látky s $k > 5$.

Výškový ekvivalent teoretického patra (H nebo také $HETP$):

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

kde

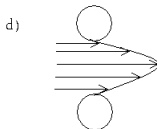
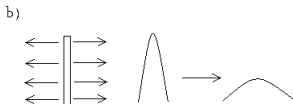
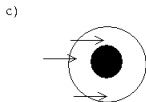
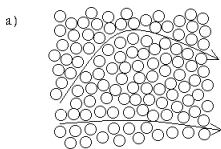
L – délka kolony

N – počet teoretických pater

Mechanismy rozšiřování zón analytu na chromatografické koloně.

Hlavní mechanismy rozšiřování zón analytu na chromatografické koloně.

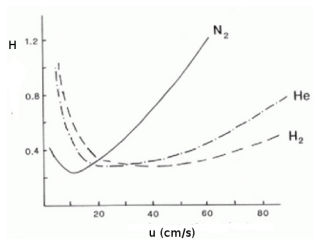
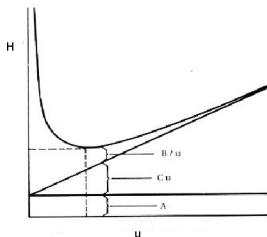
- Vířivá difúze
- Podélná molekulární difúze
- Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi
- Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi



van Deemterova rovnice

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

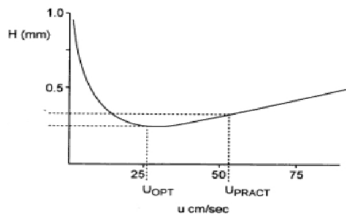
kde u zastupuje lineární rychlost pohybu mobilní fáze, konstanta A zastupuje vířivou difúzi, B podélnou difúzi a C odpor proti přenosu hmoty jak ve stacionární tak i mobilní fázi.



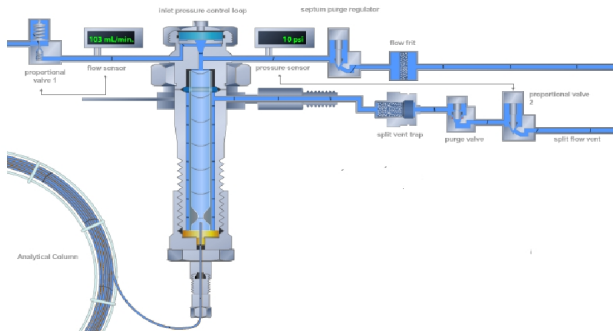
V kapilárních kolonách je málo významná vířivá difúze → **Golayova rovnice**.

- **Optimální rychlost průtoku mobilní fáze u_{opt}** odpovídá minimu na křivce van Deemterovy závoslosti a zaručuje maximální rozlišení.
- **Praktická optimální rychlost průtoku mobilní fáze u_{pract}** – kompromis mezi optimálním rozlišením a rychlostí analýzy.

$$u_{pract} = 1,5 - 2,0 \times u_{opt}$$



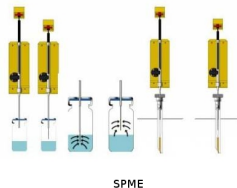
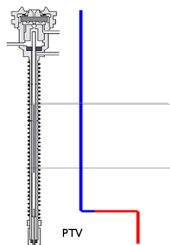
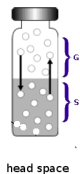
Plynový chromatograf – Inlet



- Nástřik se splitem / bez splitu
- Nástřik na kolonu

Plynový chromatograf – Inlet

- Head Space analýza
- PTV – Programmed Temperature Vaporising
- SPME – Solid Phase Micro Extraction



Plynový chromatograf – Split

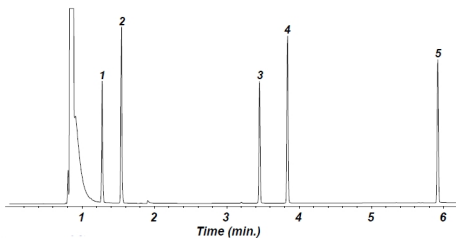
- **Nástřik bez splitu** (splitless) – stopová analýza. Split aktivován určitou dobu po nástřiku.
- **Nástřik se splitem** – vhodné pro koncentrované vzorky.
- **Splitovací poměr** – poměr toku splitovacím ventilem a kolonou.

Doporučené splitovací poměry:

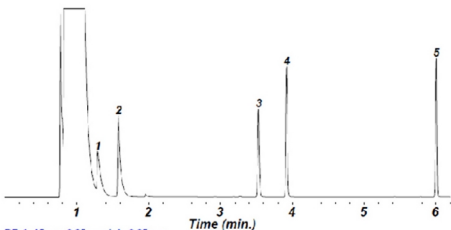
Vnitřní průměr kolony / mm	Splitovací poměr
0,10	1:50–1:75
0,19–0,25	1:10–1:20
0,32	1:8–1:15
0,53	1:2–1:5

Vliv splitovacího poměru

50:1 Split Ratio

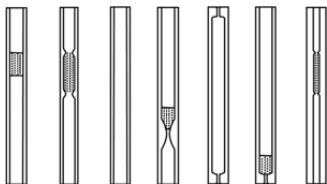


5:1 Split Ratio

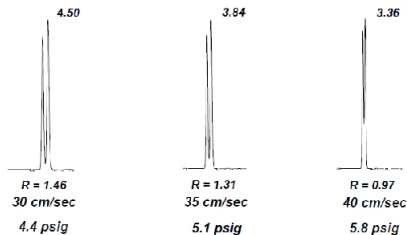


DB-1, 15 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m
60°C for 1 min, 60-180°C at 20°/min; Helium at 30 cm/sec
1. n-heptane 2. toluene 3. n-decane 4. n-butylbenzene 5. n-tridecane

- **Objem nástřiku** – Obvykle 1–3 μl , zplyněný vzorek by měl zaplnit max. 75 % objemu lineru (backflash problém!). Neexistuje přímá úměra mezi nastříkaným objemem a plochou píku.
- **Teplota inletu** – Dostatečná pro evaporaci vzorku, obvykle 200–300 °C.
- **Typ lineru** – Podle způsobu nástřiku.



- Výrazný vliv má **typ nosného plynu** a jeho **průtok**.

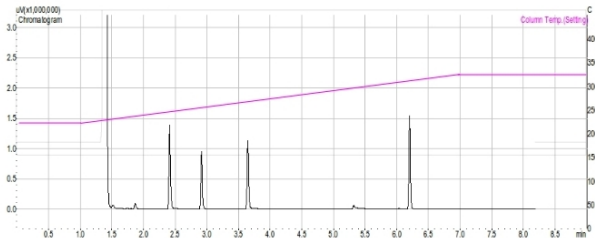


DB-1, 15 m x 0.32 mm ID, 0.25 μ m
60°C isothermal
1,3- and 1,4-Dichlorobenzene

Nosný plyn	Výhody	Nevýhody
Vodík	Levný, účinné dělení	Explozivní
Dusík	Levný	Horší dělení látek
Helium	Účinné dělení, nehořlavý	Drahý

Teplotní program pece

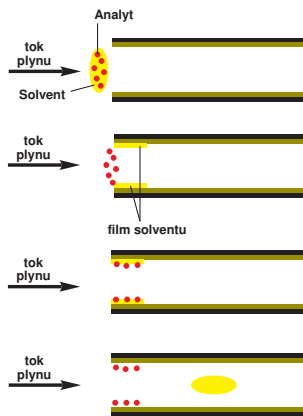
- Podstatný faktor ovlivňující kvalitu rozdělení látek a délku analýzy.
- Teplotní gradient je užitečný při dělení látek výrazně se lišících těkavostí nebo silou specifických interakcí se stacionární fází.



- Separaci látek lze zlepšit **zvýšením rozdílu v t_r** (změna teploty a K_D) a také **zúžením píků** (změna rozměrů kolony, rychlost průtoku nosného plynu).

Refokusování vzorku

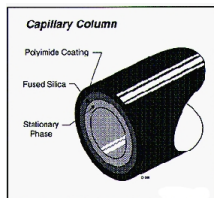
- Technika užívaná ke zúžení šířky píků, obzvláště při splitless nástřiku a těkavých analytech.
- Počáteční teplota kolony je o $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ nižší, než teplota varu rozpouštědla.
- Podobného efektu dosáhneme, pokud je počáteční teplota kolony min. o $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ nižší, než teplota varu analytů.



Stacionární fáze

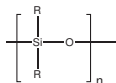
Kapilární GC kolony

Vnitřní průměr / mm	Označení
0,10	Minibore
0,19–0,25	Narrow
0,32	Wide
0,45	High speed megabore
0,53	Megabore

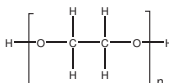


Složení stacionární fáze

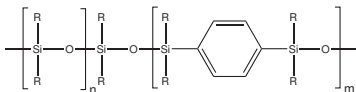
- Zesíťované (crosslinked) a vázané (bonded) stacionární fáze
- Low bleed columns



Polysiloxany



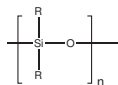
Polyethylenglykol (PEG)



Siarlyeny
(low bleed "MS" columns)

Základní druhy interakce analytu se stacionární fází:

- Disperzní síly (van der Waalsovy síly)
- Interakce dipólů molekul
- Vodíkové vazby



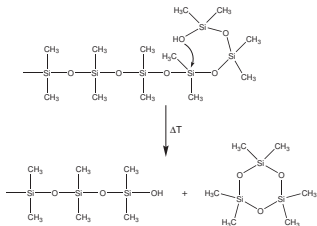
Polysiloxany

R	Druh interakce		
	Dispezní	Dipolární	Vodíkové můstky
Methyl	Silné	Žádné	Žádné
Fenyl	Silné	Slabé	Slabé
Kyanopropyl	Silné	Velmi silné	Slabé
Trifluormethyl	Silné	Dobré	Slabé
PEG	Silné	Silné	Dobré

- S tloušťkou vrstvy stacionární fáze roste kapacita a účinnost dělení.

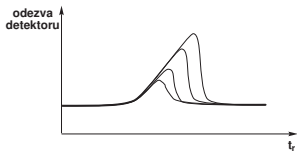
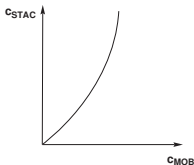
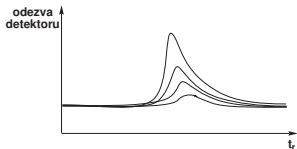
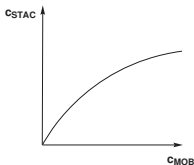
Povaha stacionární fáze

- Běžně se užívají **nepolární stacionární fáze**, u nichž převládají disperzní interakce – pořadí eluce látek odpovídá jejich těkavosti (tenzi par). Tyto fáze jsou také chemicky stabilnější.
- V případě obtížného dělení látek volíme mobilní fázi podle zásady *similia similibus solvuntur*.
- Chemické poškození stacionární fáze:
 - Kyslík
 - Silné anorganické kyseliny (HCl, HBr, H₂SO₄, HNO₃), báze (NH₃) a organické kyseliny (CF₃COOH)
- Tepelné poškození stacionární fáze
- Poškozený řetězec polysiloxany může depolymerovat:



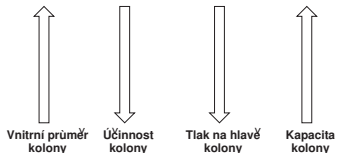
Povaha stacionární fáze

- GC v tomto uspořádání je příkladem **rozdělovací chromatografie**, každá látka je charakterizována **distribuční konstantou** mezi mobilní a stacionární fází K_D .
- V případě, že K_D nezávisí na koncentraci, je distribuční isoterma lineární a pík má ideální zvonovitý tvar.
- Nelineární isotermy:

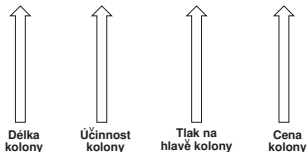


Vliv délky a vnitřního průměru kolony

Vliv **vnitřního průměru** kolony:

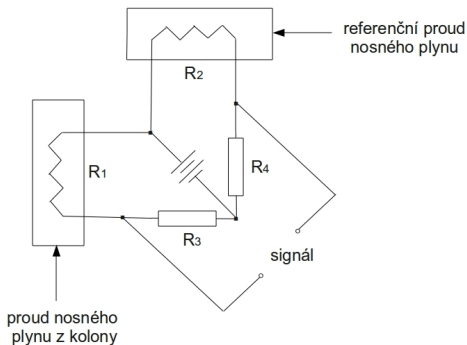


Vliv **délky** kolony:



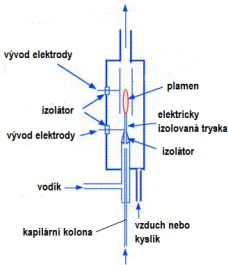
Teplotně vodivostní detektor

Teplotně vodivostní detektor (TCD, katharometr) – Detektor obsahuje zahříváné odporové vlákno, které se ochlazuje protékajícím plynem, čímž se mění jeho elektrický odpor. V praxi se vedle sebe zapojují dva TCD detektory, do jedné z měrných cel se přivádí čistý nosný plyn, do druhé plyn vycházející z kolony. Relativně málo citlivý typ detektoru.



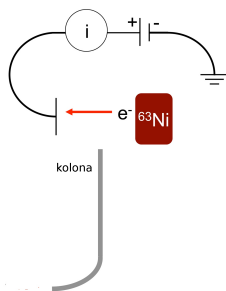
Plamenově ionizační detektor

Plamenově ionizační detektor (FID) – Plyn z chromatografické kolony je zaváděn do kyslíko-vodíkového plamene, kde probíhají během hoření ionizační reakce vedoucí ke vzniku iontů, které se detekují na polarizovaných elektrodách. Proudové pozadí je mezi 10^{-13} a 10^{-14} A, zatímco proud generovaný po spálení analytů je v rozmezí 10^{-12} – 10^{-6} A. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky, pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule. Odezvu nedává většina anorganických plynů a par a některé organické látky (formaldehyd, CCl_4).



Detektor elektronového záchytu

Detektor elektronového záchytu (ECD) – Selektivní detektor vysoce citlivý na elektronegativní atomy a skupiny, zejména na halogeny. Nosný plyn (dusík) je vlivem β záření v detektoru ionizován, čímž vzniká konstantní proud. Zdrojem β záření jsou ^3H nebo ^{63}Ni . Elektronegativní atomy v analytu zachycují pomalé elektrony, čímž dochází ke snížení ionizačního proudu.

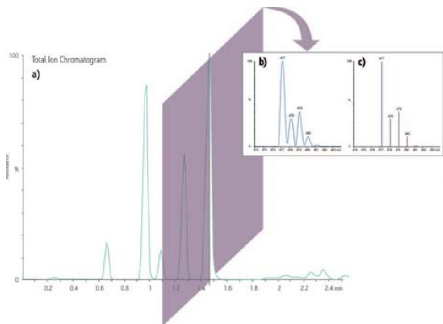


Hmotnostní detektor

Jako detektor v plynové chromatografii může sloužit **hmotnostní spektrometr** (MS), který poskytuje vedle chromatogramu hmotnostní spektra analytů. Existuje několik typů MS, používají se také jejich kombinace (MS/MS).

Hmotnost iontů vyjadřována jako **m/z**.

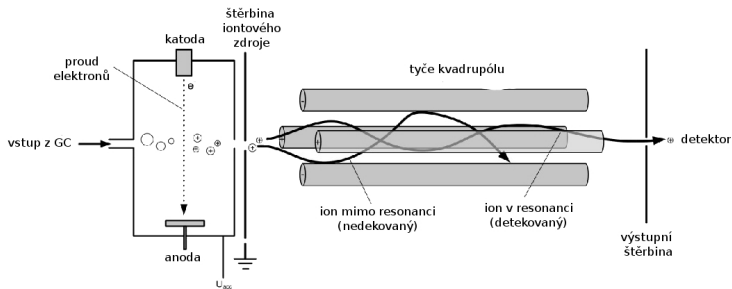
- Sektorový hmotnostní spektrometr
- TOF (Time of flight)
- Kvadrupólový hmotnostní spektrometr
- Iontová past
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová resonance



Hmotnostní detektor

- Většina GC-MS technik využívá **elektronovou ionizaci** nebo **chemickou ionizaci**.
- Průtok mobilní fáze omezen požadavkem na vysoké vakuum v MS.

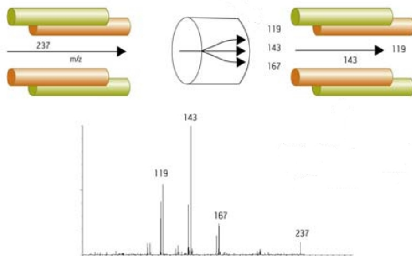
př.: hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým hmotnostním filtrem a elektronovou ionizací:



Hmotnostní detektor

- MS jako detektor může pracovat v režimu **scanu** – měří hmotnostní spektrum v zadaném rozmezí hmot, nebo jsou sledovány pouze **vybrané ionty** (SIM/SIR).
- Spektrometry s vysokým rozlišením umožňují stanovit sumární vzorec.
- Možnost MS/MS.

př.: hmotnostní spektrometr s dvěma kvadrupólovými hmotnostními filtry:



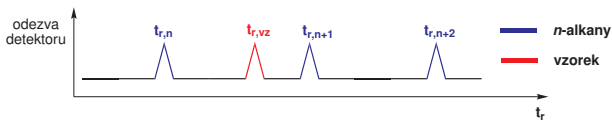
Kvalitativní analýza – retenční indexy

Při kvalitativní analýze se identifikace analytu provádí na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Za stejných experimentálních podmínek je charakteristikou látky její **retenční čas** t_r , respektive **retenční objem** V_r , což je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci chromatografické kolony.

Univerzálnější charakteristikou je **kapacitní poměr** dané látky.

Retenční indexy (Kováčovské indexy)

Přepočítání retenčního času (objemu) neznámé látky na index, jehož hodnota **nezávisí na chromatografickém systému** a lze jej tabelovat a srovnávat. Retenční chování vztahujeme na řadu n -alkanů:



Kvalitativní analýza – retenční indexy

Retenční index referenčních n -alkanů se vypočítá jako stonásobek počtu uhlíku v molekule daného n -alkanu; např. retenční index propanu je 300. Při **isotermní analýze** získáme retenční index látky nacházející se mezi dvěma nejbližšími homology n -alkanů o počtu atomů uhlíku n a $(n+1)$:

$$RI = 100 \times n + 100 \times \frac{\log(t'_{r,vz}) - \log(t'_{r,n})}{\log(t'_{r,n+1}) - \log(t'_{r,n})}$$

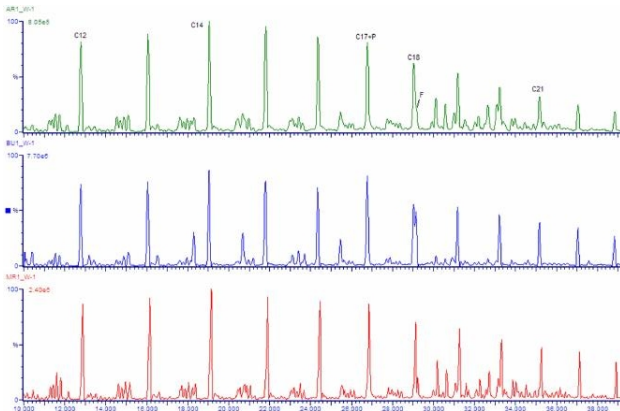
kde t'_r jsou příslušné redukované retenční časy a n je počet atomů uhlíku v molekule lehčího n -alkanu.

Při **analýze s teplotním programem** získáme retenční index vzorku z rovnice:

$$RI = 100 \times n + 100 \times \frac{t'_{r,vz} - t'_{r,n}}{t'_{r,n+1} - t'_{r,n}}$$

Fingerprinting

Užitečné v případě, kdy nesledujeme určení identity neznámé látky, ale jde nám o určení identity a původu směsi látek. Typickým příkladem jsou směsi uhlovodíků ropného původu. Uplatní se metoda otisku palce, „fingerprint“, kdy se srovnává profilové složení vzorku s referenčními směsmi, podle kterého se dá usoudit na původ vzorku.



Plocha pod píkem látky je přímo úměrná množství látky. Koeficient úměry (response factor) se liší pro různé látky.

- **Metoda vnitřní normalizace.**
- **Metoda standardního přídávku** – ke vzorku se přidává známé množství stanovované látky. Z plochy analytu ve vzorku s a bez přídávku lze vypočítat koncentraci.
- **Absolutní kalibrace** – pro přesnost je kritický objem nástřiku. Kalibrační přímka:

$$A_i = k_i \times c_i + b$$

kde A_i je plocha signálu analytu i, c_i je koncentrace analytu i, k_i je response factor a b konstanta.

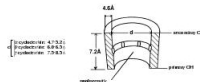
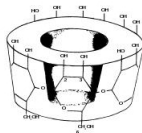
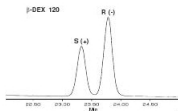
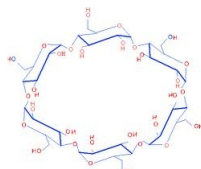
- **Metoda vnitřního standardu** – ke vzorku se přidává známé množství vnitřního standardu. Kalibrační přímka:

$$\frac{A_i}{A_{istd}} = k_i \times \frac{c_i}{c_{istd}} + b$$

kde A_i je plocha signálu analytu i , A_{istd} je plocha signálu vnitřního standardu, c_i je koncentrace analytu i , c_{istd} je koncentrace vnitřního standardu, k_i je response factor a b konstanta.

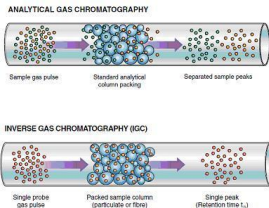
Separace enantiomerů

- Stacionární fáze modifikovaná chirálními látkami (deriváty cyklodextrinů).
- Důležitá je **entropická stránka** interakce mezi analytem a stacionární fází → nejlépe isothermní separace, optimalizace teploty.



Inverzní chromatografie

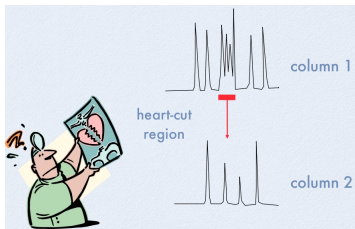
- Obvykle varianta GSC – adsorpční chromatografie.
- Podobné instrumentální provedení jako analytická GC, cílem však není rozdělit směs látek, ale na základě retenčních charakteristik známé látky vnesené do proudu nosného plynu charakterizovat povrch stacionární fáze.
- Detektorem TCD, FID, ECD, MS.
- Charakterizace povrchů materiálů, charakterizace polymorfů krystalických látek. Identifikace kyselých, bazických nebo polárních skupin na povrchu.



Dvoudimenzionální GC

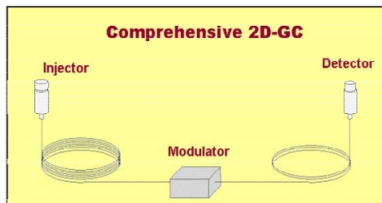
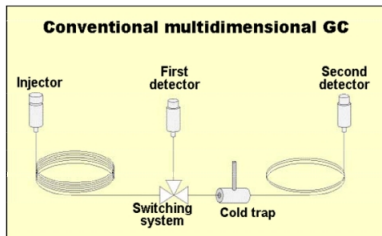
- Současné kapilární kolony mají okolo 100.000 teoretických pater a jsou blízko hranic svých možností.
- Dvoudimenzionální GC – **obracení průtoku** mobilní fáze nebo **využití dvou kolon**.
- Zvýšení **kapacity** – počtu látek ve směsi, které chromatograf je schopen rozdělit. Teoreticky je celková kapacita součinem kapacit v jedné a druhé dimenzi.

- Potřeba separace složitých směsí (přírodní látky, environmentální vzorky, petrochemické produkty).
- Možnost výrazně zlepšit separaci látek s využitím dvou běžných chromatografických kolon s odlišnými fázemi.
- **Heartcutting** (cut and transfer)



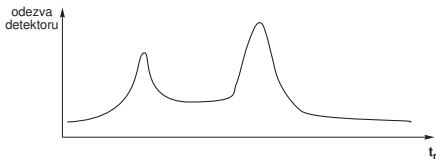
Dvoudimenzionální GC

Comprehensive 2D GC – každý z píků v jedné dimenzi je přenesen samostatně na druhou kolonu.



Derivatizace – úprava vlastností látek tak, aby je bylo možné stanovit pomocí GC. Problematické jsou:

- Nízká volatilita sloučenin (skupiny $-OH$, $-NH-$, $-SH$, $-COOH$).
- Vysoká volatilita.
- Deformovaný tvar píku, špatná separace látek, nízká citlivost detektoru.
- Adsorpce látek na aktivních površích uvnitř chromatografu.
- Nízká tepelná stabilita.

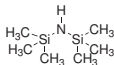


Někdy je potřeba také deaktivovat povrchy uvnitř chromatografu, např. liner a skleněnou vatu v lineru.

Silylace – zavedení $-\text{SiR}_3$ skupiny na nukleofilní atomy.



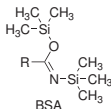
Silylační činidla jsou citlivá na vlhkost. Příklad silylačních činidel:



HMDSA



TMSC



BSA



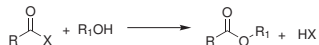
TMSI

Zbytky silylačních činidel mohou poškodit některé typy stacionárních fází (PEG). Vzorek také může obsahovat $\text{R}_3\text{Si-O-SiR}_3$ (produkt hydrolyzy silylačního činidla).

Silylace Si-OH skupin na povrchy skla – jeho **deaktivace**.

Acylace – zavedení $-C(O)R$ skupiny na nukleofilní atomy. Produkty acylace jsou obvykle odojnější vůči hydrolyze než produkty silylace. Deriváty obsahující zbytek halogenované kyseliny zvyšují citlivost ECD detektoru.

Reakce s anhydridy nebo halogenidy kyselin – reakcí vzniká kyselina, kterou je potřeba před stanovením odstranit.



Alkylace – zavedení alkylové skupiny na nukleofilní atomy, nejčastěji methylace.

Methylační činidla:

