

СУЩЕСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ И ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**С.В. Воронин, кандидат технических наук, доцент.
Санкт-Петербургский университет ГПС МЧС России**

Приведены основные понятия, принципы и порядок работы на хроматографах, рассмотрены тонкослойная и газожидкостная хроматографии как методы экспертного исследования.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография, хроматограф, хроматографическое разделение

Хроматография – это физико-химический метод разделения смесей веществ, при котором разделяемые компоненты распределяются между двумя фазами – Неподвижная Фаза (НПФ) и Подвижная Фаза (ПФ). Принципиальная схема хроматографа представлена на рис. 1.

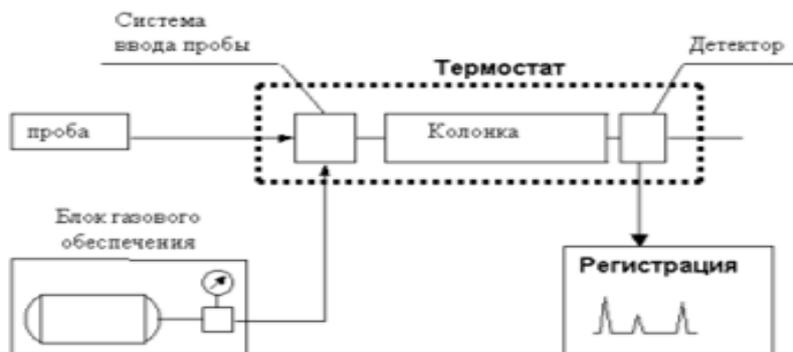


Рис. 1. Принципиальная схема хроматографа

В состав хроматографа кроме хроматографической колонки и детектирующего устройства входят блок газового обеспечения и устройство ввода пробы. Хроматограф «Кристалл 5000.1» обеспечивает газохроматографическое разделение и детектирование жидких проб [1, 2]. Для ввода жидких проб используют микрошприц типа МШ-10М. Блок газового обеспечения состоит из газовых линий. В каждой линии газа последовательно расположены регуляторы давления или расхода, стабилизирующие давление потока газа или его расход, а также установлены фильтры с сорбентами. Фильтр, используемый в линии воздуха, очищает воздух от влаги и органических примесей, а фильтры, установленные в линиях газа-носителя и водорода, очищают эти газы от влаги, механических примесей и кислорода в них.

Система ввода проб включает в себя испаритель и дозирующее устройство.

Проба анализируемой смеси поступает в испаритель и переводится в нем в газообразное состояние. Через дозирующее устройство газообразная проба вводится непосредственно в колонку в потоке газа-носителя. Дозирование пробы в капиллярную колонку можно осуществлять двумя способами: с делением и без деления потока.

Испаритель представляет собой нагреваемый до определенной температуры металлический блок с каналом для ввода и испарения жидкой пробы. В канал подается поток предварительно нагретого газа-носителя. С одной стороны канал закрыт пробкой из термостойкой резины, с другой к нему присоединена хроматографическая колонка. При работе испарителя в режиме с делением потока, проба вводится в нагретый испаритель и мгновенно испаряется. В капиллярную колонку попадает лишь небольшая часть пробы в соответствии с установленным делением потока пробы. Основной объем введенной в дозатор пробы сбрасывается с помощью газа-носителя в атмосферу. Ввод пробы с делением потока, прежде всего, используют для высоких концентраций компонентов. Коэффициент деления потока для колонок с внутренним диаметром (0,25–0,32 мм) обычно составляет 1:15 – 1:100. Для узких колонок с внутренним диаметром до 0,2 мм коэффициент деления потока составляет от 1:40 до 1:200. Работа испарителя в режиме с делением потока представлена на рис. 2.

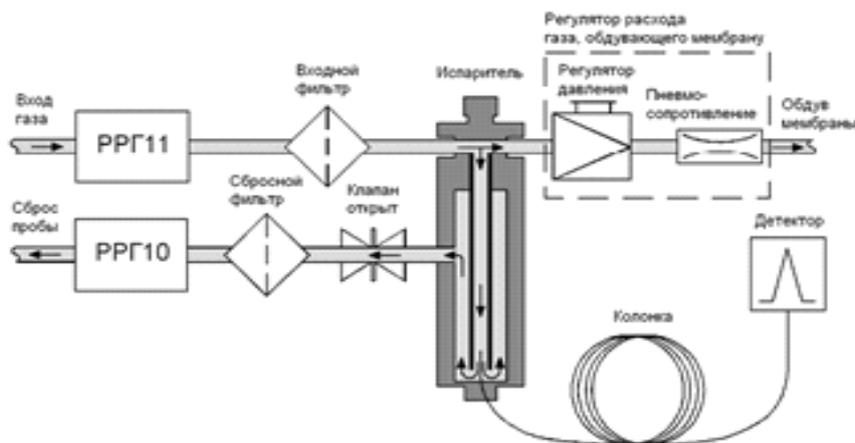


Рис. 2. Работа испарителя в режиме деления потока (состояние в момент ввода пробы) [3]

Колонка служит для разделения смеси на отдельные составляющие компоненты.

Разделенные компоненты смеси с газом-носителем последовательно подаются в детектор, который преобразует физические свойства бинарных смесей компонент – газ-носитель в электрический сигнал. На экране компьютера регистрируется серия пиков, соответствующих отдельным компонентам анализируемого вещества, называемая хроматограммой.

В качестве ПФ используется инертный газ высокой степени очистки (не менее 99,99 %). На эффективность разделения смесей на компоненты влияют два фактора: давление газа-носителя и его природа (гелий, азот и др.). Наиболее часто в качестве ПФ применяется гелий марки «А».

На рис. 3 представлена схема разделения двухкомпонентной смеси с помощью хроматографической колонки.

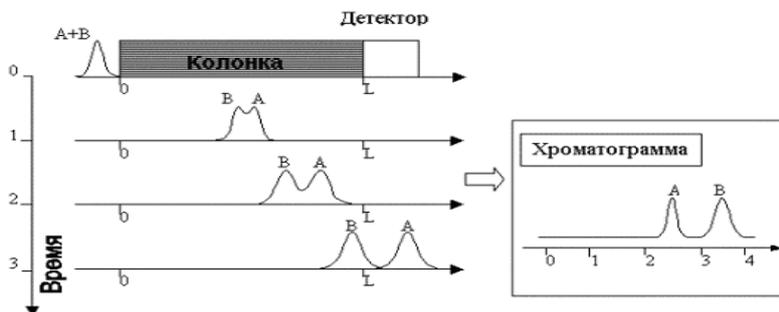


Рис. 3. Принцип разделения двухкомпонентной смеси [3]

Разделение сложных смесей на индивидуальные вещества осуществляется за счет различий в растворимости каждого вещества в неподвижной жидкой фазе и скорости перемещения с помощью ПФ газообразной компоненты смеси внутри хроматографической колонки. Из рис. 3 видно, что растворимость компонента (B) в жидкой стационарной фазе больше, чем компонента (A). Поэтому этот компонент дольше остается внутри колонки и на хроматограмме ему отвечает пик с большим временем удерживания.

Идентификацию пиков осуществляют по параметрам удерживания, а именно по времени удерживания пика и по индексам удерживания. Каждое вещество для конкретной неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при постоянстве режима разделения смеси на компоненты (температуры колонки и давления газа-носителя) должно характеризоваться конкретными параметрами удерживания.

Газожидкостная хроматография

В газожидкостной хроматографии в качестве НФ используется жидкость (разные модификации силоксановых полимеров и сополимеров). ПФ в газожидкостной хроматографии является инертный газ (гелий или азот).

Разделение сложной смеси на компоненты в газожидкостной хроматографии обусловлено разной растворимостью хроматографируемых соединений в неподвижной жидкой фазе. На поверхности раздела фаз для каждого компонента устанавливается динамическое равновесие, на которое не оказывают влияния другие компоненты анализируемой смеси. При этом неподвижная жидкая фаза растворяет молекулы хроматографируемого соединения, а газообразная ПФ вымывает растворенный компонент после достижения динамического равновесия паров вещества на границе раздела фаз и перемещает его вдоль колонки со скоростью движения потока газа-носителя. Цикл растворение-вымывание-перемещение вдоль колонки повторяется многократно.

Таким образом, разделение многокомпонентной смеси происходит в хроматографической колонке в результате перераспределения веществ анализируемых смесей между двумя несмешивающимися фазами за счет селективного удерживания поверхностью НФ каждого компонента смеси в соответствии с их коэффициентами распределения. При этом в колонке образуются отдельные полосы, так называемые хроматографические зоны. Поскольку компоненты анализируемой смеси в колонке образуют с НФ различные по силе связи, то и перемещение вдоль слоя жидкой фазы с помощью газа-носителя происходит с различными скоростями. В результате зона вещества, образующего

более прочные связи с НФ, постоянно отстает от зоны вещества, образующего менее прочные связи. При достаточной длине колонки смесь веществ разделяется на отдельные компоненты.

Для хроматографического анализа сложных смесей нефтепродуктов (бензинов, керосинов, дизельных топлив, растворителей нефтяной природы) и технических жидкостей наиболее эффективными являются капиллярные колонки [4]. Такие колонки позволяют разделять следовые количества легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ) и горючих жидкостей (ГЖ), обнаруженные после пожара. Для анализа органических остатков неизвестной природы, извлеченных с места пожара, чаще всего используются кварцевые капиллярные колонки с неподвижной фазой средней полярности из силоксановых сополимеров марок ZB-50, CP-Sil 24CB, OV-17, HP-17, DB-17.

Длина капиллярных колонок колеблется от 10–20 м до 100–200 м. Внутренний диаметр составляет 0,25–0,5 мм. Следует отметить, что чем меньше диаметр колонки, тем выше ее эффективность. В капиллярных колонках неподвижная жидкая фаза наносится в виде тонкой пленки на внутренние стенки капилляра. При этом сама трубка остается по существу «полой». Поток газа движется по такой колонке с большой линейной скоростью, не встречая значительного сопротивления.

Как правило, предел обнаружения веществ методом газожидкостной хроматографии определяется, прежде всего, чувствительностью детектора. Для детектирования компонентов смесей ЛВЖ и ГЖ используется универсальный и наиболее чувствительный пламенно-ионизационный детектор, предел обнаружения детектируемых частиц которого соответствует концентрации (нормальных алканов) $3 \cdot 10^{-12}$ г/с. Пламенно-ионизационный детектор относится к числу потоковых детекторов, его сигнал прямо пропорционален скорости газа-носителя. Принцип работы пламенно-ионизационного детектора основан на ионизации молекул анализируемых веществ в водородном пламени горелки детектора и последующим их перемещением, в результате которого возникает дополнительный ионный ток. При этом происходит изменение разности потенциалов между электродами. В качестве электродов используется корпус горелки и металлический коллектор, внутри которого находится горелка. Изменение разности потенциалов регистрируется в виде пика на хроматограмме.

Чувствительность самого метода газожидкостной хроматографии, то есть нижний предел обнаружения веществ, входящих, в частности, в смеси различных источников горения нефтяного происхождения, составляет не менее 0,02 мг/дм³.

Достоинства: газожидкостная хроматография является самым распространенным и наиболее универсальным методом, позволяющим определять до 1000 разных по природе веществ в одной пробе. Методом газожидкостной хроматографии идентифицируются не только арены, но и другие классы органических веществ (алканы, спирты, кетоны, сложные эфиры, карбоновые кислоты, нитросоединения, амины и др.).

Недостатки: для проведения анализа данным методом требуется специальное дорогостоящее оборудование, обученный персонал, время определения значительно увеличивается за счет предварительной обработки исследуемых образцов, что связано с экстракцией биологической жидкости и получением легколетучих производных анализируемой пробы. Все это значительно усложняет процедуру проведения анализа и делает ее дорогостоящей.

Применение: метод газожидкостной хроматографии применяется для разделения высококипящих веществ, для анализа масел и жиров, химического и геохимического исследования нефти, нефтяных фракций и нефтепродуктов, проведения экспертизы по факту пожара, когда в результате выгорания на месте пожара остаются следовые количества органических смесей, являющихся потенциальными источниками горения на пожаре.

Тонкослойна хроматография

В тонкослойной хроматографии в качестве неподвижной стационарной фазы используют различные мелкодисперсные твердые сорбенты, нанесенные тонким слоем на стеклянную пластинку (оксид алюминия, силикагель и др.). ПФ служат различные жидкости, такие как органические растворители или их смеси либо органические и неорганические кислоты. Выбор природы ПФ проводится эмпирическим путем с учетом природы разделяемых соединений, а именно: для полярных соединений используют полярные жидкости, а для неполярных соединений – неполярные жидкости. Чаще всего применяют смесь растворителей. Хроматографическое разделение обусловлено переносом компонентов ПФ вдоль слоя НФ с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов. При этом разделяемые компоненты на пластинке образуют отдельные зоны (пятна). Разделяемые вещества идут обычно перед фронтом вытеснителя (жидкой ПФ).

В настоящее время разделение смесей ЛВЖ, ГЖ и продуктов их сгорания проводится на пластинках с закрепленным слоем сорбента – силикагеля (например, пластины чешского производства – Silufol). Предварительная подготовка пластин заключается в активации адсорбционного слоя путем его нагрева. Для этого пластины помещают в сушильный шкаф при температуре 100–120 °С и нагревают в течение одного часа.

Пробы объемом до 0,1 мл наносят микропипеткой или медицинским шприцем на стартовую линию слоя сорбента, отстоящую на 10 мм от нижнего края пластины. Затем пластину помещают в камеру с ПФ (выбранным экспериментально растворителем или смесью растворителей). Хроматографирование продолжают до тех пор, пока ПФ не пройдет от линии старта приблизительно 10 см. Диаметр пятна не должен превышать 2–3 мм. При этом необходимо помнить, что эффективность разделения тем выше, чем меньше пятно. По окончании хроматографирования пластину вынимают из камеры, дают растворителю полностью испариться и исследуют визуально при воздействии на пластинки ультрафиолетовым светом.

При УФ-освещении визуально обнаруживаются ярко окрашенные зоны нафто-ароматических и многоядерных ароматических углеводородов. Следует отметить, что кроме цветности хроматографическая зона характеризуется относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое сорбента (R_f). Экспериментально величину R_f определяют как отношение расстояния X , пройденного веществом к расстоянию L , пройденному растворителем (элюентом) от старта до линии фронта ($R_f = X/L$).

Если образуются невидимые в УФ-свете хроматографические зоны, то хроматограммы необходимо проявить. Хроматограммы проявляют с помощью обработки специальными реагентами. По характерной окраске образующихся цветных зон и по их положению относительно стартовой линии на сорбенте судят о составе анализируемой пробы.

В качестве реагентов используют пары йода, а также пятихлористую сурьму – $SbCl_5$ – (20 % р-р в четыреххлористом углероде) или формолитовую смесь (2 % р-р формальдегида в концентрированной серной кислоте) [5, 6].

Проявление парами йода проводят, помещая пластинку в камеру, насыщенную парами йода (на дно закрытой камеры предварительно кладут несколько кристалликов йода, который, сублимируясь, заполняет парами камеру). Йод является общим реагентом на все группы органических соединений, содержащихся в нефтепродуктах. При проявлении в парах йода вся пластинка окрашивается в желтый цвет. Пятна, относящиеся к насыщенным углеводородам, остаются белыми на желтом фоне, а пятна, содержащие углеводороды ненасыщенной структуры, окрашиваются в коричневый цвет.

Растворами пятихлористой сурьмы или формолитовой смеси пластины опрыскивают из пульверизатора. Пятихлористая сурьма и формолитовая смесь являются в основном реагентами на ароматические углеводороды и дают с ними яркие цветные пятна, отличающиеся по цвету в зависимости от количества ароматических циклов в аренях.

Объем и качество информации, получаемые методом тонкослойной хроматографии, зависят от конкретных условий методики и от полярности подвижной фазы.

Таким образом, хроматография в тонком слое сорбента (например, окиси алюминия) дает возможность отделить нефтепродукты от мешающих их определению экстрактивных веществ (древесины, по крайней мере) и обнаружить присутствие нефтепродуктов по наличию характерных пятен в зоне $R_f=0,45 \div 1,0$.

Метод тонкослойной хроматографии можно использовать для отделения нефтепродукта от экстрактивных веществ объекта-носителя (древесины, тканей и др.) или для разделения остатков самого нефтепродукта на компоненты (парафиновые и нафтеновые, олефиновые, ароматические углеводороды).

Достоинства: экспрессность, универсальность, простота техники, простота оборудования. Данный метод – самый дешевый метод анализа органических веществ. Метод тонкослойной хроматографии позволяет получать не только экспрессную информацию о составе источника горения, но и отделять органические остатки от объектов-носителей и различных добавок, например красителей в бензинах или полимерной основы в клеевых композициях, затрудняющих интерпретацию результатов анализа методом газожидкостной хроматографии. Кроме того, метод ТСХ часто используют как метод фракционирования соединений с целью их последующего спектрального анализа.

Недостатки: ограниченная разрешающая способность, низкая чувствительность определения, зависимость от трудноконтролируемых внешних условий.

Применение: метод хроматографии в тонком слое сорбента применяется в фармацевтическом анализе для разделения экстрактов и настоек лекарственных растений, для демонстрации основ хроматографии, быстрые предварительные эксперименты для оптимизации препаративных хроматографических разделений, с целью идентификации медицинских и пищевых растительных компонентов по валидированным методикам с повышенными требованиями к точности, воспроизводимости и чувствительности, при производстве пожарно-технических экспертиз.

Можно сделать вывод, что данные методы имеют различие изначально в технике проведения каждого из них, сути самого метода, областях применения, органической природе веществ, исследуемых этими методами. Но каждый из перечисленных методов имеет важное значение как для проведения пожарно-технической экспертизы, так и для анализа веществ в других областях экспертиз. Один метод дополняет другой за счет техники проведения анализа и оборудования, с помощью которого исследуются материалы.

Литература

1. Руководство при эксплуатации хроматографа «Хроматэк – Кристалл 5000». Описание и работа. Йошкар-Ола: ЗАО СКБ «Хроматэк» 2006. Ч. 1. 186 с.
2. Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Техносфера, 2009. 472 с.
3. Аналитическая химия: в 3-х т. Методы разделения веществ и гибридные методы анализа / под ред. Л.Н. Москвина. М.: Изд. центр «Академия», 2008. Т. 2. 567 с.
4. Васильев В.П. Аналитическая химия: в 2-х кн. Физико-химические методы анализа: учеб. М.: Дрофа, Кн. 2. 2009. 383 с.
5. Ловчиков В.А., Бельшина Ю.Н., Дементьев Ф.А. Физико-химические методы экспертного исследования. Лабораторный практикум: учеб. пособие. СПб.: С.-Петербург. ун-т ГПС МЧС России, 2010.
6. Галишев М.А., Алексеева Т.С., Сикорова Г.А. Методы и средства судебно-экспертных исследований: учеб. пособие. СПб.: С.-Петербург. ун-т ГПС МЧС России, 2009. 136 с.