

Plynová chromatografie

C5060 Metody chemického výzkumu

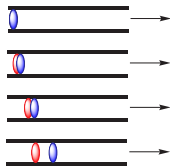
Jaromír Literák

Ústav chemie PŘF MU

18. 10. 2019

Plynová chromatografie

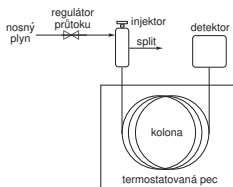
Chromatografie je skupina separačních metod, jejichž společným znakem je rozdělování molekul složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné rychlosti pohybu jednotlivých látek s mobilní fází v důsledku odlišné distribuce látek mezi mobilní a stacionární fázi.



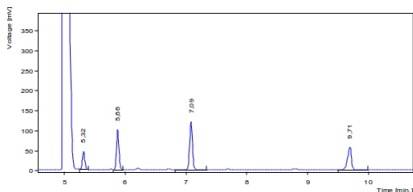
Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) je omezena tenzí par analyzovaných látek a jejich stabilitou za vyšších teplot (při teplotách do 400–450 °C). Odhaduje se, že lze pomocí GC analyzovat 10–20 % všech známých látek.

Plynový chromatograf

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

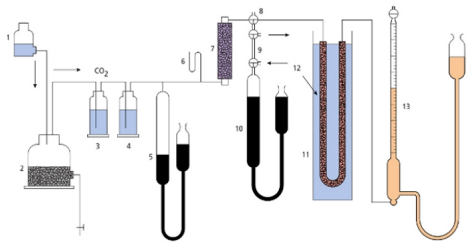


V počátcích plynové chromatografy s **náplňovými kolonami**, v současnosti dominují **kapilární kolony**.



Plynový chromatograf

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



Jaroslav Janák



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.

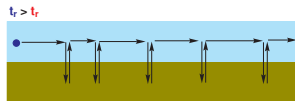
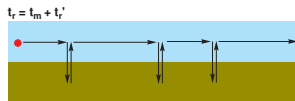
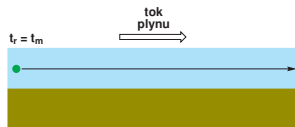
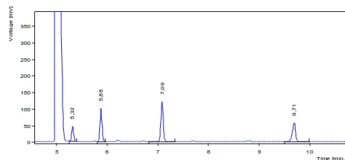
Redukovaný retenční čas t'_r

$$t_r = t_m + t'_r$$

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.



Rozlišení

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):

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

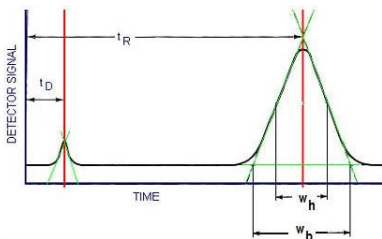
kde

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



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 :

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

$$k_i > k_j$$

Vyjádření účinnosti separace

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

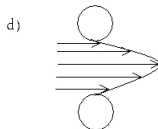
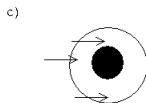
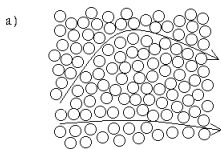
L – délka kolony

N – počet teoretických pater

Mechanismy rozšiřování zón analytu na chromatografické koloně.

Hlavní mechanismy rozšiřování zón analytu na chromatografické koloně.

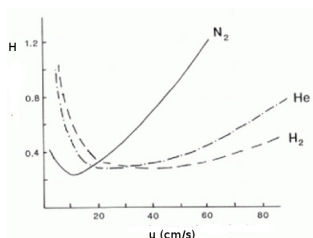
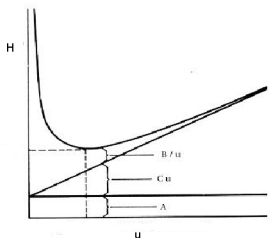
- Vířivá difúze
- Podélná molekulární difúze
- Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi
- Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi



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.

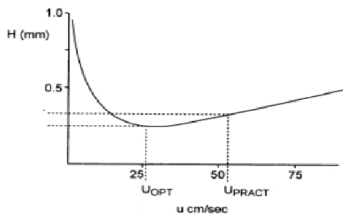


V kapilárních kolonách je málo významná vířivá difúze → **Golayova rovnice**.

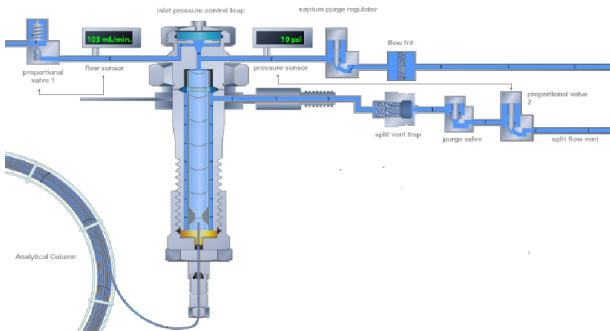
van Deemterova rovnice

- **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.

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



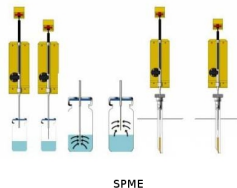
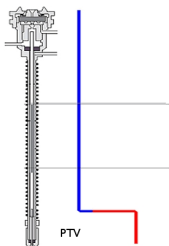
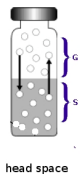
Plynový chromatograf – Inlet



- 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

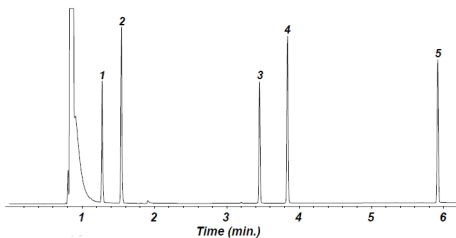
- **Nástřik bez splitu** (splitless) – stopová analýza. Split aktivován určitou dobu po nástřiku.
- **Nástřik se splitem** – vhodné pro koncentrované vzorky.
- **Splitovací poměr** – poměr toku splitovacím ventilem a kolonou.

Doporučené splitovací poměry:

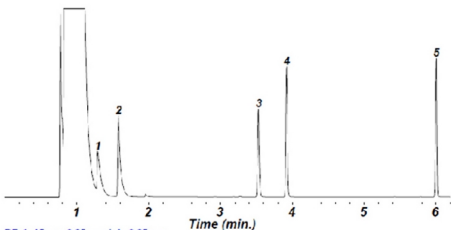
Vnitřní průměr kolony / mm	Splitovací poměr
0,10	1:50–1:75
0,19–0,25	1:10–1:20
0,32	1:8–1:15
0,53	1:2–1:5

Vliv splitovacího poměru

50:1 Split Ratio



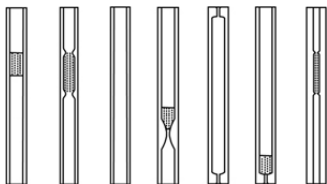
5:1 Split Ratio



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

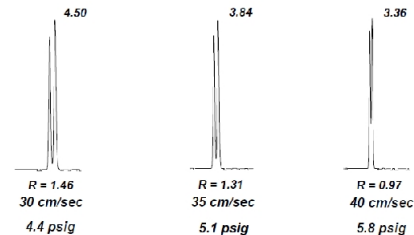
Plynový chromatograf – Inlet

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



Nosný plyn

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

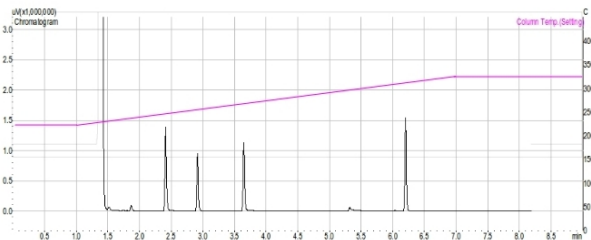


DB-1, 15 m x 0.32 mm ID, 0.25 μ m
 60°C isothermal
 1,3- and 1,4-Dichlorobenzene

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

Teplotní program pece

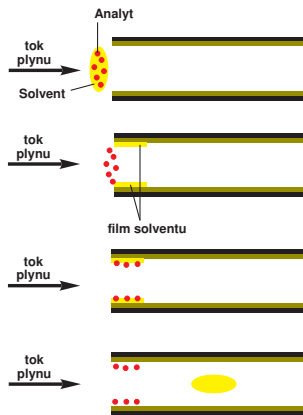
- Podstatný faktor ovlivňující kvalitu rozdělení látek a délku analýzy.
- Teplotní gradient je užitečný při dělení látek výrazně se lišících těkavostí nebo silou specifických interakcí se stacionární fází.



- 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

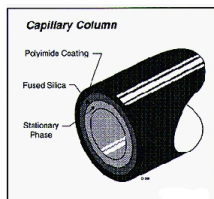
- Technika užívaná ke zúžení šířky píků, obzvláště při splitless nástřiku a těkavých analytech.
- Počáteční teplota kolony je o 10°C nižší, než teplota varu rozpouštědla.
- Podobného efektu dosáhneme, pokud je počáteční teplota kolony min. o 150°C nižší, než teplota varu analytů.



Stacionární fáze

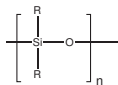
Kapilární GC kolony

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

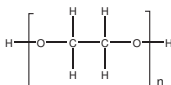


Složení stacionární fáze

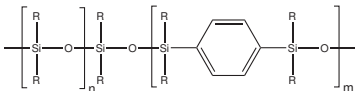
- Zesíťované (crosslinked) a vázané (bonded) stacionární fáze
- Low bleed columns



Polysiloxany



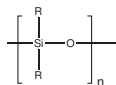
Polyethylenglykol (PEG)

Siaryleny
(low bleed "MS" columns)

Povaha stacionární fáze

Základní druhy interakce analytu se stacionární fází:

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



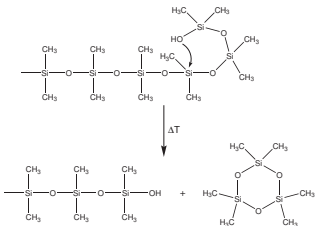
Polysiloxany

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.

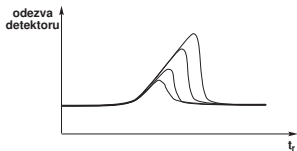
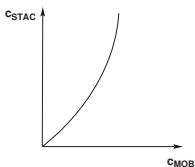
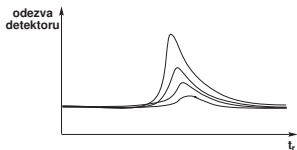
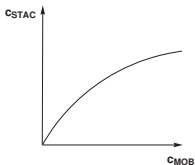
Povaha stacionární fáze

- 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:



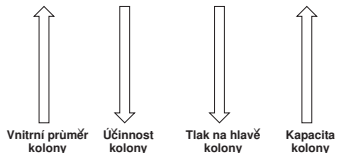
Povaha stacionární fáze

- 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:

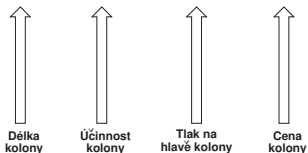


Vliv délky a vnitřního průměru kolony

Vliv **vnitřního průměru** kolony:

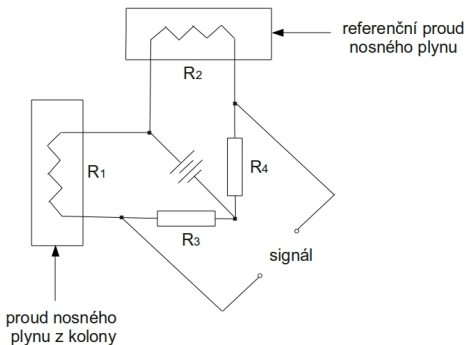


Vliv **délky** kolony:



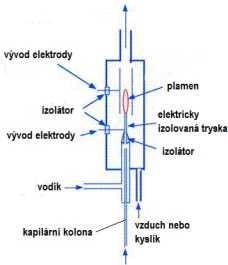
Teplotně vodivostní detektor

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.



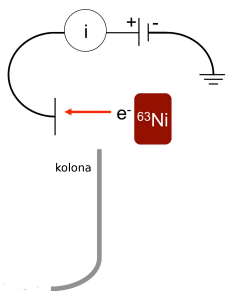
Plamenově ionizační detektor

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.

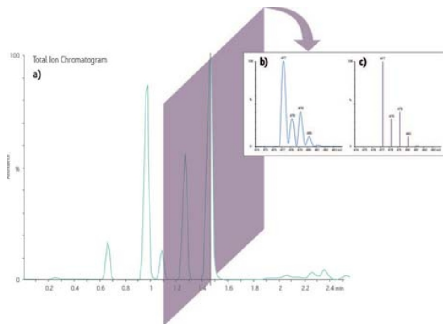


Hmotnostní detektor

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**.

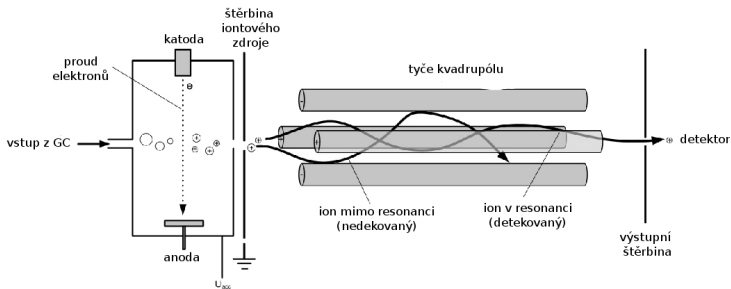
- Sektorový hmotnostní spektrometr
- TOF (Time of flight)
- Kvadrupólový hmotnostní spektrometr
- Iontová past
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová resonance



Hmotnostní detektor

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

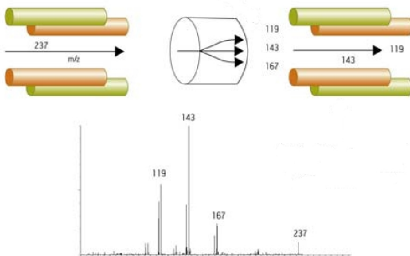
př.: hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým hmotnostním filtrem a elektronovou ionizací:



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:



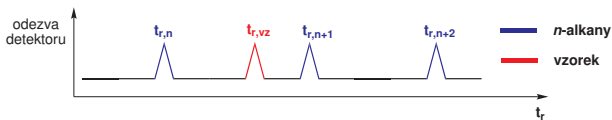
Kvalitativní analýza – retenční indexy

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 $(n+1)$:

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

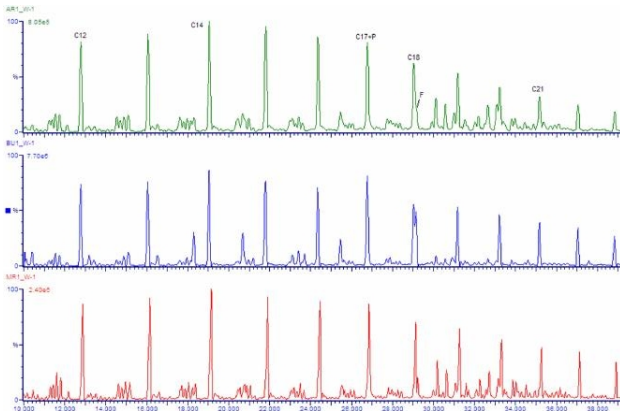
kde t'_r jsou příslušné redukované retenční časy a n je počet atomů uhlíku v molekule lehčího n -alkanu.

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.



Kvantitativní analýza

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

- **Metoda vnitřní normalizace.**
- **Metoda standardního přidavku** – ke vzorku se přidává známé množství stanovované látky. Z plochy analytu ve vzorku s a bez přidavku 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.

Kvantitativní analýza

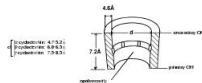
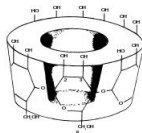
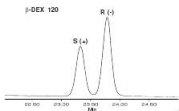
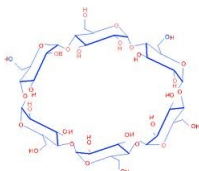
- **Metoda vnitřního standardu** – ke vzorku se přidává známé množství vnitřního standardu. Kalibrační přímka:

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

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.

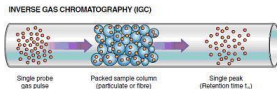
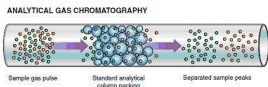
Separace enantiomerů

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



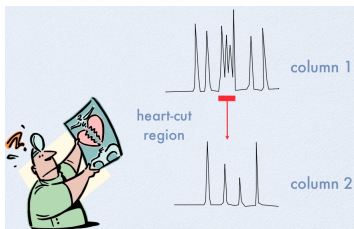
Inverzní chromatografie

- 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.



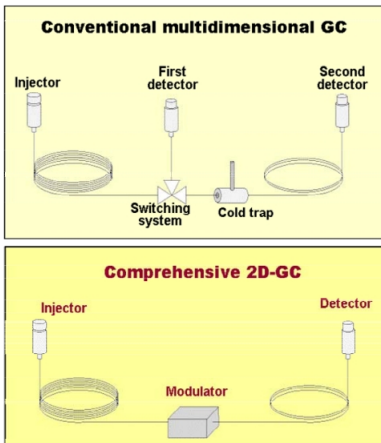
Dvoudimenzionální GC

- 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

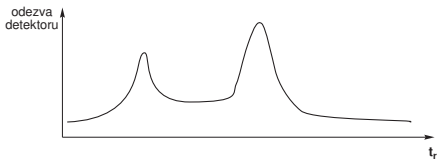
Comprehensive 2D GC – každý z píků v jedné dimenzi je přenesen samostatně na druhou kolonu.



Derivatizace

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.



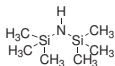
Někdy je potřeba také deaktivovat povrchy uvnitř chromatografu, např. liner a skleněnou vatu v lineru.

Derivatizace

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



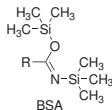
Silylační činidla jsou citlivá na vlhkost. Příklad silylačních činidel:



HMDSA



TMSC



BSA



TMSI

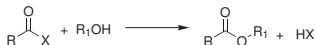
Zbytky silylačních činidel mohou poškodit některé typy stacionárních fází (PEG). Vzorek také může obsahovat $\text{R}_3\text{Si-O-SiR}_3$ (produkt hydrolyzy silylačního činidla).

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

Derivatizace

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:

