

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НОВГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ЯРОСЛАВА МУДРОГО

О.С. Петрова

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Лабораторный практикум

ВЕЛИКИЙ НОВГОРОД
2016

УДК 615.9(075.8)
ББК 52.84я73
Т51

Печатается по решению
РИС НовГУ

Р е ц е н з е н т ы:

кандидат фармацевтических наук, доцент **Г.А. Антропова**
зам. начальника ГОБУЗ «Новгородское бюро
судебно-медицинской экспертизы» **В.В. Алфимов**

Токсикологическая химия: лаб. практикум / авт.-сост. О. С.
Т51 Петрова; НовГУ им. Ярослава Мудрого. – Великий Новгород, 2016.
– 119 с.

Лабораторный практикум разработан для обеспечения выполнений требований Федерального государственного образовательного стандарта к минимуму содержания и подготовки специалистов по специальности «Фармация».

Лабораторный практикум предназначен для подготовки обучающихся на фармацевтическом факультете к лабораторным занятиям при изучении материалов курса токсикологической химии.

УДК 615.9(075.8)
ББК 52.84я73

© Новгородский государственный
университет, 2016
© О. С. Петрова, составление 2016

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ КАК ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ, ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ «ЛЕТУЧИХ ЯДОВ»

Обоснование темы

Газовая хроматография (ГХ) – это вид хроматографии, когда подвижной фазой является газ, проходящий через колонку, наполненную неподвижной фазой, а распределяемые компоненты смеси находятся в газообразном или в парообразном состоянии. В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы различают газо-адсорбционную и газо-жидкостную хроматографию.

В газо-адсорбционной хроматографии (ГАХ) в качестве неподвижной фазы используются твердые адсорбенты с большой поверхностью (активированный уголь, силикагель, цеолит и т.д.). Разделение в этом случае определяется адсорбционными свойствами наполнителя колонки по отношению к разделяемым соединениям, преимущественно газам. Однако, арсенал современных адсорбентов невелик, различия в адсорбционных свойствах анализируемых веществ всегда достаточны для проведения исследования, поэтому данный метод хроматографии не нашел широкого применения.

В газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) основой разделения веществ на хроматографической колонке является многократно повторяющийся процесс растворения анализируемого вещества в неподвижной жидкой фазе **нанесенной** тонким слоем на поверхность инертного твердого носителя, и выделения вещества под действием тока газа-носителя. Широкий выбор жидких фаз делает газо-жидкостную хроматографию наиболее гибким и селективным методом. Он применяется для разделения газов, а так же жидких и твердых соединений, предварительно переведенных в летучее состояние.

Достоинствами метода ГЖХ являются:

- универсальность – можно разделять и анализировать различные смеси газообразных, жидких и твердых веществ, обладающих летучестью и термической устойчивостью при температуре колонки от -70 до 450 °С;
- быстрота анализа и высокая разделительная способность, большой выбор неподвижных жидких фаз, их комбинирование позволяет разделить практически любые сложные смеси;
- высокая чувствительность – детектирующие системы позволяют определять концентрацию 10^{-8} – 10^{-9} мг/мл;
- малая величина пробы – в дозирующее устройство вводится для анализа проба жидкая или газообразная в объеме 0,1-10 мкл;
- точность метода – относительная ошибка определения составляет 2-5 %.

Цель занятия – освоение методики проведения газохроматографического анализа смеси спиртов.

Целевые задачи:

- выяснить устройство газожидкостного катарометра, пламенно-ионизационного и электрозахватного;
- уметь выполнять газохроматографический анализ и обрабатывать хроматограммы.

Практическая работа

Задание 1. Законспектируйте в рабочую тетрадь следующие пункты:

1. Устройство газового хроматографа.

Для проведения газохроматографического анализа служит специальный прибор – газовый хроматограф (рис. 8).

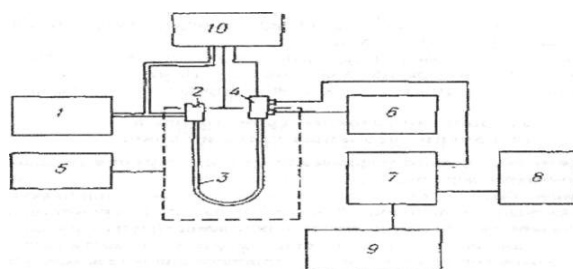


Рис. 8. Принципиальная схема газового хроматографа

Газоноситель из баллона высокого давления через редуктор поступает в систему подготовки газов (1), предназначенную для установки, стабилизации и измерения скорости газа-носителя и газов, питающих некоторые детекторы. Дозирующее устройство (2) предназначено для ввода пробы. Разделение смеси на отдельные входящие в ее состав компоненты происходит в колонке (3). В ГЖХ используются три типа аналитических колонок – насадочные, микронасадочные и капиллярные.

В ГЖХ разделение происходит за счет различной растворимости компонентов смеси в пленке неподвижной жидкой фазы. Выбор неподвижной жидкой фазы основывается на теории растворов и сведениях о физико-химических свойствах жидкой фазы и анализируемых веществ.

Разделенные компоненты с потоком газа-носителя попадают в детектор (4), который преобразует возникающие изменения физико-химических свойств систем газоноситель: компонент (по сравнению с чистым газом-носителем) в электрический сигнал. Детектор представляет собой устройство, предназначенное для обнаружения и количественного определения выходящих из колонки в потоке газа-носителя компонентов анализируемой смеси.

Детекторы подразделяются на:

- универсальные и селективные,

Селективные детекторы позволяют определить в образце только соединения определенного состава. Универсальные детекторы позволяют определять соединения более разнообразной химической природы, что необходимо при определении полного состава смеси, содержащей компоненты различного строения;

- интегральные и дифференциальные,

Обычно используют дифференциальные детекторы, которые измеряют мгновенную концентрацию или массовую скорость вещества в потоке газа-носителя;

- деструктивные и недеструктивные,

При взаимодействии молекул анализируемого вещества с чувствительным элементом детектора происходит процесс пения вещества и дальнейшая повторная регистрация невозможна;

- потоковые и концентрационные.

Если остановить поток газа-носителя в момент детектирования вещества и сигнал детектора с течением времени будет уменьшаться, так как процесс регистрации уменьшает количество вещества, то такой детектор называется потоковым. Если же сигнал детектора остается постоянным как угодно долго, поскольку вещество не расходуется, то такой детектор называется концентрационным.

Электрический сигнал, возникший в детекторе при прохождении через него анализируемой пробы, усиливается в усилителе и записывается в виде хроматографических пиков на экране компьютера (9).

2. Основные хроматографические характеристики.

Параметры качественного анализа:

- абсолютное время удерживания (t_R) – время от момента ввода пробы до момента выхода из хроматографической колонки максимальной концентрации определяемого вещества (до появления максимума пика), измеряется в минутах или секундах;

- расстояние удерживания (l_R) (рис. 9) измеряется от момента ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из вершины пика соответствующего сигнала, измеряется в сантиметрах или миллиметрах;

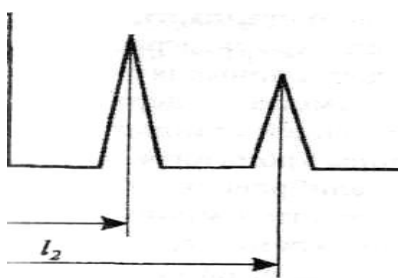


Рис. 9. Качественный параметр – расстояние удерживания

- объем удерживания (V_R) соответствует объему газа-носителя (подвижной фазы) в миллилитрах, прошедшего через колонку с момента

ввода пробы до момента выхода максимальной концентрации определяемого вещества;

– исправленное время удерживания (t'_R) определяется как время от момента ввода пробы до момента выхода из хроматографической колонки максимальной концентрации определяемого вещества (появление максимального значения пика) за вычетом абсолютного времени удерживания несорбируемого газа (t_0) (воздуха, оксидов азота и др), так называемый мертвый объем колонки.

Аналогично могут быть определены исправленное расстояние удерживания (l'_R) и исправленный объем удерживания (V'_R).

Параметры количественного определения: площадь (S) хроматографического пика пропорциональна количеству анализируемого компонента в смеси, однако, точное определение площадей пиков возможно не всегда, поэтому для количественной расшифровки хроматограмм используют и другие параметры – высоту (h_x) пика анализируемого вещества (рис. 10).

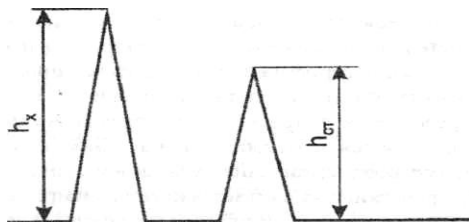


Рис. 10. Параметры количественного определения

3. Расчет содержания вещества в исследуемой пробе.

Метод абсолютной калибровки основан на построении графика зависимости одного из параметров пика определяемого вещества (площади S_x или высоты h_x) от содержания данного вещества в пробе.

Для построения калибровочного графика хроматографируют несколько растворов с различной известной концентрацией определяемого вещества при одинаковой величине вводимой пробы несколько раз (до 5 раз каждый раствор). При работе по методу абсолютной калибровки необходимы: точность и воспроизводимость дозировки пробы, строгое соблюдение постоянства хроматографирования.

Метод внутреннего стандарта предусматривает добавление известного количества стандартного вещества – внутреннего стандарта, к определенному количеству анализируемой пробы и последующее хроматографирование приготовленной смеси. В качестве внутреннего стандарта применяют вещество, не содержащееся в пробе. Готовят ряд искусственных смесей, содержащих определяемое вещество в разных концентрациях и внутренний стандарт в определенной постоянной концентрации. Полученные растворы хроматографируют и по полученным данным ($S_x/S_{ст}$ или $h_x/h_{ст}$) строят калибровочный график (рис. 11).

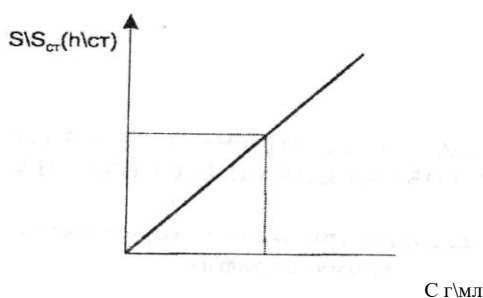


Рис. 11. Калибровочный график при количественном определении методом внутреннего стандарта

Метод внутреннего стандарта позволяет свести к минимуму ошибки, вызванные случайными изменениями параметров хроматографирования, так как отклонения от заданных условий в равной мере влияют на параметры пиков, как стандарта, так и определяемого вещества.

К стандартному веществу предъявляются следующие требования:

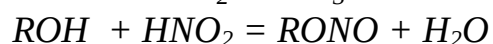
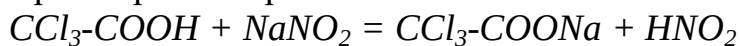
1. стандартное вещество должно хорошо растворяться в анализируемой смеси и быть инертным по отношению ко всем ее компонентам;
2. пик стандартного вещества должен располагаться на хроматограмме вблизи пика определяемого компонента и не накладываться на пики компонентов смеси;
3. концентрация стандартного вещества в анализируемой пробе должна быть такой, чтобы отношение параметров пиков стандарта и определяемого вещества было близким к единице.

Задание 2. Перепишите в рабочую тетрадь методику проведения алкилнитритного газохроматографического анализа смеси спиртов.

Условия хроматографирования: газовый хроматограф – Цвет-100 и Хромос ГХ-1000, детектор катарометр, ток моста 120 мА, колонки стальные длиной 2000 мм с внутренним диаметром 3 мм, заполнены 15% скваланом на хроматоне 0,15-0,20, газ-носитель гелий, скорость 50 мл/мин. Температура колонки, детектора 60 °С, испарителя 80 °С, множитель шкалы 5. Запись на КСП 600 мм/час.

Объекты исследования: образец «пьяной» трупной крови и мочи, заранее смешанный (1:1) со стандартным 3,14‰ раствором н-пропанола

Методика: в 5 флаконов из под пенициллина, содержащие по 0,5 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты вносят: в 1-ый 1 мл смеси спиртов C_1 - C_5 , во 2-й и 3-ий по 1 мл исследуемой крови, 4-й и 5-й по 1 мл исследуемой мочи. Флаконы закрывают резиновыми пробками, которые фиксируют в металлических контейнерах. При помощи шприца во все флаконы вводят по 0,5 мл 30% раствора нитрита натрия:



Содержимое флаконов резко встряхивают 1 минуту. Шприцом отбирают 1 мл парогазовой фазы и вводят в испаритель хроматографа. На хроматограмме регистрируют пики воздуха и пики с расстояниями максимумов пиков от ввода пробы для смеси спиртов (табл. 3).

Таблица 3

Расстояния удерживания алкилнитритов на газовом хроматографе

Алкилнитрит	I_R
Метилнитрит	5
Этилнитрит	7
Изопропилнитрит	9
Пропилнитрит	11
Изобутилнитрит	18
Бутилнитрит	24
Изоамилнитрит	46
Амилнитрит	61

Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта, в качестве которого используют 1 мл 3,14% раствор н-пропанола (добавляют в 3-ий и 5-ый флаконы) по вышеописанной методике.

Расчет количественного содержания этилового спирта производят по калибровочному графику. Для построения графика используют стандартные растворы этанола 0,5, 1, 2, 3, 4 ‰ концентрации (табл. 4, рис. 12).

Таблица 4

Калибровка газового хроматографа по стандартным растворам

Концентрация этанола, ‰	$h_{\text{этан.}}/h_{\text{проп.}}$
0,5	0,32
1	0,62
2	1,23
3	1,78
4	2,45

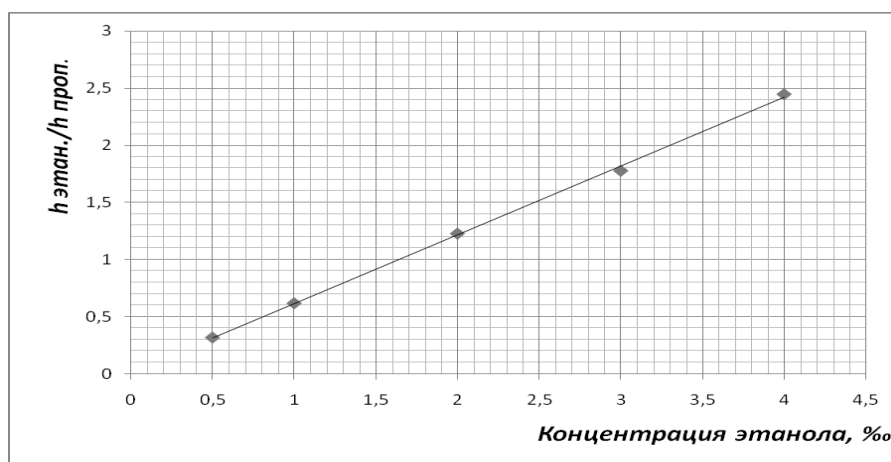


Рис. 12. Калибровочный график

Получив хроматограмму, определяют высоты пиков этилнитрита и пропилнитрита, находят отношение высот, а затем по калибровочному графику определяют концентрацию этанола в растворе. Поскольку исследуемые биологические жидкости отличаются по вязкости от водных растворов спиртов, то вводят поправочные коэффициенты: для крови – 0,95, для мочи – 1,05; для водно-спиртовой смеси – 1,63 (газовый хроматограф Цвет-100) и 1,77 (газовый хроматограф Хромос ГХ-1000).

Содержимое этанола в биологической жидкости рассчитывают с учетом данных коэффициентов (табл. 5).

Таблица 5

Результаты хроматографирования

	Компонент	Высота, мм		Концентрация, ‰	
		кровь	моча	кровь	моча
Цвет-100	этанол	120,0	213,0	0,85	1,59
	пропанол	218,0	229,0	–	–
Хромос ГХ-1000	этанол	117,7	200,7	0,86	1,60
	пропанол	229,4	232,2	2,98	3,29

Расчет:

Для крови – $C_{\text{‰}} = 120/218 \times 0,95 \times 1,63 = 0,85\text{‰}$

Для мочи – $C_{\text{‰}} = 213/229 \times 1,05 \times 1,63 = 1,59\text{‰}$

Для крови – $C_{\text{‰}} = 117,7/229,4 \times 0,95 \times 1,77 = 0,86\text{‰}$

Для мочи – $C_{\text{‰}} = 200,7/233,2 \times 1,05 \times 1,77 = 1,60\text{‰}$

На основании полученных результатов составляется экспертное заключение.

Самостоятельная работа

Решите в рабочей тетради ситуационную задачу:

На судебно-химическое исследование доставлены промывные воды желудка гр. III. Подозрение на отравление смесью спиртов. Приведите схему целенаправленного исследования на спирты.

Контрольные вопросы:

1. Как в ГЖХ проводят идентификацию хроматографических пиков?
2. В чем суть химической модификации веществ с низкой летучестью при проведении ГЖХ-анализа?
3. Какова преданалитическая подготовка дистиллята, содержащего галогеноуглеводороды при проведении ГЖХ-анализа?
4. Какие виды детекторов для определения химических веществ Вы знаете?