

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»**

В.И. Логутов

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
для проведения практического занятия в лаборатории хроматографии
по дисциплине «ЭКОЛОГИЯ»

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано Объединенной методической комиссией Института открытого образования и филиалов университета для студентов филиалов ННГУ, для обучающихся Дзержинского филиала ННГУ по направлениям подготовки:

42.03.01 Реклама и связи с общественностью

38.03.01 Экономика

38.03.04 Государственное и муниципальное управление

38.03.02 Менеджмент

Нижний Новгород

2017

УДК 543.544
ББК 24.46
Л69

Логутов В.И. **Методические рекомендации для проведения практического занятия в лаборатории хроматографии по дисциплине «ЭКОЛОГИЯ»** для обучающихся Дзержинского филиала по направлениям подготовки 42.03.01 Реклама и связи с общественностью, 38.03.01 Экономика, 38.03.04 Государственное и муниципальное управление, 38.03.02 Менеджмент. Учебно-методическое пособие.- Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2017. – 13 с.

Рецензент: начальник отдела промышленной хроматографии ООО СЦ «Химаналитсервис» А.В. Домовенко

Целью методических рекомендаций является оказание методической поддержки студентов и преподавателей Дзержинского филиала ННГУ в процессе проведения практического занятия-показа по дисциплине «Экология» в лаборатории хроматографии Дзержинского филиала ННГУ. В методических рекомендациях представлен пример использования возможностей газовой хроматографии в экологическом контроле.

Ответственный за выпуск:
председатель Объединённой методической комиссии
Института открытого образования и филиалов университета
к.ю.н. А.К. Балдин

УДК 543.544

ББК 24.46

**©Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2017**

Содержание

1. Историческая справка	3
2. Сущность хроматографического метода. Виды хроматографии и их возможности	7
3. Практическая часть. Газохроматографическое определение содержания в воздухе оксида углерода (угарного газа).	9
3.1. Газовый хроматограф «Цвет-800»	9
3.1 Выбор конфигурации хроматографа.	
3.2 Включение хроматографа и оценка его состояния.	10
3.3 Включение хроматографа и оценка его состояния	12
3.4 Градуировка хроматографа	12
3.5 Проведение рабочего анализа	12

1. Историческая справка. М.С. Цвет - первооткрыватель хроматографии. Роль хроматографии в современном мире.

Начиная с конца 18-го века многие ученые пытались раскрыть тайну строения хлорофиллового зерна, было проделано множество блестящих работ, но разделить различные пигменты зеленого листа не удавалось, слишком близки они по своим свойствам. Эта задача была решена русским ученым **Михаилом Семеновичем Цветом** в начале 20-го века.



Рис. 1 Михаил Семенович Цвет (14 мая 1872 — 26 июня 1919) — русский ботаник-физиолог и биохимик растений, создатель хроматографического метода.

Классический опыт Михаила Цвета выглядел следующим образом. В расположенную вертикально стеклянную трубку с порошком мела Цвет залил раствор пигментов. В верхней трубки части образовалось окрашенное кольцо. Затем по каплям непрерывно Цвет стал подавать бензол. Окрашенное зеленое кольцо начало опускаться вниз, постепенно расширяться и разделяться на несколько колец, имеющих разную окраску. В итоге колец оказалось шесть: верхнее желтое, затем оливково-зеленое, темно-зеленое и три желтых. Цвет извлек столбик мела из трубки, разрезал на отдельные цилиндрики, извлек индивидуальные вещества из мела спиртом и стал исследовать. В результате Цвет показал, что хлорофилл- это не индивидуальное соединение, а смесь двух

веществ, которые разделились в трубке с мелом и дали оливково-зеленое и темно-зеленое слои. Остальные четыре желтых слоя были ксантофиллами.

Цвет назвал получаемую при разделении исходного экстракта разноцветную картину *хроматограммой*, а сам метод разделения *хроматографией*. В 1901 году 12 апреля М.С.Цвет представил к защите диссертацию *«Физико-химическое строение хлорофиллового зерна»*, которую блестяще защитил осенью того же года, и в которой, по его же словам, были заложены основы *хроматографического метода разделения*.

В 1903 году 08 марта Цвет выступил в Варшавском обществе естествоиспытателей со своим знаменитым докладом *«О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу»*, в котором детально описал *метод адсорбционного хроматографического анализа*.

Название метода *хроматография* (цветопись), как писал М.С.Вигдергауз, было подобрано очень остроумно. Во-первых, оно говорит об историческом опыте, когда была получена разноцветная картина, а во-вторых, напоминает об имени первооткрывателя. Конечно, дело не в том, что разделяемые вещества окрашены, главное- это возможность разделять вещества по их различной склонности к адсорбции. Об этом писал сам Цвет: «Само собой разумеется, описанные явления присущи не только хлорофильным пигментам: ясно, что самые разнообразные окрашенные или бесцветные химические соединения подчиняются тем же закономерностям».

Оставшиеся недолгие и очень трудные годы Цвет посвятил совершенствованию своего метода и применению его для практических задач. К сожалению, во время первой мировой войны при эвакуации Варшавского политехнического института, в котором он служил, все книги, рукописи и рабочие журналы Цвета погибли. *В 1916 году некоторое время Цвет провел в Нижнем Новгороде*, куда был эвакуирован его институт.

В сентябре 1918 года труды Цвета рассматривались Нобелевским комитетом, но эксперт судил о работах Цвета, как о работе по хлорофиллу, которая, по его мнению, была не доведена до конца, а результаты были спорны, и Нобелевской премии труды Цвета не получили, а *открытие принципиально нового метода анализа прошло для научного мира практически незамеченным*. Лишь через 70 лет в России узнали о номинировании работ Цвета на Нобелевскую премию. Умер М.С.Цвет в болезни и нищете 26 июня 1919 года в Воронеже.

Были попытки приписать заслугу открытия другим ученым, дать методу другое название, однако на сегодняшний день, и, думается, уже навсегда, приоритет М.С.Цвета признан во всем мире, а термин *хроматография* является наиболее часто используемым в науке и технике.

В 1950-х годах в рамках НПО «Химавтоматика» было создано Дзержинское ОКБА с опытным заводом. Основным направлением Дзержинского ОКБА было разработка и выпуск хроматографического оборудования. Эти хроматографы носили имя «Цвет». До середины 90-х годов хроматографы «Цвет» ДОКБА были самыми массовыми советскими хроматографами. К сожалению, в настоящее время хроматографы марки «Цвет» спросом не пользуются. Но традиции хроматографического приборостроения в г. Дзержинск успешно поддерживает группа компаний «Хромос», выпускающая хроматографы как газовые, так и жидкостные под маркой «Хромос». Основным производителем хроматографической аппаратуры в России на сегодня является ЗАО «СКБ ХРОМАТЭК» (г.Йошкар-Ола), выпускающие хроматографы «Хроматэк-Кристалл».

Хроматографические процессы протекают в естественных природных условиях.

Это и миграция нефти, и образование руд и распределение в них различных металлов, и поглощение кислорода гемоглобином в легких.

Неоднократно применяли хроматографию и до Цвета, и после него. Наиболее крупным скачком в развитии хроматографии после основополагающих работ М.С.Цвета считают создание методов *распределительной хроматографии* английским химиком А.Мартинем и его сотрудниками Р.Сингом и А.Джемсом. В 1952 году за разработку распределительной хроматографии и различных ее вариантов Мартин и Синг были удостоены Нобелевской премии.

В развитии хроматографии оставили след российские и советские ученые. Первый эффективный армейский противогаз разработал в 1915 году выдающийся русский химик Николай Зелинский. Именно он впервые в мире предложил использовать в качестве защиты от отравляющих газов как адсорбент активированный древесный уголь. Простота и надёжность его изобретения оказались столь поразительными, что уже к концу 1916 года все воюющие страны взяли на вооружение русский противогаз Зелинского.

В 1938 году Измайлов Н.А. и Шрайбер М.С. сообщили о проведении круговой хроматографии на слое оксида алюминия, нанесённом на стеклянную пластинку. При этом слои разделяемых веществ приобретали вид концентрических кругов. Это практически положило начало развитию тонкослойной хроматографии. Исследователи продемонстрировали, что метод можно применять для испытания сорбентов и элюентов для колоночной хроматографии.

Первая работа по хроматографическому анализу газов в СССР была опубликована в 1949 г. *Н. М. Туркельтаубом*, который выполнил ее под руководством А. А. Жуховицкого и К. А. Гольберта. Однако еще в 1936 г. *М.М. Дубинину* с сотрудниками удалось получить вытеснительную хроматограмму смеси паров толуола и спирта при

разделении их на колонке с углем. Таким образом, уже тогда исследователи заинтересовались возможностью разделения в паровой фазе и легких, и более тяжелых веществ.

В 1951 году А. А. Жуховицкий с сотрудниками предложили хроматермографию.

В 1953 году одновременно с чешским ученым Я. Янаком советский ученый, *профессор Горьковского университета Д.А. Вяхирев* в качестве одного из первых детекторов для газовой хроматографии предложил азотомер. Подчеркнем, что это было сделано на самом раннем этапе развития хроматографии.

В настоящее время невозможно представить ни одну область человеческой деятельности, где бы не использовалась хроматография.

2. Сущность хроматографического метода. Виды хроматографии и их возможности

Хроматографией называется физико-химический метод разделения смесей веществ в результате многократного перераспределения компонентов пробы между двумя фазами, одна из которых является неподвижной, а другая является подвижной. Когда разделяемые вещества (сорбаты) находятся в несорбированном состоянии в подвижной фазе (элюенте), они переносятся элюентом в направлении его движения, когда сорбаты находятся в сорбированном неподвижной фазой (сорбентом) состоянии, они элюентом не перемещаются, т. е. удерживаются сорбентом. Если сорбент к двум разделяемым сорбатам проявляет различную активность (селективность), т.е. удерживает их различное время, то данные сорбаты движутся по слою сорбента с разной скоростью и в итоге разделяются и находятся в виде двух несмешанных между собой зон (полос, пятен, пиков и т.п.).

Хроматографических методов довольно много. Их классификацию проводят по различным признакам.

По способу перемещения сорбата различают проявительную, фронтальную и вытеснительную хроматографию. Сюда же можно отнести электрохроматографию.

По агрегатному состоянию подвижной фазы. Когда подвижной фазой является жидкость, то говорят о *жидкостной хроматографии*. Когда подвижной фазой является газ, то говорят о *газовой хроматографии*.

По физико-химической природе процесса удерживания: адсорбция, растворение, хемосорбция.

По аппаратурному оформлению хроматографического процесса различают *колоночную хроматографию* и *хроматографию на плоскости* (бумажная, тонкослойная).

По цели проведения хроматографического процесса имеем *аналитическую хроматографию, препаративную хроматографию, хроматографию для физико-химических измерений*.

М.С.Цвет сделал свое открытие как раз на примере *проявительного варианта жидкостно-адсорционной колоночной хроматографии*, совместив *и аналитическую и препаративную хроматографию*.

В настоящее время как в рутинной аналитической, так и в исследовательской практике наиболее часто используются варианты проявительной колоночной жидкостной и газовой хроматографии.

В газовой хроматографии можно отметить еще одну классификацию, которая очень важна для аппаратурного оформления. Большинство газовых хроматографов во всем мире выпускаются серийно (массово) КАК ЛАБОРАТОРНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ УНИВЕРСАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ. *Эти хроматографы предназначены изначально для решения очень широкого круга аналитических задач.* Основой такого хроматографа является универсальный аналитический блок, который и выпускается производителем серийно. Для решения конкретной аналитической задачи такой серийный блок комплектуется (конфигурируется) нужными дозирующими устройствами, разделительными колонками и детекторами. Такие хроматографы относительно дешевы в изготовлении как раз за счет серийности. Лабораторные хроматографы можно доукомплектовать, переукомплектовать и под другие, ранее не планировавшиеся аналитические задачи.

Кроме таких хроматографов выпускают еще так называемые ПОТОЧНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ. Они предназначены для работы в автоматическом режиме практически без участия человека (оператора). *Для повышения надежности их работы* такие хроматографы конструктивно аппаратурно изготавливаются под конкретную узкую аналитическую задачу. Конечно, такие хроматографы стоят гораздо дороже.

3. Практическая часть. Газохроматографическое определение содержания в воздухе оксида углерода (угарного газа)

3.1. Газовый хроматограф «Цвет-800»

Для проведения практического занятия показа применяется хроматограф Цвет-800. Хроматограф ЦВЕТ-800 зарегистрирован в Государственном реестре средств измерений под №16904-97 сертификат Госстандарта РФ №3174-97 «Цвет-800» производится в соответствии с международной системой качества ГОСТ Р ИСО 9002-96, № РОСС RU.ИС11.Р00295 от 22.09.99 г.

Газовый хроматограф «Цвет-800» предназначен для анализа сложных многокомпонентных смесей органических и неорганических соединений.



Рис. 2. Газовый хроматограф «Цвет-800»

Газовый хроматограф «Цвет-800» применяется в химической, нефтехимической и газовой промышленности, для геолого-разведки нефти и газа, контроля выбросов промышленных предприятий, контроля загрязнений окружающей среды (воздуха, воды, почвы), в пищевой промышленности, в том числе при сертификации пищевых продуктов, в энергетике, медицине, биологии, судебной и судебно-медицинской экспертизах.

Достоинства хроматографа «Цвет-800»

1	универсальность применения за счет возможности использования шести детектирующих систем, капиллярных и насадочных колонок и дополнительных устройств, расширяющих аналитические возможности прибора;
2	высокая чувствительность прибора, позволяющая определять микропримеси от 1×10^{-4} до 1×10^{-6} без концентрирования и от 1×10^{-6} до 1×10^{-10} % об. с предварительным концентрированием пробы;
3	высокая точность анализа;

4	широкий набор тестированных кварцевых капиллярных и насадочных колонок;
5	ручной и автоматический ввод газовых или жидких проб;
6	задание исходных параметров с персонального компьютера или пульта;
7	цифровой и аналоговый выходы, позволяющие проводить обработку выходной информации персональным компьютером или выводить на потенциометр для ручной обработки.

Конструктивно хроматограф «Цвет-800» состоит из аналитического блока со встроенным контроллером управления и блока подготовки газов с цифровой индикацией расхода и давления.

Распечатка протокола анализа (хроматограмм и концентрации компонентов в смеси) - на принтере. Кроме того, задание и управление режимом работы можно осуществлять с пульта управления ПУ-09, а обработку результатов анализа проводить аналоговым способом по записи пиков анализируемых веществ на ленте автоматического потенциометра со шкалой 1мВ. В хроматографах в качестве основного детектора используется универсальный пламенно-ионизационный детектор ПИД, позволяющий определять все органические соединения.

3.2 Выбор конфигурации хроматографа

Конфигурация хроматографа (его основные узлы: колонка, детектор, дозатор) определяется аналитической задачей. Наша задача - определение содержания оксида углерода (СО) в воздухе на уровне ПДК. ПДК СО в рабочей зоне составляет 17-20 мг/м³, в атмосферном воздухе 2,5 мг/м³.

Детектор по теплопроводности, являясь универсальным, может обнаруживать СО, но только начиная с 50-100 мг/м³, Пламенно-ионизационный детектор (ПИД) позволяет обнаруживать вещества от 0,1 мг/м³, но оксиды углерода он не чувствует. В анализе оксидов углерода прибегают к ***реакционной газовой хроматографии***. При этом в ходе хроматографического процесса некоторые компоненты пробы подвергают химической реакции с превращением их в соединения другой химической структуры. При анализе оксидов углерода их переводят в метан за счет реакции гидрирования. Эта операция называется «метанирование», а устройство, в котором эта реакция протекает, называют «метанатором». Метанатор представляет собой трубочку из нержавеющей стали, в которую помещают небольшое (около 1 г) количество катализатора, содержащего никель. В водородной среде при температуре 300-400⁰С оксиды углерода превращаются в метан, который затем регистрируется ПИД.

Естественно, что метанатор нужно устанавливать между хроматографической колонкой и ПИД, а колонка должна разделять между собой оксиды углерода и метан, отделяя их при этом от других компонентов пробы. В этом случае на хроматограмме будут присутствовать три пика «метана», а именно, метана, полученного из оксида углерода, метана, полученного из диоксида углерода, и собственно самого метана. При этом и диоксид углерода, и метан в воздушных пробах всегда присутствуют, а СО в пробе воздуха может и отсутствовать.

Если в пробе нужно определять и диоксид углерода, то в качестве наполнителя хроматографической колонки чаще всего используют сорбенты типа активированного угля. В этом случае порядок выхода компонентов из колонки будет СО, метан, диоксид углерода. В нашем диоксид углерода определять не нужно, поэтому в качестве сорбента можно взять молекулярные сита (цеолиты) типа СаА или NaX. В этом случае порядок выхода компонентов из колонки будет метан, СО, а диоксид углерода из колонки выходить не будет, улавливаясь ею необратимо в условиях анализа. Кроме диоксида углерода, колонка с молекулярными ситами будет поглощать из проб воздуха и воду, и все органические вещества (примеси). По мере «насыщения» колонки ее разделительная способность будет ухудшаться, что потребует время от времени удалять из колонки эти вещества при более высокой температуре (300-350⁰С). Этот прием называется в хроматографии *кондиционированием*.

Газовые пробы, как в нашем случае пробы воздуха, можно вводить в хроматограф медицинскими шприцами в объеме от 0,1 до 5-10 мл, или специальными «газоплотными» шприцами. Но более лучший (повторяемый) результат дает ввод газовой пробы специальными кранами-дозаторами.

Таким образом, состав хроматографа определен: кран-дозатор с дозирующей петлей 1мл, колонка металлическая длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм, заполненная цеолитом СаА фракцией 0,25-0,50 мм, метанатор, ПИД. Работа проводится на хроматографе «Цвет-800» (в память о М.С.Цвете).

Режим работы хроматографа:

газ-носитель азот с расходом 30 мл/мин, водород-30 мл/мин,

воздух- 300 мл/мин,

температура:

крана-дозатора- не обогревается,

колонки- 70⁰С,

метанатора- 320⁰С,

ПИД- 150⁰С.

Длительность анализа не превышает 5 минут.

3.3 Включение хроматографа и оценка его состояния

3.1.1. Подать из баллона с азотом газ-носитель, включить генератор водорода, компрессор воздуха.

3.1.2. Включить хроматограф в электросеть и через компьютер загрузить в хроматограф рабочий режим.

3.1.3. После выхода хроматографа в рабочий режим оценить фоновый сигнал ПИД, записать холостую хроматограмму и оценить величину шумов нулевой линии.

3.4 Градуировка хроматографа

Ввести в хроматограф поверочную газовую смесь (ПГС), содержащую СО и метан, записать хроматограмму, обработать ее и занести полученный результат в градуировку.

3.5 Проведение рабочего анализа

Набрать в шприц объемом 20 мл воздух в рабочем помещении, продуть из него кран-дозатор и ввести пробу в хроматограф. После записи хроматограммы провести ее обработку и оценить наличие (отсутствие) СО в пробе.

Набрать в шприц объемом 20 мл воздух вблизи выхлопной трубы работающего автомобиля, надеть на канюлю заглушку, принести пробу в лабораторию, продуть пробой кран-дозатор и ввести пробу в хроматограф. После записи хроматограммы провести ее обработку и оценить полученный результат.

Владимир Иванович Логутов

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
для проведения практического занятия в лаборатории хроматографии
по дисциплине «ЭКОЛОГИЯ»**

Учебно-методическое пособие

федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»

603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23