

INŠTRUMENTÁCIA PRE RÝCHLU PLYNOVÚ CHROMATOGRAFIU

PETER KORYTÁR a EVA MATISOVÁ

*Katedra analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: matisova@chtf.stuba.sk*

Došlo dňa 2.X.2000

Kľúčové slová: rýchla plynová chromatografia, inštrumentácia, detektory, kolóny, dávkovacie zariadenia

Obsah

1. Úvod
2. Inštrumentácia v rýchlej plynovej chromatografii
 - 2.1. Regulátory tlaku nosného plynu
 - 2.2. Dávkovacie zariadenia
 - 2.3. Kolóny
 - 2.4. Termostat
 - 2.5. Detektory
3. Záver

1. Úvod

Z teoretického odvodu závislosti času analýzy od chromatografických parametrov, ktoré sme publikovali v predchádzajúcom článku¹ vyplýva, že najefektívnejším spôsobom zvyšovania rýchlosti analýzy je použitie veľmi tenkých kolón („narrow-bore columns“) s tenkým filmom stacionárnej fázy v kombinácii s vodíkom ako nosným plynom. Ďalej z tohto článku vyplýva, že so zmenšovaním priemeru kolón sa zvyšujú požiadavky na inštrumentáciu. Aby ostala účinnosť kolón zachovaná, dávkovacie systémy musia poskytovať úzku vstupnú zónu a detektory musia mať malý mŕtvy objem. Šírka pík je malá, preto detektory musia mať dostatočne rýchly zber údajov, aby boli schopné popísať pík dostatočným počtom bodov. Analýzy trvajú poriadkovo desiatky sekúnd – niekoľko minút, preto výkonnosť termostátov kolón musí byť podstatne vyššia. Ďalším dôsledkom použitia veľmi tenkých kolón je potreba vyšších vstupných tlakov, čo zvyšuje požiadavky na regulátory tlaku a prietoku.

V tomto prehľadovom článku chceme nadviazať na teóriu rýchlej GC (cit.¹), prakticky vysvetliť vplyv kolón a nosného plynu na rýchlosť analýzy, zhodnotiť vhodnosť konvenčnej inštrumentácie pre rýchlu GC a poskytnúť čitateľom prehľad o novej inštrumentácii vyvinutej špeciálne pre rýchlu GC.

2. Inštrumentácia v rýchlej plynovej chromatografii

Každý plynový chromatograf je kombináciou pneumatického systému, ktorý slúži na dopravu pracovných plynov

(nosného a plynov pre detektor) pri požadovanom tlaku a prietoku; teplotného systému, ktorý zabezpečuje obsluhu termostatu a vyhrievaných zón pre dávkovač a detektor; a elektronického systému, ktorý riadi synchronizáciu činnosti všetkých častí chromatografu a tiež zabezpečuje meranie a spracovanie signálu detektora. Obsahuje nasledujúce hlavné časti: zásobník plynnej fázy, zariadenie na reguláciu tlaku resp. prietoku plynnej fázy, dávkovacie zariadenie, chromatografickú kolónu, termostat, detektor, zariadenie na spracovanie signálu detektora a jeho záznam a zariadenie na vyhodnotenie analýzy.

2.1. Regulátory tlaku nosného plynu

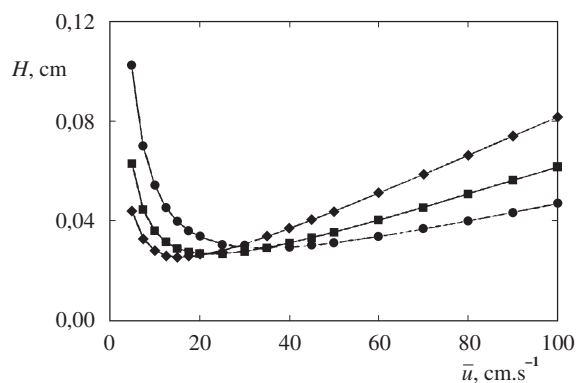
Nosný plyn

Hélium, dusík a vodík sú tri plyny najčastejšie používané v kapilárnej plynovej chromatografii. Hélium je pravdepodobne na 1. mieste, pretože je kompatibilné so všetkými detektormi (aj hmotnostným detektorom, atómovým emisným detektorom, infračerveným detektorom s Fourierovou transformáciou). Avšak cena hélia je podstatne vyššia ako ceny ostatných plynov. Hélium a dusík sú netoxické, nehorľavé a veľmi bezpečné pri používaní. Na druhej strane vodík tvorí so vzduchom výbušnú zmes, a preto z bezpečnostného hľadiska môže byť použitie vodíka v priemysle rizikové. Z teórie ale jasne vyplýva, že vodík poskytuje dôležité výhody oproti héliu a dusíku, a to v rýchlosti analýzy, citlivosti a rozlíšení na jednotku času¹.

Účinnosť chromatografickej kolóny môžeme vyjadriť počtom teoretických priehradiek (N) alebo výškovým ekvivalentom teoretickej priehradky ($H = L/N$, kde L je dĺžka kolóny). Výškový ekvivalent teoretickej priehradky je funkciou priemernej rýchlosti nosného plynu ($\bar{u}$), ktorú popisuje pre kapilárne kolóny Golayova-Giddingsova rovnica^{2,3}. Táto závislosť je komplexnou funkciou priemeru kolóny (d_c), hrúbky stacionárnej fázy (d_f), kapacitného faktora (k) a difúzných koeficientov analytu v mobilnej a stacionárnej fáze. Pre danú kolónu (L , d_c , d_f , stacionárna fáza) a daný analyt (k) získame pre tri rôzne plyny (vodík, dusík a hélium) tri rôzne $H - \bar{u}$ krivky (obr. 1).

Z týchto kriviek vyplýva niekoľko dôležitých skutočností⁴:
– Pre všetky nosné plyny je minimálna hodnota H ($H_{\min}$) takmer nezávislá od typu nosného plynu. To znamená, že všetky tri plyny dávajú približne rovnakú účinnosť a rozlíšenie, ak je priemerná rýchlosť nosného plynu nastavená na optimum ($\bar{u}_{\text{opt}}$). Táto skutočnosť platí pre kapilárne kolóny s pomerom vnútorný priemer/hrúbka filmu > 400 (fázový pomer $\beta > 100$). Minimálna hodnota $H - \bar{u}$ krivky je približne 0,25 mm pre kolónu s priemerom 0,25 mm (H je približne rovné priemeru kolóny). Len pre hrubé filmy (vnútorný priemer/hrúbka filmu < 400 alebo $\beta < 100$) poskytuje dusík vyššiu účinnosť pre optimálnu rýchlosť.

– Optimálna rýchlosť plynu je vyššia pre vodík ako pre hélium alebo dusík. Pre štandardné kapilárne kolóny (10–50 m $\times$ 0,25–0,32 mm i.d. $\times$ 0,1–0,5 μm d_f) je $\bar{u}_{\text{opt}}$ pre vodík



Obr. 1. $H - \bar{u}$ krivky pre nosné plyny vodík, hélium a dusík. Namerané pre analyt s $k = 10$ pri teplote $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ na kolóne $25\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$ i.d. $\times 0,1\text{ }\mu\text{m}$; $\bullet$ H_2 , $\blacksquare$ He , $\blacklozenge$ N_2

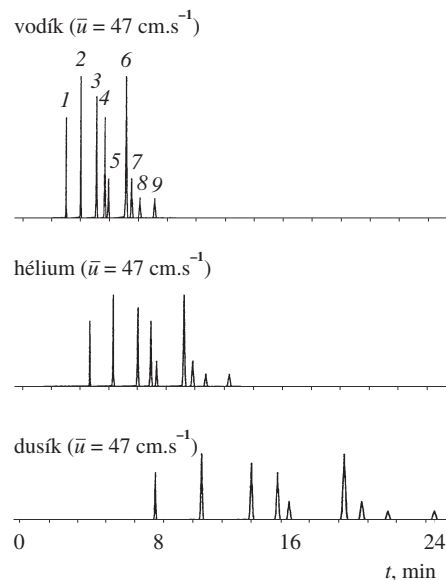
40 cm.s^{-1} , pre hélium 27 cm.s^{-1} a pre dusík 12 cm.s^{-1} . Pri optimálnej rýchlosti je tak vodík 1,5× rýchlejší ako hélium a 3,3× rýchlejší ako dusík, pričom výškový ekvivalent teoretickej priehradky je približne rovnaký.

– Strmosť $H - \bar{u}$ kriviek je v takomto poradí: dusík > hélium > vodík. To znamená, že pri práci s vyššou rýchlosťou plynu ako $\bar{u}_{\text{opt}}$ je rýchly pokles účinnosti (vyššie H), keď sa použije dusík. Naopak pri vodíku môže byť rýchlosť plynu zvýšená bez príliš veľkej straty účinnosti. Hélium, ako vidíme z obrázku, má strednú strmosť. Strmosť $H - \bar{u}$ krivky je špeciálne dôležitá pre rýchlu GC. So znižovaním priemeru kolóny klesá strmosť $H - \bar{u}$ krivky, krivka sa stáva plytkejšou a zvyšuje sa hodnota optimálnej rýchlosti. Preto rýchlosť nosného plynu môžeme zvyšovať bez výrazného zníženia účinnosti.

Ak sa na detekciu používajú detektory citlivé na hmotnostný tok, akými sú plameňovoionizačný detektor (FID) alebo termoionizačný detektor (NPD), citlivosť analýzy závisí od množstva analytu, ktoré vstúpi do detektora za jednotku času. Skôr eluujúci pík sa prejaví vyššou citlivosťou, ako neskôr eluujúci širší pík. Preto rýchla GC v kombinácii s vodíkom poskytuje najvyššiu citlivosť.

Praktická ilustrácia výhod vodíka oproti iným nosným plynom je uvedená na obr. 2, kde sú zobrazené chromatografické záznamy pre všetky tri plyny. Pre každý plyn bol nastavený optimálny prietok pre príslušnú kolónu. Ako vidíme, obrázok jasne ilustruje teoretické predpoklady, že strata rozlíšenia pri zmene nosného plynu z dusíka na vodík je veľmi malá, zatiaľ čo dochádza k podstatnému zrýchleniu analýzy. Ďalšou výhodou, ktorá je dobre viditeľná na obr. 2, je zvýšenie citlivosti pri plyne s nižšou mólou hmotnosťou.

Aj napriek uvedeným jednoznačným výhodám vodíka je jeho používanie nepopulárne. Najdôležitejšou príčinou, prečo sa analytici bránia používať vodík ako nosný plyn, je fakt, že vodík vytvára výbušné zmesi so vzduchom (pri koncentrácii vodíka > 4 %). Táto zmes môže po zapálení iskrou alebo plameňom explodovať. V skutočnosti však riziko explózie je nízke, a to z nasledujúcich dôvodov. V porovnaní so sklenými kolónami je prasknutie kremenných kolón veľmi nepravdepodobné. Prietoky nosného plynu používané v kapilárnej GC sú v rozsahu ml.min^{-1} , a preto možnosť nahromadenia vodíka v koncentrácii vyššej ako kritická koncentrácia je veľmi malá.



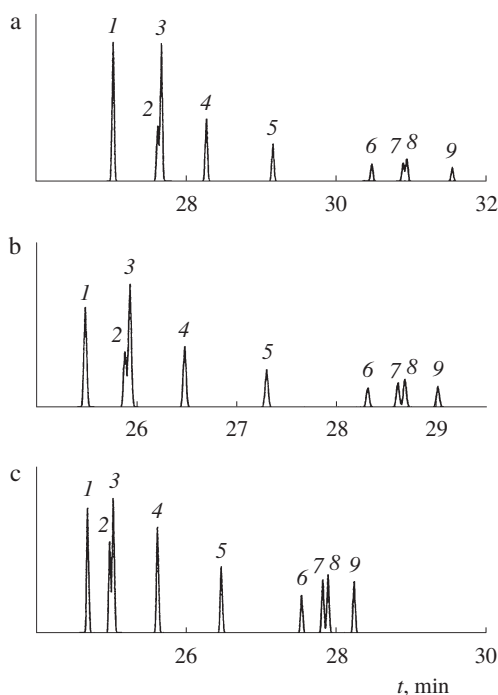
Obr. 2. Vplyv nosného plynu na rýchlosť separácie. Kolóna CPSil5CB $50\text{ m} \times 0,32\text{ mm}$ i.d. $\times 1,2\text{ }\mu\text{m}$; identifikácia pík: 1 – benzén, 2 – toluén, 3 – vinylcyklohexén, 4 – etylbenzén, 5 – *m*-xylén, 6 – styrén, 7 – izopropylbenzén, 8 – benzaldehyd, 9 – *n*-propylbenzén

Naviac, difúzia vodíka je veľmi rýchla. Ak sa dodržia bezpečnostné opatrenia počas inštalácie rozvodu plynov a kolóny (používanie nových a čistých feruliek, skrutiek a medených trubiek, vykonanie testu tesnosti atď.) a počas analýzy (údržba dávkovačov a detektorov), môže byť vodík používaný ako nosný plyn bez akýchkoľvek problémov. Naviac súčasné chromatografy, ktoré používajú elektronickú kontrolu prietokov plynov, poskytujú prácu v tzv. móde šetrenia plynu (gas saver mode) a bezpečnostné vypnutie prívodu plynu, ak dôjde k poklesu tlaku. A nakoniec, používanie generátorov vodíka znižuje nebezpečenstvo vyplývajúce zo skladovania a manipulácie s vodíkovými fľašami.

Regulátory tlaku

Chromatografické analýzy sa donedávna vykonávali výlučne pri konštantnom vstupnom tlaku. Pri týchto podmienkach však nie je možné udržať konštantný prietok, a teda ani konštantnú rýchlosť plynu cez kolónu, ak sa pracuje s programovanou teplotou. Viskozita plynu stúpa so zvyšovaním teploty približne o 0,2–0,3 % na stupeň, čo spôsobuje, že so zvyšovaním teploty klesá prietok plynu cez kolónu. To má za následok okrem predĺženia času analýzy aj zníženie odozvy detektora a stratu účinnosti, ak sa rýchlosť plynu dostane pod optimálnu rýchlosť⁵.

Moderné prístroje však obsahujú elektronickú kontrolu tlaku plynov, ktorá umožňuje plynule meniť tlak na hlave kolóny počas analýzy. To dovoľuje pracovať s konštantným prietokom plynu počas celej analýzy aj pri programovanej teplote (so zvyšovaním teploty sa zvyšuje tlak na hlave kolóny), alebo dokonca programovať prietok plynu cez kolónu. Na obr. 3 (cit.⁵) môžeme vidieť, ako sa zrýchli analýza pri využití možnosti elektronickej kontroly tlaku. Okrem zrýchlenia analýzy sa zvýši aj odozva detektora a rozlíšenie.



Obr. 3. Použitie elektronickej kontroly tlaku. Identifikácia pík: 1 – dioktylfталát, 2 – benzo[*b*]fluorantén, 3 – 7,12-dimetylbenzo[*n*]antracén, 4 – benzo[*a*]pyrén, 5 – 3-metylcholantén, 6 – dibenzo[*a,j*]antracén, 7 – inden[1,2,3-*cd*]pyrén, 8 – dibenzo[*a,h*]antracén, 9 – benzo[*g,h,i*]perylén. Chromatografické podmienky: hmotnostný detektor; split/splitless dávkovač v splitless móde; teplotný program 35 °C.min⁻¹ (1 min) do 310 °C pri 10 °C.min⁻¹. a – Chromatogram 1: konštantný tlak 14 psi; b – chromatogram 2: mód konštantného prietoku (14 psi pri 35 °C); c – chromatogram 3: tlakový program 14 psi (0 min) do 50 psi pri 2 psi.min⁻¹

Dôležitou charakteristikou regulátorov tlaku (či klasických alebo elektronickej) vzhľadom na rýchlu plynovú chromatografiu je to, aký je maximálny výstupný tlak z regulátora. Keďže v rýchlej GC sa používajú veľmi tenké kolóny (i.d. menší ako 0,1 mm) je potrebný podstatne vyšší tlak na dosiahnutie optimálnej rýchlosti plynu cez kolónu ako pri konvenčných kolónach. Napr. kolóna 6 m × 0,1 mm i.d. vyžaduje pre dosiahnutie optimálneho prietoku plynu vstupný tlak vodíka okolo 40–50 psi. Treba tiež pripomenúť, že v rýchlej GC sa často pracuje pri vyšších rýchlostiach, ako je optimálna rýchlosť plynu. Ak chceme pracovať pri konštantnom prietoku nosného plynu, dôležitým parametrom elektronickej kontroly tlaku sa stáva aj maximálna rýchlosť nárastu tlaku. V rýchlej GC, kde sa používa rýchly nárast teploty (> 50 °C.min⁻¹), sa väčšinou pracuje pri konštantnom tlaku, lebo neexistuje taký výkonný elektronickej regulátor tlaku.

2.2. Dávkovacie zariadenia

Dávkovanie vzorky predstavuje jednu z najkritickejších operácií v kapilárnej plynovej chromatografii, ktorá ovplyvňuje okrem výsledku kvantitatívnej analýzy taktiež aj účinnosť celého separačného systému. Vo všeobecnosti musí dávkovací systém spĺňať nasledujúce kritériá⁶:

- zloženie vzorky vstupujúcej do kolóny musí byť totožné s pôvodnou vzorkou,
- množstvo vzorky vstupujúcej do kolóny musí byť dobre definované a reprodukovateľné,
- retenčné časy musia byť reprodukovateľné,
- tepelná degradácia, adsorpcia alebo iné reakcie analytov musia byť zanedbateľné,
- dávkovací systém nesmie ovplyvňovať účinnosť kolóny.

Práve táto posledná požiadavka je v rýchlej GC najkritickejšia, lebo ako vyplýva z teórie rýchlej GC¹, tenké kolóny vyžadujú veľmi úzku vstupnú zónu. Zvýšený vstupný tlak, ktorý je potrebný pri používaní veľmi úzkych kolón, je ďalšou komplikáciou pre dávkovací systém. V ďalšom texte budú popísané možnosti konvenčných dávkovačov (split/splitless, on-column, PTV) pre dávkovanie v rýchlej GC a predstavené dávkovače vyvinuté špeciálne pre rýchlu GC.

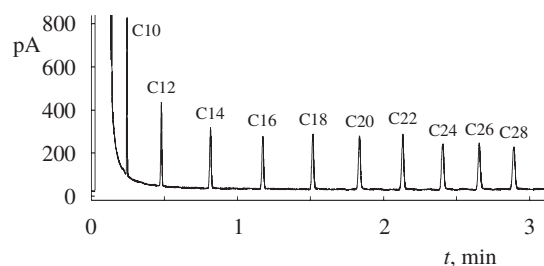
„Split/Splitless“ dávkovanie

Pri dávkovaní plyných vzoriek technikou s deličom (split) je šírka vstupnej zóny daná rýchlosťou dávkovania a rozšírením zóny v dávkovači. Rozšírenie zóny v dávkovači sa môže eliminovať zvýšením prietoku cez deliaci ventil. Pri dostatočne vysokom prietoku (>1 l.min⁻¹) môžeme dosiahnuť šírku vstupnej zóny okolo 3 ms, a to s automatickým aj manuálnym dávkovaním⁶. Takáto úzka vstupná zóna je porovnateľná so šírkou zóny, ktoré dosiahneme použitím špeciálnych dávkovačov (napr. „fluid logic“ dávkovač). Keď zanedbáme čas potrebný na vyparenie vzorky, šírka vstupnej zóny pre kvapalné vzorky môže byť tiež veľmi malá. Prvý rýchly spôsob dávkovania publikovali Desty a Goldup⁷ už v roku 1960. Na stlačenie piestika použili gumené kladivko, a týmto spôsobom dosiahli šírku vstupnej zóny okolo 20 ms. V súčasnosti takýto výsledok môžeme dosiahnuť komerčnými rýchlymi automatickými dávkovačmi. Hoci skutočný čas dávkovania a rozšírenie v dávkovacom systéme s deličom môže byť veľmi malé, čas potrebný na vyparenie vzorky obvyčajne nemôžeme zanedbať. Čas potrebný na vyparenie (t_v) môžeme vyjadriť nasledovne:

$$t_v = n \frac{V_m}{F_s} \left[\frac{p_i}{p_v} \right]^a$$

kde p_i je vstupný tlak, p_v je tlak pár pri teplote detektora, n počet mólov prítomných vo vzorke, V_m mólový objem plynu a F_s je prietok cez deliaci ventil. Ak $p_i > p_v$, potom $a = 1$, inak $a = 0$. Merania, ktoré uskutočnil Schutjes⁸, ukazujú, že pri dávkovaní n -C₁₅ pri teplote $T = 300$ °C, $F_s = 500$ ml.min⁻¹ a $p_i = 11$ barov je šírka vstupnej zóny stále 0,5 s. Dôvodom, prečo sa dávkovanie s deličom stále v rýchlej GC používa, je skutočnosť, že pri programovanej teplote kolóny sa vstupná zóna zúži tzv. tepelnou fokusáciou pri nízkej počiatkovej teplote.

Možnosti dávkovania v móde bez delenia vzorky (splitless) študovali Van Ysacker a spol.⁹ V tejto práci zdôrazňujú, že aj napriek malým prietokom cez kolónu môže byť čas uzatvorenia deliaceho ventilu prekvapivo nízky, ak sa použije vložka (liner) s malým vnútorným priemerom.



Obr. 4. Chromatogram zmesi *n*-alkánov ($8 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) v pentáne. Dávkované manuálne $1 \mu\text{l}$; podmienky: program 80°C do 300°C pri $65^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, nosný plyn H_2 pri tlaku 689 kPa , detektor FID pri 280°C , dávkovač on-column v móde oven track

„On-column“ dávkovanie

Pri dávkovaní do kolóny (on-column) sa vzorka dávkuje priamo do kolóny bez splyňovacieho medzikroku. Avšak priame dávkovanie vzorky do kolóny už so špeciálnymi striekačkami umožňuje dávkovať len do kolón s priemerom do $0,200 \text{ mm}$. Kolóny s menším priemerom sa môžu použiť len v spojení s predkolónou s väčším priemerom. Avšak rozdiel hrúbok medzi kolónou a predkolónou nemôže byť veľmi veľký, lebo v predkolóne dochádza k rozširovaniu zóny, ktoré sa môže kompenzovať len čiastočne tzv. „solvent“ efektom alebo „trapping“ efektom. Kombinácia on-column dávkovania a rýchlej GC bola publikovaná v článku Van Ysackera a spol.⁹ a v článku Korytár a spol.¹⁰ Na obr. 4 je zobrazený chromatografický záznam z poslednej citácie, ktorý okrem reálnosti použitia on-column dávkovania v kombinácii s rýchlou GC demonštruje aj možnosť dávkovania veľkých objemov v rýchlej GC.

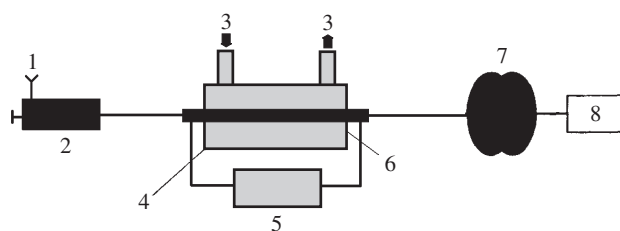
Dávkovač s programovanou teplotou vyparovania (PTV)

V princípe tento dávkovač akceptuje kolóny s ľubovoľným priemerom (na rozdiel od on-column dávkovača), ale jeho kompatibilita s tenkými kolónami závisí od šírky vstupnej zóny, ktorú tento dávkovač poskytuje. Šírka vstupnej zóny PTV systému je vyššia, ako vyžadujú veľmi tenké kolóny ($<0,1 \text{ mm}$). Tak ako pri dávkovaní s deličom, kompatibilitu s týmito kolónami môžu zabezpečiť fokusačné techniky⁶. Napríklad kombinácia PTV dávkovača s kolónou $10 \text{ m} \times 0,1 \text{ mm}$ poskytuje veľmi dobré výsledky.

Dávkovanie cez ventily

Pre dávkovanie v rýchlej plynovej chromatografii je možné použiť rôzne formy ventilov. Pre dávkovanie plyných vzoriek Gaspar a spol.¹¹ použili tzv. „fluid logic“ ventil, kde sa prepínanie toku medzi dvoma výstupmi dosahuje zmenou tlaku na postranných vstupných otvoroch (Coanda efekt). Jonker a spol.¹² použili na dávkovanie plynov (*n*-alkánov $\text{C}_1\text{--C}_4$) rotačný ventil a dosiahli dodnes najrýchlejšiu separáciu na náplňovej kolóne¹. Tijssen a spol.¹³ a Peters a spol.¹⁴ vyvinuli pre dávkovanie plyných vzoriek špeciálny dávkovací ventil, ktorým je možné dosiahnuť šírku vstupnej zóny $2\text{--}5 \text{ ms}$.

Na dávkovanie kvapalných vzoriek bol použitý vysokotla-



Obr. 5. Základné usporiadanie vymrazovacieho dávkovača s následnou termodesorpciou. 1 – Nosný plyn, 2 – konvenčný dávkovač, 3 – chladiaci plyn, 4 – chladiaci plášť, 5 – zdroj napätia, 6 – trubica zachytávača, 7 – kolóna, 8 – detektor

kový dávkovací ventil^{15–17}, aký sa používa v superkritickéj fluidnej chromatografii. Objem vzorky kolíše od 40 do 200 nL , a týmto spôsobom možno dosiahnuť šírku zóny poriadkovo v milisekundách.

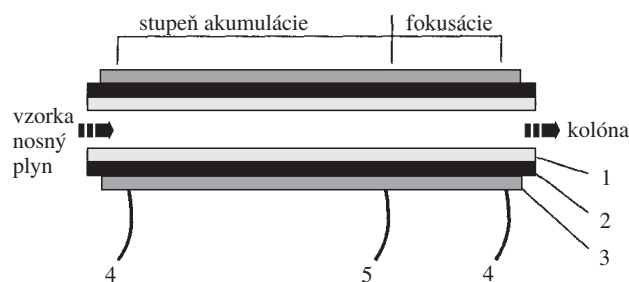
Fokusačné dávkovacie systémy

Tento spôsob dávkovania je v rýchlej GC veľmi frekvencovaný. Typická schéma takéhoto zariadenia je na obr. 5 (cit.^{18,19}). Vzorka je nadávkovaná do klasického dávkovača s deličom, alebo pre plyné vzorky možno použiť aj klasický šesťcestný ventil. Pary vzorky ďalej vstupujú z ľavej strany do fokusačného systému a fokusujú sa kondenzovaním v zachytávacej trubici, ktorá je zvonku chladená chladiacim plynom (CO_2 , N_2). Po naakumulovaní vzorky v trubici je trubica rýchlo odporovo vyhriata a vzniknuté pary sú vnesené do kolóny nosným plynom. Trubice sú najčastejšie vyrobené zo zliatiny $\text{Cu}(30\%)\text{--Ni}(70\%)$ alebo nehrdzavejúcej ocele.

Použitie takýchto kovových trubic má nevýhodu v tom, že pri prudkom vyhrievaní môže v nich dochádzať ku katalyzovanému termickému rozkladu analytov. Li a Andrew²⁰ navrhli ako riešenie rôzne spôsoby deaktivácie týchto trubic. Iný spôsob, ako predísť rozkladu zložiek, navrhli Klemp a spol.²¹ Na akumuláciu vzorky použili spätný tok plynu cez zachytávaciu trubicu. Spätný tok zabezpečuje vákuová pumpa, ktorá ťahá vzorku do kovového vymrazovača. Po skončení akumulácie sa prívod ku vzorke a k vákuu uzavrie a zachytávací trubicu sa natlakuje nosným plynom. Tento proces obráti tok v zachytávacej trubici a trubicu je potom odporovo vyhriata a vzorka je nadávkovaná do kolóny. Pretože vzorka je akumulovaná aj dávkovaná z toho istého konca trubicu, pary nepriechádzajú do styku s celou dĺžkou zachytávacej trubicu, čo eliminuje rozklad vzorky a významne znižuje mŕtvý objem trubicu.

Ku kvantitatívnej akumulácii vo fokusačnom systéme dochádza len pre analyty, ktoré sú menej prchavé ako benzén. Pre prchavejšie látky (napr. hexán) bol zaznamenaný prienik analytov cez zachytávaciu trubicu. Kvantitatívne zachytenie prchavých analytov sa dá dosiahnuť použitím elektronickej kontroly tlaku, ktorá umožní znížiť prietok počas akumulácie²⁰. Iný spôsob eliminácie prieniku analytov cez zachytávaciu trubicu je použiť trubicu, ktorá je pokrytá pórovitým polymérom alebo Al_2O_3 (cit.²²).

Phillips a Liu²³ vyvinuli dvojstupňový termický modulátor, ktorý je zobrazený na obr. 6. Toto zariadenie využíva na akumuláciu a fokusáciu vzorky kremennú kolónu so stacio-



Obr. 6. Fokusačné dávkovacie zariadenie pre „HSGC“ – dvojstupňový termický modulátor. 1 – Stacionárna fáza, 2 – kremenné sklo, 3 – kovový povlak, 4 – napojenie zdroja, 5 – uzemnenie

nárnou fázou. Aby bola akumulácia a predkoncentrácia vzorky účinná, kapacitný faktor v štádiu akumulácie musí byť dostatočne veľký. Takáto podmienka sa dá dosiahnuť použitím hrubej vrstvy stacionárnej fázy alebo zníženou teplotou. Pretože kapacitný faktor má veľkú hodnotu, migrácia vzorky je pomalá. Predtým, ako by vzorka začala prechádzať do druhého stupňa, je akumulácia časť kolóny prudko vyhriata, čím sa výrazne zníži hodnota kapacitného faktora. Fokusačná časť kolóny sa používa na zosťrenie zóny pár a zvýšenie priemernej koncentrácie. Druhý stupeň zostáva chladný počas vyhrievania vzorky v prvom stupni. Pary sa na krátky čas zachytia v druhom stupni modulátora a potom je vyhriaty aj druhý stupeň a pary vzorky vstupujú do kolóny. Termický modulátor môže byť vyhrievaný prechodom prúdu cez kovovú vrstvu nanosenú na vonkajšom povrchu kolóny²⁴, alebo posunom vyhrievacieho elementu pozdĺž kolóny²⁵.

Dávkovanie z vlákna SPME

Mikroextrakciu tuhú fázou (SPME) ako dávkovaciu techniku pre rýchlu GC organochlórových pesticídov použili Jackson a Andrews²⁶. Použili konvenčný dávkovač s deličom a za ním bol zaradený vymrazovač s termodesorpciou.

Górecki a Pawliszyn²⁷ vyvinuli pre dávkovanie z vlákna SPME nový typ dávkovača. Funkciu vložky (liner) plnil kus kremennej kapiláry s priemerom 0,53 mm, ktorá bola pripojená k analytickej kolóne. Vyhrievanie dávkovača zabezpečovalo odporové vlákno (45 % Ni–55 % Cu) navinuté okolo kapiláry. Rozmery dávkovača boli prispôbené tak, aby pri dávkovaní bolo SPME vlákno vo vyhrievanej časti kremennej kapiláry. Týmto zariadením sa dávkovanie môže uskutočniť dvoma spôsobmi. V prvom prípade sú analyty desorbované rýchlym vysunutím SPME vlákna do vopred vyhriateho dávkovača. V druhom prípade sú analyty desorbované rýchlym vyhriatím dávkovača. Nastavená teplota 350 °C sa dosiahne za 300 ms.

Rýchla desorpcia analytov z SPME vlákna sa dá dosiahnuť nielen vyhriatím dávkovača, ale aj priamym vyhriatím vlákna²⁸. Vlákno bolo v tomto prípade vyrobené z kremennej kapiláry s priemerom 0,32 mm a do tejto kapiláry bol vložený vyhrievač, vyrobený navinutím tenkého odporového vlákna okolo inej kremennej kapiláry (vonkajší priemer 0,15 mm). Takýmto vnútorne vyhrievaným vláknom sa môže dávkovať priamo do kolóny (on-column).

2.3. Kolóny

Zmenou každého parametra kolóny, ako je dĺžka, priemer a hrúbka filmu stacionárnej fázy, môžeme výrazne ovplyvniť rýchlosť analýzy. Najjednoduchším spôsobom výrazného skrátenia analýzy je skrátenie kolóny. Tento spôsob však môžeme použiť len vtedy, keď si môžeme dovoliť znížiť účinnosť kolóny, lebo počet teoretických priehradiek je priamo úmerný dĺžke kolóny. To znamená, že skrátením kolóny znížime separačnú účinnosť kolóny. Na druhej strane, ak postačuje na separáciu menej teoretických priehradiek, kratšia kolóna môže byť dobrým spôsobom zrýchlenia analýzy.

Oveľa efektívnejší spôsob zrýchlenia analýzy je použitie kolóny s menším priemerom, tak ako to vyplýva z teórie rýchlej GC¹. Zmenšením vnútorného priemeru sa zvýši separačná účinnosť kolóny. Počet teoretických priehradiek je nepriamoúmerný vnútornému priemeru kolóny²⁹. To znamená, ak sa zmenší priemer kolóny 2×, počet teoretických priehradiek sa zvýši tiež 2×. Tabuľka I stručne sumarizuje dĺžky kapilárnych kolón, ktoré poskytujú 100 000 teoretických priehradiek. Ako môžeme vidieť, znížením vnútorného priemeru môžeme skrátiť kolónu bez toho, aby sme stratili separačnú účinnosť.

Tabuľka I

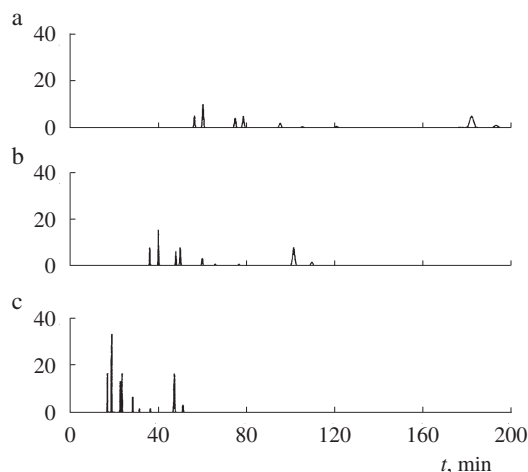
Vplyv priemeru kolón (i.d., mm) na dĺžku kolón L (m) (pri konštantnom počte teoretických priehradiek $n = 100\,000$) a priemernú rýchlosť nosného plynu $\bar{u}$ (hélie, cm.s⁻¹).

i.d.	L (pre $n = 100\,000$)	$\bar{u}$
0,53	50	23
0,25	25	33
0,15	15	36
0,10	10	40

Ďalší efekt, ktorý pracuje pre náš prospech, je optimálna hodnota lineárnej rýchlosti nosného plynu. So znižovaním priemeru kolóny klesá strmost $H - u$ krivky, krivka sa stáva plytkejšou a zvyšuje sa hodnota optimálnej rýchlosti. Preto rýchlosť nosného plynu môžeme zvyšovať bez výrazného zníženia účinnosti. Niektoré typické hodnoty pre hélium sú uvedené v tabuľke I. Okrem toho, môžeme pracovať aj pri vyšších rýchlostiach ako je u_{opt} a strata účinnosti je podstatne menšia ako pri hrubších kolónach.

Kombináciou týchto charakteristík získame signifikantné zníženie času analýzy. Obr. 7 demonštruje zrýchlenie analýzy so zmenšením priemeru a dĺžky kolóny⁵.

Zmenšovanie priemeru kolóny má však aj negatívny vplyv na analýzu. So zmenšovaním priemeru kolóny sa zmenšuje aj kapacita kolóny ($Q_{max} \propto d_c^3$), a ako demonštruje vzťah v zátvorkách, veľmi výrazne^{30,31}. Preto pre praktické analýzy môžeme zmenšovať priemer kolóny maximálne do 0,050 mm. Tenšie kolóny už majú veľmi nízku kapacitu a sú nevhodné pre každodenné analýzy. Riešenie ponúka firma Alltech, ktorá ponúka tzv. multi-kapiláru³², ktorá je zložená z 900 tenkých kapilár s priemerom 40 μ m a každá je potiahnutá stacionárnou fázou. V porovnaní s klasickými kapilármi, multi-kapilára má porovnateľnú účinnosť, ale ďaleko vyššiu kapacitu. Aby



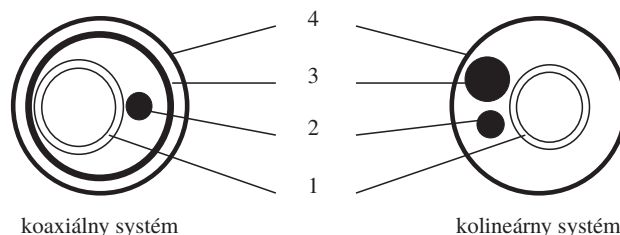
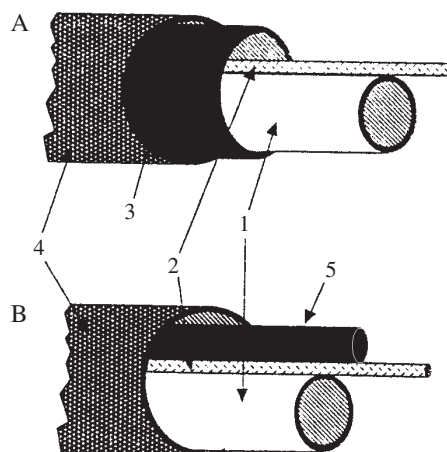
Obr. 7. Vplyv vnútorného priemeru kolóny na separačnú rýchlosť. a – Kolóna 1: 21 m × 0,32 mm, b – kolóna 2: 16 m × 0,25 mm, c – kolóna 3: 10 m × 0,15 mm

multi-kapilára poskytovala maximálnu účinnosť, musí spĺňať niekoľko striktných požiadaviek. Napríklad, každá z 900 kapilár musí mať presne rovnaký priemer. Ak tomu tak nie je, môže to zapríčiniť rozširovanie zóny. Ďalším dôležitým parametrom, ktorý musí zostať konštantný, je dĺžka a hrúbka filmu stacionárnej fázy všetkých 900 kapilár³³.

2.4. Termostat

Z pohľadu rýchlej GC sú dôležité tieto parametre termostatu: rýchlosť ohrievania a rýchlosť chladenia chromatografickej pece. Doba trvania analýzy v rýchlej GC je krátka, poriadkovo desiatky – stovky sekúnd. Preto sú potrebné vyššie rýchlosti ohrevu pece, aby za tento krátky čas bolo vôbec možné zrealizovať teplotný program. Dosiahnuť vyššie rýchlosti s klasickou pecou je obtiažne kvôli jej veľkému objemu. Hoci dovoľujú nastaviť dosť vysoké rýchlosti ohrevu (okolo 100 °C.min⁻¹), reálne však prístroj nestíha dosiahnuť naprogramovanú teplotu v celej šírke teplotného rozpätia. Možnosťou, ako zvýšiť rýchlosť ohrevu, je zmenšiť objem pece, napr. vloženie izolačného vankúša do pece zo strany dvierok³⁴. Potom je potrebné kolónu pripojiť na zadný dávkovač a detektor. Avšak ani týmto spôsobom nezískame významné zvýšenie rýchlosti ohrevu. Väčšina aplikácií, ktoré používajú veľmi rýchle programovanie teploty, používa nekonvenčné vyhrievacie zariadenia. V týchto zariadeniach je kolóna umiestnená v kovovom rukáve, ktorý je odporovo vyhrievaný.

Jain a Phillips³⁵ vo svojej práci popísali spôsob rýchleho programovania teploty v plynovej chromatografii. Kolóna je vyhrievaná elektrickým prúdom, ktorý prechádza cez tenký vodivý film nanesený na vonkajšej stene kremenných kapilár. Hrúbka vrstvy je veľmi malá (10 až 25 µm) s nízkou tepelnou kapacitou, čo umožňuje rýchle vyhriatie aj ochladenie. Takéto kolóny vyrábali vo svojom laboratóriu. Na kolónu naniesli elektricky vodivý náter a čerstvo natretú kolónu nechali sušiť pri 70–80 °C 10 hod. Procedúra nanášania a sušenia má veľký vplyv na stabilitu vodivej vrstvy a životnosť takejto kolóny. Uvedení autori vo svojej ďalšej práci³⁶ vyvinuli techniku, ktorá



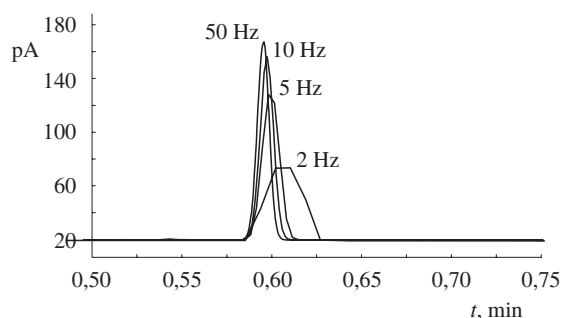
Obr. 8. (A) Koaxiálny ohrievač kolóny; (B) kolineárny ohrievač kolóny. 1 – Kolóna, 2 – senzorový drôt, 3 – kovová trubica, 4 – izolácia (teflón), 5 – vyhrievací drôt

aplikuje súčasne teplotný gradient v čase aj v priestore (pozdĺž kolóny). Teplotný gradient pozdĺž kolóny je spôsobený existenciou gradientu odporu pozdĺž kolóny, ktorý je zabezpečený rozdielnou hrúbkou vodivého filmu na kolóne. Koniec kolóny je potiahnutý hrubšou vrstvou než jej začiatok (na hlave kolóny je teda väčší odpor ako na konci kolóny), a preto teplota na začiatku kolóny je vždy väčšia ako na konci. Teplotný gradient pozdĺž kolóny plynule refokusuje chromatografickú zónu, a tak pôsobí proti jej rozširovaniu.

Overton a spolupracovníci³⁷ vyvinuli iné zariadenie na rýchle programovanie teploty. Na obr. 8 sú zobrazené dve rôzne konfigurácie tohto zariadenia. V koaxiálnom usporiadaní je kolóna spolu s odporovým senzorom (cievkou) vložená do tenkostennej trubice z nehrdzavejúcej ocele, ktorá je potiahnutá strieborným filmom. Kolineárne usporiadanie je podobné, len vyhrievacia kovová trubica je nahradená niklovou vyhrievacou cievkou. Tieto zariadenia majú spotrebu elektrickej energie len 60 W. Teplotný program je ovládaný programom a maximálna kontrolovaná rýchlosť ohrevu je najmenej 10 °C.s⁻¹.

Nedávno firma Thermedics Detection Inc. (Chelmsford, MA, U.S.A.) začala už komerčne vyrábať zariadenie na rýchle programovanie teploty pod komerčným označením Flash-2D-GCTM. V tomto prípade je kolóna tiež vložená do kovovej trubice, ktorá je odporovo vyhrievaná a poskytuje rýchlosť teplotného nárastu až 100 °C.s⁻¹.

Z hľadiska celkovej doby analýz je dôležitá aj rýchlosť chladenia pece. Nekonvenčné ohrievacie zariadenia spomenu-



Obr. 9. Vplyv frekvencie zberu dát na tvar píku (*n*-dodekánu). Kolóna HP-1 MS 5 m × 0,1 mm × 0,4 μm, teplota dávkočača 300 °C, teplota detektora 320 °C, nosný plyn H₂ pri vstupnom tlaku 60 psi, dávkovanie s deličom, deliaci pomer 50:1, teplotný program 80 °C do 300 °C pri 60 °C.min⁻¹, frekvencia zberu dát 50, 10, 5 a 2 Hz

té v tejto kapitole majú nízku tepelnú kapacitu, a preto je ich vychladenie pomerne rýchle. Ku konvenčným peciam je k dispozícii tzv. cryo chladenie, ktoré využíva na chladenie pece expanziu stlačeného oxidu uhličitého alebo dusíka a ktoré umožní podstatne skrátiť čas potrebný na vychladenie pece pred začiatkom ďalšej analýzy.

2.5. Detektory

Ako všetky časti inštrumentácie, ani detektor nemá prispievať k rozširovaniu chromatografickej zóny, a tak znižovať účinnosť kolóny. Najdôležitejším parametrom detektora z tohto hľadiska je objem cely detektora. Keď je príliš veľký, dochádza k výraznému rozširovaniu zóny. U detektorov citlivých na hmotnostný prietok sa to dá riešiť zvýšením prietoku cez detektor použitím prídavného plynu bez toho, aby sa ovplyvnila medza detekcie.

Ďalšou nevyhnutnou požiadavkou na detektory je dostatočne veľká vzorkovacia frekvencia. Na to, aby bol pík dostatočne popísaný, je potrebných aspoň 20 bodov³⁸. To znamená, že počas elúcie píku je potrebné, aby detektor urobil aspoň 20 snímaní. V rýchlej GC je táto požiadavka kritická z dôvodu veľmi úzkych píkov. Napríklad pre pík so šírkou ($w_{1/2}$) 50 ms je potrebná frekvencia zberu dát 200 Hz. Komerčne dostupné prístroje poskytujú maximálnu frekvenciu snímania dát 20–200 Hz. Pri veľmi rýchlych a ultra-rýchlych analýzach, kde šírka píkov je poriadkovo v milisekundách, je potrebná frekvencia zberu dát až okolo 5000 Hz. Na obr. 9 je zobrazený vplyv frekvencie zberu dát na tvar chromatografického píku.

Najčastejšie používané detektory v rýchlej GC sú plameňovoionizačný a tepelnovodivnostný. Plameňovoionizačný detektor je citlivý na hmotnostný prietok, preto možno použiť prídavný plyn bez zmeny medze detekcie. Mŕtvy objem v tomto detektore je priestor medzi koncom kolóny a plameňom detektora. Komerčne dostupné tepelnovodivnostné detektory majú veľký mŕtvy objem, ktorý sa môže zmenšiť zmenšením cely alebo použitím prídavného plynu. Keďže tepelnovodivnostný detektor je koncentračný detektor, zriadenie spôsobené prídavným plynom má veľký negatívny vplyv na medzu detekcie.

Detektor elektrónového záchytu (ECD), sa správa ako koncentračný detektor (okrem niektorých silne elektronega-

tívnych zlúčenín). Preto cela musí byť čo najmenšia. Ale veľkosť cely na druhej strane nemôže byť veľmi malá, lebo β elektróny s vysokou energiou letiace zo zdroja sa musia zraziť s molekulami nosného plynu, aby vznikli sekundárne elektróny s nižšou energiou. Preto vždy musí zostať nejaká vzdialenosť medzi anódou a katódou. Komerčne dostupné detektory majú objem cely okolo 150 μl.

On-line kombinácia plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou je najdôležitejšia technika pre separáciu a identifikáciu neznámych vzoriek. Hmotnostné spektrometre môžeme rozdeliť na konvenčné scanujúce hmotnostné spektrometre a nescanujúce (nonscanning) spektrometre. U scanujúcich zariadení maximálna scanovacia rýchlosť závisí od základných zákonov popisujúcich scanovací proces a času potrebného na zmeranie intenzity pri každej hmotnosti. Moderné konvenčné hmotnostné spektrometre (hmotnostný spektrometer s dvojitou fokusáciou, hmotnostný detektor s iónovou pascou) môžu scanovať pri rýchlostiach 10–20 spektier.s⁻¹ (cit.³⁹). To je dostatočne rýchle pre analýzy trvajúce minúty alebo aj sekundy, ak je pík dostatočne široký. Rýchlosť klasických quadrupólových hmotnostných spektrometrov je obmedzená nízkou energiou iónov. Scanovanie musí byť dostatočne pomalé, aby sa ión odseparoval a aby prešiel cez hmotnostný analyzátor. Boli už publikované aj práce o rýchlo scanujúcom quadrupólovom detektore⁴⁰, kde použili úzky rozsah hmotností iónov (50–150 Da), vzorkovanie len raz pre každú hmotnosť a zvýšené napätie medzi iónovým zdrojom a quadrupólom. Týmto spôsobom dosiahli až 250 scanov.s⁻¹, ale stratili rozlíšenie a citlivosť.

Najvhodnejšími hmotnostnými detektormi sú nescanujúce detektory, ktoré merajú všetky ióny naraz. Potom je rýchlosť snímania spektier závislá len od usporiadania detektora a elektroniky. Takýmto detektorom je napríklad hmotnostný spektrometer založený na meraní času letu (time-of-flight MS – TOFMS).

3. Záver

Článok poskytuje prehľad o inštrumentácii, ktorá sa používa v rýchlej GC, a podrobne rozoberá vplyv priemeru kolóny a typu nosného plynu na rýchlosť analýzy. Kombináciou veľmi tenkých kolón s vodíkom ako nosným plynom a použitím elektronickej kontroly tlaku a termostátov s veľmi rýchlym ohrevom môžeme dosiahnuť veľké zníženie času analýzy. Použitie špeciálnych dávkovacích systémov (napr. fokusačné dávkovacie systémy) umožňuje zachovať vysokú účinnosť veľmi tenkých kolón. Riešením nízkej kapacity veľmi tenkých kolón je multikapilára (kolóna pozostávajúca z 900 kapilár). Najčastejšie používanými detektormi v rýchlej GC sú plameňovoionizačný a tepelnovodivnostný detektor pre ich malý mŕtvy objem a možnosť dostatočnej rýchlosti zberu dát. Scanujúce hmotnostné spektrometre, akými sú spektrometre s kvadrupólom alebo iónovou pascou neposkytujú dostatočnú rýchlosť zberu dát. Preto sa v rýchlej GC používajú nescanujúce spektrometre, najčastejšie spektrometer založený na meraní času letu (time-of-flight MS = TOFMS).

Autori ďakujú Vedeckej agenture MŠ SR za finančnú podporu projektu 1/6100/99. Táto publikácia je súčasťou riešenia uvedeného projektu.

LITERATÚRA

1. Korytár P., Matisová E.: Chem. Listy 95, 470 (2001).
2. Golay M. J. E.: *Gas Chromatography*, str. 36. Butterworths, London 1958.
3. Giddings J. C., Seager S. L., Stucky L. R., Stewart G. H.: Anal. Chem. 32, 867 (1960).
4. David F., Sandra P.: Int. Lab. 30(4), 12 (2000).
5. Grant D. W.: *Capillary Gas Chromatography*. Wiley, Chichester 1996.
6. Van Es A.: *High Speed Narrow Bore Capillary Gas Chromatography*. Hüthig, Heidelberg 1992.
7. Desty D. H., Goldup A.: *Gas Chromatography*, str. 162. Butterworths, London 1960.
8. Schutjes C. P. M.: *Thesis*. Eindhoven University of Technology, Delft 1983.
9. Van Ysacker P. G., Snijders H. M., Janssen H. G. M., Cramers C. A.: J. High Resolut. Chromatogr. 21, 491 (1998).
10. Korytár P., Matisová E., Lefflerová H., Slobodník J.: J. High Resolut. Chromatogr. 23, 149 (2000).
11. Gaspar G., Arpino P., Guichon G.: J. Chromatogr. Sci. 15, 256 (1977).
12. Jonker R. J., Poppe H., Huber J. F. K.: Anal. Chem. 54, 2447 (1982).
13. Tijssen R., Van Hoed, Van Kreveld M. E.: Anal. Chem. 59, 1007 (1987).
14. Peters A., Klemp M., Puig L., Sacks R.: Analyst 116, 1313 (1991).
15. Tong D., Barnes A. M., Bartle K. D., Clifford A. A.: J. Microcolumn. Sep. 8, 353 (1996).
16. Snijders H. M. J., Janssen H. G., Straatman R. M. G., Cramers C. A.: *Proc. 15th Int. Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda*, str. 391. Hüthig, Heidelberg 1993.
17. Van Es A., Janssen J., Cramers C. A., Rijks J.: J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun. 11, 201 (1988).
18. Van Es A., Janssen J., Cramers C. A., Rijks J.: J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun. 11, 852 (1988).
19. Sacks R., Smith H., Nowak M.: Anal. Chem. 70, 29A (1998).
20. Li W. C., Andrews A. R. J.: J. High Resolut. Chromatogr. 19, 492 (1996).
21. Klemp M. A., Akard M. L., Sacks R. D.: Anal. Chem. 65, 2516 (1993).
22. Klemp M., Peters A., Sacks R. D.: Environ. Sci. Technol. 28, 369A (1994).
23. Liu Z., Phillips J. B.: J. Microcolumn. Sep. 1, 249 (1989).
24. Liu Z., Zhang M., Phillips J. B.: J. Chromatogr. Sci. 28, 567 (1990).
25. Phillips J. B., Ledford E.: FACT 1, 23 (1996).
26. Jackson G. P., Andrews A. R. J.: Analyst 123, 1085 (1998).
27. Górecki T., Pawliszyn J.: J. High Resolut. Chromatogr. 18, 161 (1995).
28. Górecki T., Pawliszyn J.: Anal. Chem. 67, 3265 (1995).
29. Zeeuw J., Vonk N., Smits R., Gummersbach J.: Int. Lab. 29, 28 (1999).
30. Jaulmes A., Ignatiadis I., Cardot P., Vidal-Madjar C.: J. Chromatogr. 395, 291 (1987).
31. Ghijssen R. T., Poppe H., Kraak J. C., Duysters P. P. E.: Chromatographia 27, 60 (1989).
32. Alltech katalóg 450, 1999.
33. Van Deursen M., Van Lieshout M., Derks R., Janssen H. G., Cramers C. A.: J. High Resolut. Chromatogr. 22, 119 (1999).
34. David F., Gere D. R., Scanlan F., Sandra P.: J. Chromatogr. 842, 309 (1999).
35. Jain V., Phillips J. B.: J. Chromatogr. Sci. 33, 55 (1995).
36. Jain V., Phillips J. B.: J. Chromatogr. Sci. 33, 601 (1995).
37. Ehrman E. U., Dharmasena H. P., Carney K., Overton E. B.: J. Chromatogr. Sci. 34, 533 (1996).
38. Annino R.: J. High Resolut. Chromatogr. 19, 285 (1996).
39. Leclercq P. A., Cramers C. A.: J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun. 11, 845 (1988).
40. Grimm C. C., Lloyd S. W., Munchausen L.: Am. Lab. 9, 18 (1996).

P. Korytár and E. Matisová (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Instrumentation for Fast Gas Chromatography**

The review deals with instrumentation used in fast gas chromatography. Practical effects of carrier gas choice and reduction of the inside column diameter on speed of analysis are discussed in detail. Conventional injection and detection systems are evaluated using the extracolumn band broadening. The data acquisition rate is another criterion for evaluation of detectors. Nonconventional injection systems that were specially developed for fast gas chromatography are summarized. New column heaters with high-speed temperature programming as well as advantages of electronic pressure control for sensitivity and speed of analysis are also presented.