

RÝCHLA PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

PETER KORYTÁR a EVA MATISOVÁ

Katedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: matisova@chtf.stuba.sk

Kľúčové slová: rýchla plynová chromatografia, rýchlosť chromatografickej analýzy, teória rýchlej GC

Došlo dňa 18.VIII.2000

Obsah

1. Úvod
2. Vývoj rýchlej plynovej chromatografie
3. Teória rýchlej plynovej chromatografie
 - 3.1. Teoretické odvodenie
 - 3.2. Parametre ovplyvňujúce rýchlosť chromatografickej analýzy
 - 3.3. Praktické dôsledky použitia veľmi tenkých kolón
4. Záver

1. Úvod

V odbornej literatúre sa z hľadiska rýchlosti bežne používajú pomenovania rýchla plynová chromatografia (fast GC), veľmi rýchla plynová chromatografia (very fast GC), plynová chromatografia s vysokou rýchlosťou (high-speed GC) alebo ultra-rýchla plynová chromatografia (ultra-fast GC). Je však diskutabilné, ktorú analýzu môžeme považovať za rýchlu, veľmi rýchlu alebo ultra-rýchlu, a to z dvoch dôvodov. Po prvé, rýchlosť je relatívna veličina, čo znamená, že ju treba vždy uvádzať vzhľadom k nejakému „štandardnému stavu“, a po druhé, je potrebné vymedziť hranice jednotlivých rýchlostných pásiem.

Dagan a Amirav¹ pri klasifikácii rýchlosti analýzy tepelne nestálych látok metódou GC-MS navrhli ako štandardnú rýchlosť takú rýchlosť analýzy, ktorá sa dosiahne na kolóne dlhej 30 metrov, s héliom ako nosným plynom pri prietoku 1 ml.min⁻¹ (čo odpovedá lineárnej rýchlosti 34 cm.s⁻¹). Na jej základe potom zadefinovali tzv. zrýchľovací faktor (speed enhancement factor, SEF):

$$SEF = \frac{3000 / 34}{L / \bar{u}} = 88 \times \frac{\bar{u}}{L} \quad (1)$$

kde \bar{u} je rýchlosť nosného plynu v centimetroch za sekundu a L je dĺžka kolóny v centimetroch. Ako vyplýva z tejto rovnice, ide o pomer mŕtveho času analýzy v konvenčnej chromatografii a mŕtveho času testovanej analýzy. Zrýchľovací faktor vyjadruje, koľkokrát sa zmenší čas potrebný na to,

aby nosný plyn pretiekol cez kolónu (koľkokrát sa zmenší hodnota mŕtveho času). Je potrebné zdôrazniť, že zrýchľovací faktor (SEF) nevyjadruje exaktne zníženie času analýzy, pretože čas analýzy je ovplyvnený aj teplotou kolóny a veľkosťou teplotného gradientu v teplotnom programe.

Na základe hodnoty zrýchľovacieho faktora uvedení autori definovali rozdelenie plynovej chromatografie podľa rýchlosti analýzy nasledovne:

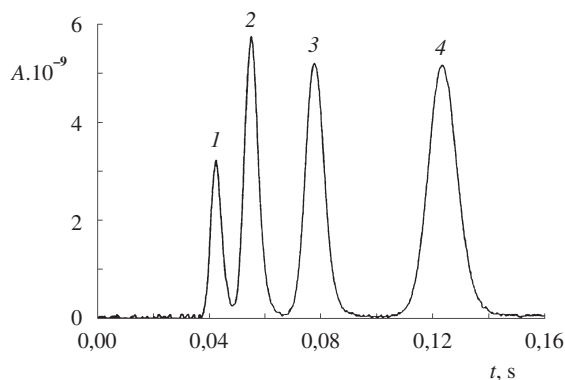
– Konvenčná GC	SEF je približne	1
– Rýchla GC	SEF patrí do intervalu	5–30
– Veľmi rýchla GC	SEF patrí do intervalu	30–400
– Ultra-rýchla GC	SEF patrí do intervalu	400–4000

2. Vývoj rýchlej plynovej chromatografie

Koncept plynovej chromatografie, presnejšie rozdeľovacej chromatografie plyn–kvapalina predstavili Martin a Synge² v roku 1941 a v praxi prvýkrát použili James a Martin^{3,4} v roku 1952 na analýzu prchavých mastných kyselín. V roku 1957 Golay na základe matematickej štúdie prvýkrát navrhol použitie v plynovej chromatografii kapilárne kolóny s tenkým filmom^{5,6}. Plynové chromatografy používané v tých časoch však boli nevhodné na používanie kapilárnych kolón. Hlavnými problémami boli nízka citlivosť a relatívne veľký objem detektorovej komory. Tento problém vyriešil plameňovoionizačný detektor (FID)⁷, ktorý bol zhodou okolností tiež predstavený v tom istom čase, ako model kapilárnych kolón. Tento detektor nielenže mal požadovaný malý objem, ale poskytoval aj vysokú citlivosť. Kapilárne kolóny v kombinácii s plameňovoionizačným detektorom vyvolali revolúciu v analytickej chémii, zvlášť po zavedení sklenených kapilárnych kolón^{8,9}. V porovnaní s náplňovými kolónami kapilárne kolóny majú podstatne vyššiu účinnosť. V roku 1979 Dandeneau a Zerener publikovali použitie pružných kremenných kapilárnych kolón¹⁰, ktoré spôsobili druhú revolúciu v plynovej chromatografii. Ohybnosť, pružnosť a pevnosť kremenných kapilárnych kolón umožňuje v porovnaní so sklenenými kolónami podstatne ľahšiu manipuláciu.

Už na začiatku rozvoja plynovej chromatografie bolo jasné, že miniaturizácia je spôsob k zrýchleniu separácií. Pod pojmom miniaturizácia sa rozumie zmenšenie veľkosti častíc v náplňových kolónach alebo vnútorného priemeru kapilár. Navyše toto zmenšenie umožňuje úmerne skrátiť aj dĺžku kolóny bez straty rozlíšenia. Purnell a Quinn¹¹ už v roku 1960 použili krátke kolóny (30 cm dlhá s vnútorným priemerom 4,5 mm) naplnené náplňou o veľkosti 60–70 mesh na separáciu zmesi jednoduchých uhľovodíkov. Separáciu s počtom teoretických priehradiek 150 dosiahli za 10 s. Jonker a spol.¹² v roku 1982 uskutočnili najrýchlejšiu separáciu na náplňovej kolóne do dnešných čias (obr. 1). Štyri zložky uhľovodíkovej zmesi odseparovali za 0,14 s na kolóne dlhej 3,2 cm s priemerom 1,19 mm a náplňou Lichrosorb Si-60 o veľkosti 10 μm. Počet teoretických priehradiek bol 650 ($k = 2$) pri vstupnom tlaku 64 barov.

Rovnaký čas analýzy (0,14 s) a počet teoretických prie-



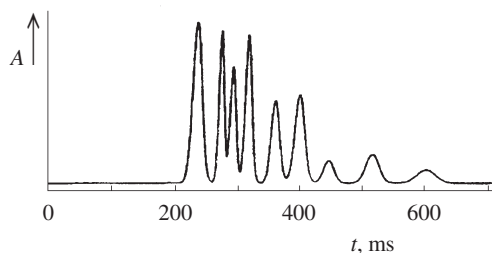
Obr. 1. Doteraz najrýchlejšia analýza na náplňovej kolóne. Kolóna 32 mm dlhá, 1,19 mm vnútorný priemer, náplň Lichrosorb Si-60 s veľkosťou častíc 10 μm ; vstupný tlak 64 barov; teplota 100 °C; nosný plyn hélium; dávkované 1,5 μl plynnej zmesi (1 – metán, 2 – etán, 3 – propán, 4 – bután)

hradiak (650) sa môže dosiahnuť použitím kapilárnej kolóny s dĺžkou 12 cm a vnútorným priemerom 120 μm . V tomto prípade je potrebný vstupný tlak len 0,2 barov (v porovnaní so 64 barmi pri náplňovej kolóne). Len z hľadiska kapacity kolóny je výhodnejšie použiť náplňovú kolónu miesto kapilárnej. Použitie kapilárnej kolóny v rýchlej GC prvýkrát demonštroval Desty a spol.¹³ v roku 1962. Na separáciu použili kovovú kapilárnu kolónu s dĺžkou 1,2 m a vnútorným priemerom 35 μm . Vzorka bola dávkovaná striekačkou na plyn použitím kladiva na rýchle stlačenie piesta, aby sa dosiahla šírka vstupnej zóny 10 ms. Výsledkom tejto analýzy bola separácia 15 zlúčenín za 2 s. Chromatogram bol zaznamenaný na fotografický papier zrkadlovým galvanometrom.

Experimenty s rýchlou plynovou chromatografiou si v tých časoch nezískali veľa pozornosti. Čiastočne to bolo spôsobené veľkou rozlišovacou silou dlhých kapilárnych kolón¹⁴. Výskum sa orientoval na analýzu čoraz komplexnejších zmesí a čas analýzy a selektivita sa stali menej frekventovanou témou výskumu. Ďalším dôvodom, prečo bol rozvoj rýchlej plynovej chromatografie spomalený, bol nedostatok vhodnej inštrumentácie. Až na konci sedemdesiatych rokov nastal výraznejší záujem o rýchlu GC. Od vtedy bolo publikovaných veľa vedeckých prác, ktoré riešili hlavne problematiku teórie rýchlej GC, dávkovacích a detekčných systémov. V roku 1988 Van Es a spol.¹⁵ publikovali doteraz najrýchlejší chromatografický záznam pre kapilárne kolóny (obr. 2). Podarilo sa im oddeliť 9 uhľovodíkov za 0,6 s na kolóne dlhej 30 cm s vnútorným priemerom 50 μm . Od roku 1990 sa vývoj v oblasti rýchlej GC rozšíril o hľadanie možností rýchlejšieho ohrevu kolón a o využitie rýchlej GC v dvojrozmernej chromatografii (comprehensive GC \times GC).

3. Teória rýchlej plynovej chromatografie

Primárnym cieľom teórie rýchlej plynovej chromatografie je odvodiť alebo nájsť matematický vzťah, ktorý vyjadruje závislosť času trvania analýzy od všetkých parametrov, ktoré vplyvajú na čas analýzy. Poznať tento vzťah je veľmi ošzné, lebo z neho priamo vyplýva, ako sa zmení doba analýzy



Obr. 2. Doteraz najrýchlejšia analýza na kapilárnej kolóne. Analýza uhľovodíkov ($\text{C}_6\text{--C}_9$) pri 72 °C. Kolóna OV-1 dlhá 30 cm, s vnútorným priemerom 50 μm ; nosný plyn hélium so vstupným tlakom 4,5 barov

zmenou chromatografických podmienok, a možno optimalizovať hodnoty jednotlivých parametrov, aby bol čas analýzy minimálny.

3.1. Teoretické odvodenie

Primárnym cieľom plynovej chromatografie je separácia jednotlivých zložiek zmesi. Hlavným kritériom pre voľbu vhodných chromatografických podmienok je rozlíšenie kritického páru zlúčenín. Keď sú tieto dve kritické zlúčeniny rozlíšené, budú oddelené aj všetky ostatné píky v chromatograme. Zo základov teórie GC vyplýva, že požadovaný počet teoretických priehradiek N_{req} , ktorý je potrebný na dosiahnutie rozlíšenia R_S , môžeme vyjadriť ako:

$$N_{req} = 16 R_S^2 \left[\frac{1+k}{k} \right]^2 \left[\frac{\alpha}{\alpha-1} \right]^2 \quad (2)$$

kde $R_S = \Delta t_R / 4\sigma$, Δt_R je rozdiel retenčných časov, σ je štandardná odchýlka neskôr eluujúceho píku z kritického páru vyjadrená v časových jednotkách, k je kapacitný faktor neskôr eluujúceho píku z kritického páru, α je elučný pomer ($\alpha = k/k'$), k' je kapacitný faktor skôr eluujúceho píku z kritického páru.

Keď je primárny cieľ splnený, druhým cieľom je uskutočniť analýzu v čo najkratšom čase. Vzťah pre retenčný čas neskôr eluujúceho píku z kritického páru môžeme vyjadriť nasledovne:

$$t_R = t_0 (1+k) = \frac{L}{\bar{u}} (1+k) = N \frac{H}{\bar{u}} (1+k) = N \frac{H}{u_0 f_2} (1+k) \quad (3)$$

kde t_0 je mŕtvy čas, L dĺžka kolóny, \bar{u} priemerná rýchlosť nosného plynu, N počet teoretických priehradiek, H výškový ekvivalent teoretickej priehradky, u_0 rýchlosť plynu na výstupe z kolóny a f_2 je kompresibilitný korekčný faktor ($f_2 = 3/2(P^2-1)/(P^3-1)$, $P = p_i/p_0$, p_i je tlak na hlave kolóny, p_0 je tlak na výstupe z kolóny).

V prípade, ak kritický pár eluuje ako posledný, potom rovnica (3) vyjadruje aj čas analýzy. Ak nie, potom v rovnici (3) musíme k vynásobiť faktorom n , ktorý udáva pomer kapacitného faktora posledného eluujúceho píku a kapacitného

faktora neskôr eluujúceho píku z kritického páru¹⁶. Aby sme zjednodušili ďalšie odvádzanie, budeme predpokladať, že neskôr eluujúci pík z kritického páru je zároveň posledný pík. Kombináciou rovníc (2) a (3) dostaneme nasledujúci vzťah:

$$t_R = N_{req} (1+k) \frac{H}{\bar{u}} = 16R_S^2 \left[\frac{(1+k)^3}{k^2} \right] \left[\frac{\alpha^2}{(\alpha-1)^2} \right] \left[\frac{H}{u_0 f_2} \right] \quad (4)$$

Túto rovnicu môžeme rozdeliť na dve časti. Prvá časť je rovná požadovanému počtu teoretických priehradiek vynásobených výrazom $(1+k)$. Táto časť poukazuje na dôležitosť optimalizácie hodnoty k a maximalizáciu hodnoty α vhodným výberom stacionárnej fázy. Kapacitný faktor k možno meniť vhodnou voľbou stacionárnej fázy, zmenou fázového pomeru a zmenou teploty kolóny¹⁷.

Druhá časť $H/\bar{u} = H/u_0 f_2$ sa volá Purnellovo kritérium¹⁸, alebo doba teoretickej priehradky¹⁹ – to znamená čas, za ktorý nosný plyn prejde cez jednu teoretickú priehradku. Na vyjadrenie výrazu H/\bar{u} sú potrebné dve základné rovnice. Po prvé vzťah, ktorý vyjadruje závislosť výškového ekvivalentu teoretickej priehradky od rýchlosti nosného plynu, čo je pre kapilárne kolóny Golayova-Giddingsova rovnica^{6,20}:

$$H = \left\{ \frac{B_{m,0}}{u_0} + C_{m,0} u_0 \right\} f_1 + C_S u_0 f_2 \quad (5)$$

kde

$$B_{m,0} = 2D_{m,0} \quad C_{m,0} = F(k) \frac{d_c^2}{D_{m,0}}$$

$$F(k) = \frac{1+6k+11k^2}{96(1+k)^2} \quad C_S = \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s}$$

$$f_1 = \frac{9}{8} \frac{(P^4-1)(P^2-1)}{(P^3-1)^2}$$

$D_{m,0}$ je difúzny koeficient analytu v mobilnej fáze pri tlaku na výstupe z kolóny, D_s je difúzny koeficient analytu v stacionárnej fáze, d_c je priemer kolóny, d_f je hrúbka filmu stacionárnej fázy a u_0 je lineárna rýchlosť plynu pri tlaku na výstupe kolóny. Po druhú vzťah pre prietok plynu, čo pre kapilárne kolóny je Hagenova-Poiseuilleova rovnica²¹:

$$u_0 = \frac{B p_0}{2\eta L} (P^2-1) \quad (6)$$

kde B je priepustnosť kolóny, ktorá sa pre kapilárne kolóny rovná $d_c^2/32$ a η je dynamická viskozita nosného plynu.

Z doteraz uvedených rovníc vyplýva, že nie je možné odvodiť všeobecný explicitný vzťah pre výpočet H/\bar{u} a teda ani pre čas analýzy, pretože je komplexnou funkciou kapacitných faktorov, rýchlosti nosného plynu, tlakového spádu, rozmerov kolóny a difúzných koeficientov analytov v mobil-

nej fáze. Je možné uskutočniť len numerické riešenie výrazu H/\bar{u} a teda aj času analýzy pre požadovaný počet teoretických priehradiek, ako navrhli Cramers a Leclercq^{22,23}. Na základe Golayovej-Giddingsovej a Hagenovej-Poiseuilleovej rovnice odvodili pre podmienku minimálneho času analýzy pri vyžadovanom počte teoretických priehradiek nasledujúce vzťahy:

$$H = \left[\frac{B_a p_a f_1}{\varepsilon^2} + \frac{C_{m,a} f_1}{p_a} + \frac{C_S}{\bar{p}} \right] \cdot \varepsilon \quad (7)$$

$$H\varepsilon = -B_{m,a} p_a \left\{ \frac{f_1^2 C_{m,a} + C_S (2f_1 - f_2 P) p_a / \bar{p}}{C_{m,a} (f_1 - f_2 P)} \right\} \quad (8)$$

kde pre ideálny plyn platí:

$$\varepsilon = u_i p_i = u_0 p_0 = u_a p_a = \bar{u} \bar{p} \quad (9)$$

kde symbol a označuje veličinu pri atmosferických podmienkach a \bar{p} je priemerný tlak ($\bar{p} = p_0/f_2$).

Hagenova-Poiseuilleova rovnica môže byť po zohľadnení rovnice (9) prepísaná na tvar:

$$p_i^2 = \frac{64\eta N_{req}}{d_c^2} H\varepsilon + p_0^2 \quad (10)$$

Tieto vzťahy (rovnice (7), (8) a (10)) sú komplexnou funkciou tlaku a optimálny vstupný tlak sa môže vypočítať len iteratívne. Postup tohto výpočtu je nasledovný: zvolí sa počiatková hodnota vstupného tlaku ($p_i = p_0 + p_a$) a z rovnice (8) sa vypočíta hodnota $H\varepsilon$. Výsledok je dosadený do rovnice (10), z ktorej vypočítame novú hodnotu p_i . Po nájdení optimálneho vstupného tlaku $p_{i,opt}$ sa z kombinácie rovníc (7) a (8) vypočíta optimálna hodnota ε_{opt} a na jej základe sa z rovnice (7) vypočíta H a z rovnice (9) \bar{u} . Minimálny čas analýzy sa získa dosadením hodnôt H a \bar{u} do rovnice (4).

Explicitné vyjadrenie rovnice (4) je možné len pre krajné podmienky, ako sú veľmi veľký, alebo veľmi malý tlakový spád cez kolónu a zanedbateľný vplyv stacionárnej fázy. Boli publikované dva spôsoby odvodenia.

Prvý spôsob využíva na vyjadrenie závislosti času analýzy od všetkých parametrov rovnice (4), (7), (8) a (10). Odvodením z týchto rovníc a po zohľadnení toho, že pre malý tlakový spád ($P \approx 1$) oba kompresibilitné faktory f_1 a f_2 sú blízke 1, dostaneme výraz^{22,23}:

$$t_R = (1+k) N_{req} \frac{p_i}{p_0} F(k) \frac{d_c^2}{D_{m,0}} = 16R_S^2 \frac{(1+k)^3}{k^2} \frac{\alpha^2}{(\alpha-1)^2} \frac{p_i}{p_0} F(k) \frac{d_c^2}{D_{m,0}} \quad (11)$$

Pre veľký tlakový spád ($P \gg 1$) je hodnota f_1 rovná $9/8$ a hodnota f_2 sa blíži k hodnote $3/(2P)$ a rovnica (4) nadobudne tvar^{22,23}.

$$t_R = (1+k) N_{req}^{3/2} \frac{9}{8} \sqrt{3} F(k) \left[\frac{\eta}{p_0 D_{m,0}} \right]^{1/2} d_c =$$

$$= 64 R_S^3 \frac{(1+k)^4}{k^3} \frac{\alpha^3}{(\alpha-1)^3} \sqrt{3} F(k) \left[\frac{\eta}{p_0 D_{m,0}} \right]^{1/2} d_c \quad (12)$$

Podobný vzťah pre čas analýzy ako vyjadruje rovnica (12) publikovali aj Guiochon¹⁶ a Tijssen²⁴.

Druhý spôsob v záujme jednoduchšieho odvodenia využíva redukované parametre²⁵:

$$\begin{aligned} \text{redukovaný výškový ekvivalent} & \quad h = H/d_c \\ \text{teoretickej priehradky} & \\ \text{redukovaná lineárna rýchlosť} & \quad v = u_0 d_c / D_{m,0} \\ \text{nosného plynu} & \\ \text{redukovaný tlak} & \quad P = p_i / p_0 \end{aligned}$$

Retenčný čas analytu môže byť vyjadrený pomocou redukovaných parametrov nasledovne:

$$t_R = \frac{h N d_c^2}{v f_2^2 D_{m,0}} (1+k) \quad (13)$$

Hagenova-Poiseuilleova rovnica (rovnica (6)) vyjadrená cez redukované parametre nadobudne tvar:

$$v = \frac{d_c^3 p_0}{64 \eta L D_{m,0}} (P^2 - 1) = \frac{d_c^2 p_0}{64 \eta N h D_{m,0}} (P^2 - 1) \quad (14)$$

Pre vysoký tlakový spád ($P \gg 1$), aký sa bežne používa v rýchlej GC, rovnica (14) nadobudne tvar:

$$v = \frac{d_c^2 p_i^2}{64 \eta N h p_0 D_{m,0}} \quad (15)$$

Dosadením rovnice (15) do rovnice (13) a po zohľadnení faktu, že pre vysoký tlakový spád sa hodnota f_2 blíži k hodnote $3/(2P)$, dostaneme rovnicu:

$$t_R = \frac{128 N^2 h^2 \eta}{3 p_i} (1+k) \quad (16)$$

Vyjadrením p_i z rovnice (15) a dosadením do rovnice (16) dostaneme výslednú rovnicu:

$$t_R = \left[\frac{256}{9} N^3 \frac{h^3}{v} \frac{\eta}{p_0 D_{m,0}} \right]^{1/2} (1+k) d_c \quad (17)$$

Podobný vzťah odvodil aj Knox a Saleem²⁶ už v roku 1969.

3.2. Parametre ovplyvňujúce rýchlosť chromatografickej analýzy

Vplyv priemeru kolóny

Zníženie priemeru kolóny je efektívnym spôsobom, ako zrýchliť separačný proces. Z rovníc (11), (12) a (17) vyplýva, že najrýchlejšie analýzy sa získajú pri použití čo najtenších kolón, zvlášť pri nízkom tlakovom spáde, kde je čas analýzy úmerný d_c^2 (rovnica (11)). So znížením priemeru kolóny sa úmerne znižuje aj optimálna hodnota výškového ekvivalentu teoretickej priehradky (H_{min}). Preto sa môže skrátiť dĺžka kolóny ($L = NH$) bez toho, aby došlo k zníženiu počtu teoretických priehradiek (N). Napríklad, kolóna s priemerom 50 μm a dĺžkou 5 m má rovnaký počet teoretických priehradiek ako kolóna s priemerom 250 μm a dĺžkou 25 m (cit.²⁵). Keď sa priemer kolóny zmenší z 320 μm na 50 μm , analýza sa zrýchli $9 \times$ pri $N = 10^5$ a $16 \times$ pri $N = 10^4$. Takže separácia, ktorá na konvenčnej kolóne (320 μm) trvá 1 hodinu, sa dá na kolóne s priemerom 50 μm dosiahnuť za 7 minút (cit.²⁷). Použitie tenkých kolón z praktického hľadiska je podrobnejšie popísané v pripravovanom článku o inštrumentácii v rýchlej GC²⁸.

Vplyv nosného plynu

Pre nízky tlakový spád je čas analýzy úmerný $1/D_{m,0}$ (rovnica (11)), zatiaľ čo pre veľký tlakový spád je čas analýzy úmerný $(\eta/D_{m,0})^{1/2}$ (rovnice (12) a (17)). V tabuľke I (cit.²⁷) sú uvedené relatívne časy analýz a orientačné hodnoty difúzných koeficientov pre jednotlivé nosné plyny.

Tabuľka I

Relatívny čas analýzy a difúzne koeficienty (D_g) pre rôzne nosné plyny (merané pre *n*-heptán pri teplote $T = 323$ K)

Nosný plyn	D_g [cm ² .s ⁻¹]	$P^a \approx 1$	$P \gg 1$
Vodík (H ₂)	0,15	1	1
Hélium (He)	0,40	1,2	1,6
Dusík (N ₂)	0,56	4,0	2,8

^a $P = p_i/p_0$, p_i – tlak na hlave kolóny, p_0 – tlak na výstupe z kolóny

Ako vidíme z tabuľky I, najlepším nosným plynom pre rýchlu GC je vodík. Keď sa použije ako nosný plyn hélium, analýza sa predĺži približne 1,2 až 1,6 \times a pri použití dusíka 2,8 až 4,0 \times . Podrobnejšia analýza vplyvu nosného plynu na separáciu je diskutovaná v pripravovanom článku o inštrumentácii v rýchlej GC²⁸.

Vplyv vyžadovaného počtu teoretických priehradiek (N_{req})

Z rovníc (11) a (12) resp. (17) vyplýva, že pre nízky tlakový spád je čas analýzy úmerný N a pre veľký tlakový spád je úmerný $N^{3/2}$. Ak sa vyžaduje rýchla separácia, účinnosť kolóny nesmie byť preto vyššia, ako je nevyhnutne potrebné. Rovnica (2) ukazuje, ako vhodné „naladenie“ kapacitného faktora k a retenčného pomeru α zmenou teploty a zmenou

stacionárnej fázy má veľmi výrazný vplyv na potrebný počet teoretických priehradiek. Napríklad, separácia dvojice látok ($R_S = 1$) pri $k = 2$ vyžaduje 100 000 teoretických priehradiek pri $\alpha = 1,02$; pri zmene α na hodnotu 1,1 je potrebných už len 4000 teoretických priehradiek. Rýchlosť analýzy sa pri tejto zmene zvýši 25× pre nízky tlakový spád a až 125× pre vysoký tlakový spád²⁷.

Vplyv kapacitného faktora

Minimálny čas analýzy sa dosiahne pri hodnote kapacitného faktora 1,76 (cit.²²), čo je hodnota, ktorá sa získa minimalizáciou člena $(1 + k)^3/k^2$ v rovnici (4). To znamená, že posledne eluujúci analyt by mal mať kapacitný faktor menší ako 3, čo zodpovedá retenčnému času, ktorý je menší ako štvornásobok mŕtveho času. Kapacitný faktor môžeme ovplyvniť zmenou hrúbky a polarity stacionárnej fázy a zmenou teploty kolóny ($k \propto \exp(1/T)$).

Vplyv tlaku na výstupe z kolóny

Hoci to nie je explicitne vidieť z prezentovaných rovníc, rýchlosť analýzy môžeme zvýšiť zapojením vakuu na konci kolóny^{23,29}. Zrýchlenie analýz týmto spôsobom je výrazné len pre hrubé a/alebo krátke kolóny. Napríklad pri $d_c = 0,530$ mm a $N = 10^3$ sa pri použití vakuu zvýšila rýchlosť 6×. Keď sa však zmenší priemer kolóny, zrýchlenie analýzy je zanedbateľné. Môžeme to vysvetliť vplyvom vakuu na priemerný tlak v kolóne ($\bar{p} = p_0/f_2$). Pri malom priemernom tlaku v kolóne sa hodnota difúzneho koeficienta zväčší (pre ideálny plyn $D \times p = \text{konštanta}$), a to spôsobí zrýchlenie analýzy. Pri tenkých kolónach je $f_2 = 3/2P$, a preto priemerný tlak nie je ovplyvnený tlakom na výstupe z kolóny.

Vplyv profilu toku

Poslednou možnosťou, ako zmenšiť čas analýzy, ktorá nie je explicitne viditeľná z rovníc, je zmeniť rýchlostný profil plynu vo vnútri kolóny. Dá sa to dosiahnuť prácou pri vysokom prietoku plynu³⁰, kedy sa tok stáva turbulentný, alebo vyvolaním sekundárneho toku (v radiálnom smere) jemným zvinutím kolóny (priemer navinutia je čo najmenší)^{24,31}. Pri týchto podmienkach sa rozdiely v rýchlostnom profile zmenšia a zvýši sa prenos analytov konvekciou (prenosom). Tak sa rýchlejšie dosiahne rovnováha, a tým sa urýchli separácia. Avšak zrýchlenie týmito spôsobmi sa dá zrealizovať len pri veľmi veľkých rýchlostiach, a preto pre praktickú chromatografiu je tento spôsob nepoužiteľný.

3.3. Praktické dôsledky použitia veľmi tenkých kolón

Inštrumentálne rozširovanie chromatografickej zóny

V chromatografii je celkové rozšírenie chromatografickej zóny (σ_{tot}^2) súčtom rozšírenia zóny v kolóne (σ_{col}^2) a mimo kolóny ($\Sigma\sigma_{ex}^2$):

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{col}^2 + \Sigma\sigma_{ex}^2 \quad (18)$$

Mimo-kolónové rozšírenie je hlavne spôsobené rozšíre-

ním zóny dávkovačom (σ_{inj}^2), detektorom (σ_{det}^2) a spojmi kolóny (σ_{conn}^2):

$$\Sigma\sigma_{ex}^2 = \sigma_{det}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{conn}^2 \quad (19)$$

So znižovaním priemeru kolón sa chromatografické rozširovanie zóny výrazne znižuje, a tak sa príspevok mimokolónových efektov stáva významnejší. Gaspar a spol.³² vo svojej práci prezentovali, že príspevok mimokolónových efektov k rozširovaniu zóny môže byť zohľadnený pridaním ďalšieho člena do Golayovej-Giddingsovej rovnice:

$$H_{ex} = D\bar{u}^2 = \frac{\sigma_{ex}^2}{(1+k)L} \bar{u}^2 \quad (20)$$

kde H_{ex} je zvýšenie výškového ekvivalentu teoretickej priehradky vplyvom mimokolónových efektov, D je člen popisujúci rozšírenie mimokolónovými efektmi. Z rovnice (20) vyplýva, že strata účinnosti v dôsledku mimokolónových efektov je menšia pre dlhšiu kolónu a pre analyty s väčším retenčným časom. Pre rýchlu GC, kde sa používajú veľmi tenké a krátke kolóny, sa príspevok mimokolónových efektov stáva významnejší. Aby účinnosť kolóny ostala zachovaná, rozširovanie zóny vplyvom inštrumentácie musí byť veľmi malé. To viedlo v posledných rokoch k prudkému vývoju dávkovacích zariadení, ktoré poskytujú dostatočne úzku vstupnú zónu. Bližšie podrobnosti o prístrojovej technike v rýchlej GC nájdete v pripravovanom článku o inštrumentácii v rýchlej GC²⁸.

Medza detekcie

Medza detekcie analytov výrazne závisí od parametrov kolóny a detektora. Minimálne detegovateľné množstvo Q_{min} je najmenšie množstvo analytu, ktoré môže byť detegované (s pomerom signál/šum = 2). Niektoré detektory sú citlivé na koncentráciu analytu v detektore, iné na hmotnostný prietok analytu cez detektor. V závislosti od toho rozlišujeme hmotnostné a koncentračné detektory. Pre hmotnostné detektory sa Q_{min}^m vypočíta podľa vzťahu³³:

$$Q_{min}^m = \sqrt{2\pi} \frac{2R_N}{S^m} \sigma_{tot} \quad (21)$$

kde R_N je šum detektora, S^m je citlivosť hmotnostného detektora a σ_{tot} je celková štandardná odchýlka chromatografického píku. Pre koncentračné detektory sa minimálne detegovateľné množstvo vypočíta podľa vzťahu³³:

$$Q_{min}^c = \sqrt{2\pi} \frac{2R_N}{S^c} \sigma_{tot} F_{det} \quad (22)$$

kde S^c je citlivosť koncentračného detektora a F_{det} je prietoková rýchlosť cez detektor pri tlaku a teplote detektora. V rovniciach (21) a (22) autori používajú faktor 2. Jeho voľba závisí od požadovanej presnosti kvantitatívnej analýzy (napr. Van Es²⁷ použil faktor 4).

Pretože $\sigma_{tot} = t_R/\sqrt{N}$, z kombinácie rovníc (21) a (11) vyplýva, že pre malý tlakový spád a tenký film stacionárnej

fázy je $Q_{min}^m \propto d_c^2$ a z kombinácie rovníc (21) a (12) resp. (17), že pre veľký tlakový spád a tenký film stacionárnej fázy je $Q_{min}^m \propto d_c$. V rovnici (22) pre výpočet minimálne detegovateľného množstva pre koncentračné detektory sa navyše vyskytuje člen F_{det} , ktorý je úmerný priemeru kolóny ($F_{det} \propto d_c$). Preto z kombinácie rovníc (22) a (11) je zrejmé, že pre malý tlakový spád a tenký film stacionárnej fázy je $Q_{min}^c \propto d_c^2$ a z kombinácie rovníc (22) a (12) resp. (17), že pre veľký tlakový spád a tenký film stacionárnej fázy je $Q_{min}^c \propto d_c^2$.

Medza detekcie alebo minimálne detegovateľná koncentrácia analytu C_{min} je definovaná nasledovne:

$$C_{min} = Q_{min} / V_{inj} \quad (23)$$

kde Q_{min} je minimálne detegovateľné množstvo pre hmotnostný alebo koncentračný detektor a V_{inj} je dávkovaný objem vzorky. Hoci znižovanie priemeru kolón priaznivo vplyva na minimálne detegovateľné množstvo Q_{min} (so zmenšovaním priemeru kolóny sa znižuje hodnota Q_{min}), neznamená to však, že je možné detegovať aj veľmi nízke koncentrácie, lebo pri veľmi tenkých kolónach je možné dávkovať len veľmi malý objem vzorky V_{inj} . A to z toho dôvodu, že pre dávkovanie do veľmi tenkých kolón sa používajú špeciálne dávkovacie zariadenia, ktoré boli vyvinuté, aby poskytovali veľmi úzku vstupnú zónu, kompatibilnú s veľmi malým chromatografickým rozširovaním zóny v kolóne. Tieto dávkovacie systémy môžu dávkovať len veľmi malé množstvá vzorky, čo má za následok, že medza detekcie je vysoká.

Kapacita kolóny

Kapacita kolóny Q_{max} je maximálne množstvo analytu, ktoré môže byť nadávkované do kolóny bez toho, aby spôsobilo príliš veľké (napr. 10 %) rozšírenie chromatografickej zóny. Bolo publikovaných veľa modelov popisujúcich závislosť kapacity kolóny od chromatografických parametrov, ale len dve z nich sa zhodujú s realitou^{34,35}. Obe teórie súhlasia s tým, že kapacita kolóny je úmerná objemu teoretickej priehradky²³:

$$Q_{max} \propto d_c^2 \frac{L}{N^{1/2}} = d_c^2 H N^{1/2} = d_c^3 h N^{1/2} \quad (24)$$

Z tejto rovnice teda vyplýva, že pre kapilárne kolóny je $Q_{max} \propto d_c^3$. Ďalší dôležitý faktor, ktorý ovplyvňuje kapacitu kolóny, je interakcia analytu a stacionárnej fázy. Vo všeobecnosti, ak analyt a stacionárna fáza majú podobné vlastnosti, bude rozpustnosť väčšia, a preto bude vyššia aj kapacita kolóny. Posledným parametrom, ktorý má významný vplyv na kapacitu kolóny, je kapacitný faktor. Len pre veľmi malé hodnoty kapacitného faktora ($k < 1$) sa môžu dávkovať veľké množstvá bez toho, aby nespôsobili predávkovanie. Kapacita kolóny sa pre vyššie hodnoty kapacitného faktora prudko znižuje. Ďalšie zvyšovanie kapacitného faktora nad hodnotu 3 už však nebude ovplyvňovať kapacitu kolóny.

Ako vidíme z rovnice (24), znižovanie priemeru kolón veľmi nepriaznivo ovplyvňuje kapacitu kolóny. Ale to nie je hlavná nevýhoda veľmi tenkých kolón. Problémy navyše vznikajú, keď zníženie kapacity kolóny vedie k výraznému zmenšeniu pracovného rozsahu W , ktorý je definovaný nasledovne:

$$W = Q_{max} / Q_{min} \quad (25)$$

Je jasné, že jedinou možnosťou, ako zachovať prijateľný pracovný rozsah, je používať veľmi citlivé detektory.

4. Záver

Z teoretického pohľadu existuje viacero spôsobov vedúcich k dosiahnutiu rýchlych separácií. Najefektívnejším a zároveň najjednoduchším spôsobom zvyšovania rýchlosti analýzy je použitie veľmi tenkých kolón („narrow-bore columns“) s tenkým filmom v kombinácii s vodíkom ako nosným plynom. Pre tieto kolóny je zrýchlenie v dôsledku vákuu na výstupe z kolóny zanedbateľné. Vákuum na výstupe z kolóny má výrazný účinok na zrýchlenie analýzy len pri krátkych a hrubých („wide-bore columns“) kolónach. Analýza na jemne zvinutých kolónach (veľmi malý priemer navinutia) a pri turbulentnom toku mobilnej fázy je nepraktická a navyše zrýchlenie analýzy je malé, zvlášť pre viac zbrzdňované látky.

Zmenšenie priemeru kolón vedie okrem zrýchlenia analýzy aj k zmenšeniu chromatografického rozširovania zóny, a preto je možné detegovať menšie množstvo analytu (Q_{min} klesá so zmenšovaním priemeru kolón). Avšak so zmenšovaním priemeru kolón rastie význam príspevku mimokolónových efektov k rozširovaniu zóny, čo vedie k vyšším požiadavkám na inštrumentáciu. Dávkovacie zariadenia musia poskytovať dostatočne úzku vstupnú zónu, aby bola kompatibilná s malou chromatografickou šírkou píkov a aby nedošlo k znehodnoteniu účinnosti kolóny. Takéto dávkovacie zariadenia však umožňujú dávkovať do kolóny len malý objem vzorky, čo negatívne ovplyvňuje medzu detekcie (medza detekcie je vysoká). Navyše so zmenšovaním priemeru kolón sa výrazne znižuje kapacita kolóny. Z tohto dôvodu by mal byť detektor dostatočne citlivý, aby bol zachovaný prijateľný pracovný rozsah.

LITERATÚRA

1. Dagan S., Amirav A.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7, 737 (1996).
2. Martin A. J. P., Synge R. L. M.: Biochem. J. 35, 1358 (1941).
3. James A. T., Martin A. J. P.: Analyst 77, 915 (1952).
4. James A. T., Martin A. J. P.: Biochem. J. 50, 679 (1952).
5. Golay M. J. E.: *Gas Chromatography*, str. 1. Academic Press, New York 1958.
6. Golay M. J. E.: *Gas Chromatography*, str. 36. Butterworths, London 1958.
7. McWilliam I. G., Dewar R. A.: Nature 181, 760 (1958).
8. Grob K.: Helv. Chim. Acta 48, 1362 (1965).
9. Desty D. H., Haresnape J. N., Whyman B. H. F.: Anal. Chem. 32, 302 (1960).
10. Dandeneau R. D., Zerenner E. H.: J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Comm. 2, 351 (1979).
11. Purnell J. H., Quinn C. P.: *Gas Chromatography*, str. 184. Butterworths, London 1960.
12. Jonker R. J., Poppe H., Huber J. F. K.: Anal. Chem. 54, 2447 (1982).
13. Desty D. H., Goldup A., Swanton W. T.: *Gas Chromatography*, str. 105. Academic Press, New York 1962.

14. Sacks R., Smith H., Nowak M.: *Anal. Chem.* 70, 29A (1998).
15. Van Es A., Janssen J., Cramers C. A., Rijks J.: *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11, 852 (1988).
16. Guiochon G.: *Anal. Chem.* 50, 1812 (1978).
17. Cramers C. A., Janssen H. G., Van Deursen M. M., Leclercq P. A.: *J. Chromatogr.* 856, 315 (1999).
18. Purnell J. H.: *Gas Chromatography*. Wiley, New York 1962.
19. Blumberg L. M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 20, 679 (1997).
20. Giddings J. C., Seager S. L., Stucky L. R., Stewart G. H.: *Anal. Chem.* 32, 867 (1960).
21. Scheidegger A. E.: *The Physics of Flow Through Porous Media*. University of Toronto Press, Toronto 1960.
22. Cramers C. A., Leclercq P. A.: *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 20, 117 (1988).
23. Leclercq P. A., Cramers C. A.: *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8, 764 (1985).
24. Tijssen R., Van den Hoed N., Van Kreveld M. E.: *Anal. Chem.* 59, 1007 (1987).
25. Leclercq P. A., Cramers C. A.: *Mass Spectr. Rev.* 17, 37 (1998).
26. Knox J. H., Saleem M.: *J. Chromatogr. Sci.* 7, 614 (1969).
27. Van Es A.: *High Speed Narrow Bore Capillary Gas Chromatography*. Hüthig, Heidelberg 1992.
28. Korytár P., Matisová E.: *Chem. Listy*, v tlači.
29. Leclercq P. A., Cramers C. A.: *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 10, 272 (1987).
30. Van Es A., Rijks J., Cramers C. A.: *J. Chromatogr.* 477, 39 (1989).
31. Tijssen R.: *Sep. Sci. Technol.* 13, 681 (1978).
32. Gaspar G., Annino R., Vidal-Madjar C., Guichon G.: *Anal. Chem.* 50, 1512 (1978).
33. Van Ysacker P. G.: *Disertační práce*. Eindhoven University of Technology, Eindhoven 1996.
36. Ghijsen R. T., Poppe H., Kraak J. C., Duysters P. P. E.: *Chromatographia* 27, 60 (1989).
35. Jaulmes A., Ignatiadis I., Cardot P., Vidal-Madjar C.: *J. Chromatogr.* 395, 291 (1987).

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

The review deals with theoretical derivation, based on conventional equations and reduced parameters, of relationships describing the analysis time and the related pressure drop. On the basis of derived equations, methods of minimizing the GC analysis time are discussed. Reduction of the column inner diameter and using hydrogen as carrier gas is the best approach to increasing the separation speed in GC. The vacuum outlet operation of capillary columns allows in some situations a further shortening of the analysis time. The effect of reduction of the column inner diameter on chromatographic zone broadening, detection limits and sample capacity is also discussed.