

RYCHLEJŠÍ PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE A JEJÍ VYUŽITÍ V PIVOVARSTVÍ. ČÁST 1. – TEORETICKÉ A PRAKTICKÉ ASPEKTY

FASTER GAS CHROMATOGRAPHY AND ITS UTILIZATION IN BREWING. PART 1. – THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS

TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, MARIE JURKOVÁ, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, JOSEF DVOŘÁK,
DANUŠA HAŠKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s. / *Research Institute of Brewing and Malting, plc.* / Lípová 15, 120
44 Praha 2, e-mail: horak@beerresearch.cz

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Rychlejší plynová chromatografie a její využití v pivovarství. Část 1. – Teoretické a praktické aspekty. *Kvasny Prum.* 55, 2009, č. 9, s. 250–254.

Na laboratoře jsou kladeny stále vyšší nároky jak z hlediska množství změřených vzorků, tak efektivnějšího využití nákladné instrumentace a rychlého získání požadovaných výsledků. Jedním ze způsobů, jak se vyrovnat s těmito nároky, je použití rychlejší plynové chromatografie. V tomto úvodním článku jsou na základě teoretických poznatků diskutovány vlivy typu nosného plynu a jeho regulace, parametrů chromatografických kolon, teplotních programů a detektorů.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Faster gas chromatography and its utilization in brewing. Part 1. – Theoretical and practical aspects. *Kvasny Prum.* 55, 2009, No. 9, p. 250–254.

The interest in analytical laboratories is driven primarily by the desire to higher laboratory throughput, better utilization of high-cost equipment and to reduce the time required to get results. As one of answers to these requirements the attention was focused on faster gas chromatographic analyses. In this introductory article the influences of different type of carrier gases and their pressure regulators, parameters of chromatographic columns, temperature programs and detectors are discussed.

Horák, T. – Čulík, J. – Jurková, M. – Čejka, P. – Kellner, V. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Eine schnellere Gaschromatographie und ihre Ausnützung in der Brauindustrie. Teil 1. – Theoretische und praktische Aspekte. *Kvasny Prum.* 55, 2009, Nr. 9, S. 250–254.

Zurzeit werden auf die Labors immer höhere Ansprüche anlässlich der Menge von gemessenen Mustern, einer besseren Ausnützung der kostenaufwendigen Messtechnik und schneller Erlangung der Resultate gestellt. Eine Möglichkeit diesen Anforderungen zu Recht zu kommen, ist die Anwendung der schnelleren Gaschromatographie. In diesem Leitartikel werden auf Grund der theoretischen Erkenntnisse die Einflüsse des Traggastyps und seiner Regulation, Parameter der chromatographischen Kolonne, der Temperaturprogramme und Detektor diskutiert.

Klíčová slova: rychlejší plynová chromatografie, nosné plyny, kolony, teplotní programy, detektory

Key words: faster gas chromatography, carrier gases, columns, temperature programs, detectors

1 ÚVOD

Zájem o rychlejší plynově chromatografickou separaci se datuje už k počátku plynové chromatografie. Koncept chromatografie plyn-kapalina představili Martin a Synge v roce 1941 [1]. V praxi ji poprvé použili James a Martin v roce 1952 [2,3]. V roce 1957 Golay poprvé navrhl použít v plynové chromatografii kapilární kolony s tenkým filmem [4,5].

Už na začátku rozvoje plynové chromatografie bylo zřejmé, že cesta ke zrychlení separace spočívá v miniaturizaci. Miniaturizací je myšleno zmenšení velikosti částic v případě náplňových kolon nebo zmenšení vnitřního průměru v případě kapilárních kolon. Navíc toto zmenšení umožňuje ještě zkrátit i délku kolony, aniž by došlo ke zhoršení výstupního rozlišení, a tak dalším způsobem podpořit zrychlení chromatografické analýzy. Použití kapilární kolony v rychlé plynové chromatografii poprvé popsali Desty a kol. v roce 1962 [6].

Další rozvoj rychlé plynové chromatografie byl však zpomalen. Pravděpodobně z toho důvodu, že kapilární kolony se vyznačovaly velkým rozlišením [7], a výzkum se zaměřoval především na analýzy komplexnějších směsí; doba analýzy a selektivita nebyly hlavním předmětem výzkumného zájmu. Ke zpomalení rozvoje rychlé plynové chromatografie přispěl i nedostatek vhodné instrumentace. Situace se začala měnit až koncem sedmdesátých let a hlavně v průběhu osmdesátých let minulého století. Zatím nejrychlejší chromatografický záznam na kapilární koloně dosáhl Van Es a kol. [8] v roce 1988. Pořádilo se jim rozdělit 9 uhlovodíků za pouhých 0,6 s, a to na koloně dlouhé 30 cm s vnitřním průměrem 50 μm . Od devadesátých let vývoj rychlé chromatografie pokročil díky novým způsobům umožňujícím rychlejší ohřev kolon.

2 DEFINICE RYCHLEJŠÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE

V minulosti byl pojem rychlé nebo rychlejší plynové chromatografie již mnohokrát diskutován [9–14]. Rozhodujícím faktorem při po-

1 INTRODUCTION

The interest in faster gas chromatography dates back to the period directly after the invention of gas chromatography. The concept of gas-liquid chromatography was introduced by Martin and Synge in 1941 [1]. James and Martin used for the first time this technique in practice in 1952 [2,3]. In 1957 Golay proposed for the first time using of capillary columns with thin film in gas chromatography [4,5].

In the beginning of the development of gas chromatography it was clear that miniaturization is the way for faster separation. The miniaturization included reducing size of particles in case of packed columns or decreasing of internal diameter in case of capillary columns. Moreover due to this the length of column could be cut down without losing resolution so the faster chromatographic analysis is supported by this way. In 1962 Desty et al. for the first time described using of capillary column in fast gas chromatography [6].

However another development of fast gas chromatography was slowed down. Probably it was due to big resolution of capillary columns [7], the research focused its interest to analyses of more complex mixtures and time of analyses and selectivity were not be very important. The absence of suitable instrumentations also contributed to slugging on the development of the fast gas chromatography. Situation started to change until the end of seventies and especially during the eighties. In 1988 Van Es et al. reached the fastest chromatographic record by using of capillary column [8]. They successfully separated up 9 hydrocarbons in only 0.6 s by using column with 30 cm length and with 50 μm of internal diameter. Since the nineties the advance of fast chromatography has been made possible due to new techniques enabling faster heating of columns.

2 DEFINITIONS OF FASTER GAS CHROMATOGRAPHY

The definition of fast or faster gas chromatography has been discussed for some time [9–14]. Concepts relating fast gas chromatography to run time clearly indicate the bottom-line of getting results

Tab. 1 Šířka píků jako funkce vnitřního průměru kolony. (Všechny kolony měly stejný počet teoretických pater.) [15] / *Peak widths as a function of the column internal diameter. (All columns have the same plate number) [15]*

Vnitřní průměr kolony / Column internal diameter (μm)	Šířka píku / Peak width (s)
530	2,6
320	1,2
250	0,85
200	0,64
100	0,29
50	0,14

suzování rychlé chromatografie je samozřejmě rychlejší získání analytických výsledků. Nicméně definice založené výhradně na době trvání chromatografické analýzy opomíjejí taková důležitá hlediska, jako je separace jednotlivých píků a kapacita píků. Jinými slovy, špatná separace tří píků během jedné minuty je silně neuspokojivá ve srovnání s rozdělením patnácti píků až na základní linii během téhož časového intervalu. Ačkoliv obě analýzy trvají pouze 1 min, druhá analýza poskytuje mnohem větší separační účinnost během téže doby. Proto je důležité použít definici, která bude zohledňovat i účinnost separace v čase. Z tohoto důvodu se jeví jako rozumné použít definici založenou na šířce píků.

V tab. 1 je uvedena závislost šířky píku na vnitřním průměru kapilární kolony. Z této tabulky je vidět, že pro rychlejší chromatografii hovoří menší vnitřní průměry kolony. Přitom v tomto příkladu byl zachován stejný počet teoretických pater u všech kolon. Jak vyplývá z tab. 1, při změně kolony o vnitřním průměru 530 μm na kolonu s vnitřním průměrem 100 μm dojde přibližně k devítinásobnému zúžení píků při stejném rozlišení a stejné kapacitě píků. To odpovídá asi devítinásobně rychlejší chromatografické analýze bez zhoršení rozdělení. Tento přístup, který umožňuje porovnávat chromatografické separace, je tedy založený jak na kvalitě rozdělení jednotlivých látek, tak na absolutní rychlosti analýzy [15].

3 INSTRUMENTACE PRO RYCHLEJŠÍ PLYNOVOU CHROMATOGRAPHII

3.1 Nosný plyn a jeho regulace

Výběr nosného plynu má velmi podstatný vliv na rychlost chromatografické analýzy [16-18]. V kapilární plynové chromatografii se nejčastěji používá helium, dusík, vodík nebo argon. Nesporná výhoda helia spočívá v tom, že se dá použít v kombinaci se všemi typy detektorů, včetně hmotnostních. Z tohoto důvodu jde o nejpoužívanější nosný plyn. Helium a dusík jsou netoxické, nehořlavé a i proto velmi bezpečné. Na druhé straně cena helia je podstatně vyšší než cena ostatních nosných plynů. Vodík vytváří se vzduchem výbušnou směs, proto z bezpečnostního hlediska může být používání vodíku poněkud rizikové. Oproti heliu a dusíku poskytuje vodík významné výhody v rychlosti analýzy, citlivosti a rozlišení na jednotku času [13]. Porovnání relativních rychlostí analýzy založené na publikovaných datech pro tyto nejpoužívanější plyny uvádí tab. 2.

Účinnost chromatografické kolony se dá vyjádřit počtem teoretických pater (N) nebo výškovým ekvivalentem teoretického patra ($H = L/N$, kde L je délka kolony). Výškový ekvivalent teoretického patra je funkcí průměrné lineární rychlosti nosného plynu (\bar{u}), kterou pro kapilární kolony popisuje Golayova-Giddingsova rovnice [5,19]. Tato závislost je funkcí průměru kolony (d_c), tloušťky stacionární fáze (d_s), kapacitního faktoru (k) a difúzních koeficientů analytu v mobilní a stacionární fázi. Pro danou kolonu a daný analyt získáme pro různé plyny (vodík, dusík, helium) tři různé křivky (obr. 1).

Z těchto závislostí vyplývají následující důležité skutečnosti [20]:

- Pro všechny nosné plyny je minimální hodnota H prakticky nezávislá na typu nosného plynu. Z toho plyne, že za předpokladu nastavení optimální průměrné rychlosti nosného plynu všechny tři plyny poskytují srovnatelnou účinnost a rozlišení.
- Optimální rychlost plynu je nejvyšší pro vodík ve srovnání s heliem nebo dusíkem. Pro standardní kapilární kolony (délka 10–50 m, vnitřní průměr 0,25–0,32 mm a tloušťka filmu 0,1–0,5 μm) při optimální rychlosti je vodík 1,5krát rychlejší než helium a 3,3krát rychlejší než dusík, přičemž výškový ekvivalent teoretického patra je přibližně stejný.

faster. However, definitions based only on run time miss the important aspects of peak separation and peak capacity. It means that a poor separation of three peaks in 1 min is inferior to the baseline separation of 15 peaks in the same minute. Although all these analyses are finished in 1 min, the second case provides more separation power per time. Therefore, it is important to use a definition that is representative of separation per time. Thus, a definition based on peak width seems reasonable.

Peak widths as a function of column internal diameters are shown in Tab. 1. It illustrates the benefit of smaller diameter columns for faster gas chromatography. The total column efficiency (plate number) was held constant. As we can see from the Tab. 1, changing column internal diameter from a 530 μm to a 100 μm can generate approximately 9 times narrower peaks with the same resolutions and peak capacity. This corresponds with 9 times faster chromatographic analysis with no loss in separation. This approach allows for the comparison of separations based on the quality of the separation as well as the absolute speed [15].

3 INSTRUMENTATION FOR FASTER GAS CHROMATOGRAPHY

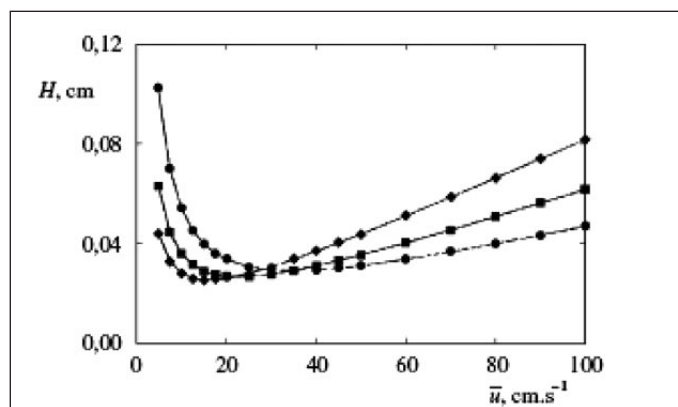
3.1 Carrier gas and its regulation

The carrier gas choice have a substantial influence on analysis speed [16-18]. Helium, nitrogen, hydrogen or argon are very often used in gas capillary chromatography. The great advantage of helium consists in universal using of all types of detectors, mass detectors included. From this reason helium is the most extended carrier gas. Helium and nitrogen are non toxic, non-flammable and so very safe. On the other hand, helium is much more expensive in comparison with different carrier gases. Hydrogen is not very popular because of his high explosivity. Compared to helium or nitrogen the using of hydrogen provides significant advantage in speed of analysis, sensitivity and resolution in time unit [13]. Tab. 2 shows the comparison of relative speeds for the most used carrier gases based on published data.

The efficiency of chromatographic column could be expressed as the number of theoretical plates (N) or as the equivalent of column plate height ($H = L/N$, L means the column length). The equivalent of column plate height is function of the speed average of carrier gas (\bar{u}) which is described by Golay-Giddings equation [5,19]. This dependence is the function of the column diameter (d_c), film thickness (d_s), capacity factor (k) and diffusion coefficients of compound in mobile and stationary phases. For a given column and a given compound different curves for different gases are obtained (Fig. 1).

These important facts resulted from these dependences [20]:

- for all carrier gases the value H is almost independent on the type of carrier gas. So when an optimal average of carrier gas speed is adjusted all three types of gases give similar efficiency and resolution
- the optimal carrier gas speed is the highest for hydrogen in comparison with helium or nitrogen. For current capillary columns (length 10–50 m, internal diameter 0.25–0.32 mm and film thickness 0.1–0.5 μm) and using the optimal speed the hydrogen is 1.5 times faster than helium and 3.3 times faster than nitrogen, respectively. And it is important that the equivalent of column plate eight is approximately the same



Obr. 1 / Fig. 1 $H - \bar{u}$ křivky pro nosné plyny vodík ●, helium ■, dusík ◆ [22] / H versus \bar{u} curves for carrier gases hydrogen ●, helium ■, nitrogen ◆ [22]

c) Strmost křivek klesá v pořadí dusík – helium – vodík. To znamená, že pokud použijeme dusík při práci s vyšší rychlostí plynu, než je rychlost optimální, dochází k rychlému poklesu účinnosti. Naopak, v případě vodíku lze rychlost plynu zvýšit bez výrazné ztráty účinnosti. Helium, jak je patrné z obrázku, má střední strmost. Strmost těchto křivek je významná pro rychlou plynovou chromatografii. Při zmenšování průměru kolony totiž klesá strmost této křivky, křivka se stává plošší a zvyšuje se hodnota optimální rychlosti. V důsledku je tedy možné zvyšovat rychlost nosného plynu bez výrazného snížení účinnosti.

Pokud se k detekci používají detektory citlivé na hmotnostní tok, jako je plamenoionizační detektor (FID) nebo termoionizační detektor (NPD), citlivost je závislá na množství analytu, které se dostane do detektoru za jednotku času. Dříve eluující pík se projeví vyšší citlivostí než později eluující širší pík. Z tohoto důvodu rychlá plynová chromatografie v kombinaci s vodíkem jako nosným plynem poskytuje nejvyšší citlivost.

Navzdory těmto nesporným výhodám se vodík jako nosný plyn běžně nepoužívá. Hlavní příčinou je skutečnost, že se vzduchem vytváří výbušnou směs. Ve skutečnosti je však riziko exploze velmi nízké. Jednak je velmi nepravděpodobné prasknutí pružných křemenných kapilárních kolon a navíc průtoky nosného plynu se pohybují v řádu ml/min, a tudíž pravděpodobnost nahromadění vodíku v koncentraci vyšší než kritické je mizivá. Navíc vodík se vyznačuje velmi rychlou difúzí. Moderní chromatografy jsou vybaveny elektronickou kontrolou průtoku plynu, která umožňuje vypnutí přívodu plynu, pokud dojde k poklesu tlaku. Kromě toho jsou dnes k dispozici generátory vodíku, které eliminují nebezpečí plynoucí ze skladování a manipulace s vodíkovými tlakovými lahvemi.

Elektronická kontrola tlaku se také významným způsobem podílí na zkrácení doby analýzy. Viskozita plynu se totiž zvyšuje se vzrůstající teplotou (při použití teplotního programu), a tak dochází k poklesu průtoku plynu v koloně a tedy i k prodloužení doby analýzy, snížení odezvy detektoru a ztrátě účinnosti, pokud se rychlost dostane pod optimální rychlost [21]. Elektronická kontrola tlaku umožňuje plynule měnit tlak na hlavě kolony, a tak pracovat s konstantním průtokem plynu během celé analýzy, a to i při teplotním programu pece.

Pro regulaci tlaku je u rychlejší a zejména u rychlé plynové chromatografie důležitá možnost nastavit maximální výstupní tlak z regulátoru na dostatečně vysoké hodnoty. Vzhledem k tomu, že se v rychlé plynové chromatografii používají velmi tenké kolony s vnitřním průměrem 0,1 mm nebo dokonce menším, je zapotřebí podstatně vyšší tlak na dosažení optimální rychlosti proudění plynu kolonou ve srovnání s konvenčními kolonami. Při práci v modu konstantního průtoku je důležitým kritériem elektronické regulace kontroly tlaku i maximální rychlost nárůstu tlaku. To bývá často problém použité instrumentace, proto se v rychlé plynové chromatografii většinou pracuje při konstantním tlaku [22].

3.2 Parametry chromatografických kolon

Rychlost plynové chromatografické analýzy lze významně ovlivnit délkou, průměrem a tloušťkou filmu stacionární fáze kapilární kolony. Zkrácení délky kolony představuje nejjednodušší způsob, jak zkrátit čas analýzy. Vzhledem k tomu, že počet teoretických pater je přímo úměrný délce kolony, tak tento postup lze aplikovat pouze v případě, že je možné akceptovat nižší účinnost kolony. Zkrácením kolony totiž dochází ke snížení separační účinnosti kolony.

Jak vyplývá z teorie rychlé plynové chromatografie, tak podstatně účinnějším způsobem zrychlení analýzy je použití kolony s menším průměrem [13]. Jelikož počet teoretických pater je nepřímo úměrný vnitřnímu průměru kolony, tak zmenšením vnitřního průměru se zvýší separační účinnost kolony [23]. To znamená, že při zmenšení průměru kolony na polovinu se počet teoretických pater zvýší dvojnásobně. Např. kolona s průměrem 50 μm a délkou 5 m má stejný počet teoretických pater jako kolona s průměrem 250 μm a délkou 25 m [24]. Při snížení vnitřního průměru kolony je tedy možné zkrátit délku kolony a zrychlit tak analýzu, aniž by došlo ke ztrátě separační účinnosti.

Hodnota lineární rychlosti nosného plynu je dalším parametrem, který lze s výhodou využít ke zrychlení analýzy. Při snižování vnitřního průměru kolony klesá strmost $H - \bar{u}$ křivky, která se zploštuje, a díky tomu se zvyšuje hodnota optimální rychlosti. Z tohoto důvodu je možné zvyšovat rychlost nosného plynu, aniž by došlo k výraznému zhoršení účinnosti. Některé typické hodnoty pro helium jsou uvedené v tab. 3 [22]. V důsledku toho je možné použít vyšších rychlostí, než je optimální, a pokles účinnosti je podstatně menší, než při použití kolon s větším vnitřním průměrem.

Zmenšováním vnitřního průměru kolony však dochází ke snižování

c) the slope of curves drops in order nitrogen – helium – hydrogen. That means, when nitrogen is used in higher speed than the optimal speed is, fast degradation of efficiency is achieved. On the other hand in the case of hydrogen the gas speed can be increased without significant losing of efficiency. Helium is characterized by the middle slope (fig. 1). The slope of these curves is important for fast gas chromatography. With decreasing of the column diameter the slope of curve drops, the curve becomes more flat and the optimal gas speed increase. Due to this the considerable speed of carrier gas is possible without considerable degradation of efficiency.

When the detectors sensitive for mass flow – as flame ionization detector (FID) or thermo ionization detector (NPD) – are used the sensitivity depends from the amount of compound of interest incoming detector in time unit. The earlier eluting peak shows higher sensitivity than the later eluting wider peak. From this reason the fast gas chromatography with hydrogen as the carrier gas gives the best sensitivity.

Despite of these implicit advantages hydrogen is not used very often. The main reason is that the explosive mixture is formed with air. In fact the risk of explosion is very low. Partly the break of flexible silica capillary columns is improbable and moreover the flow rates are in range of ml/min and so the risk of accumulation of hydrogen in the concentration greater than critical is very low. Furthermore hydrogen is known for its fast diffusion. Modern gas chromatographs equipped with electronic pressure control modules enable switching out the inlet of carrier gas when the gas decrease is detected. Also the gas generators are available today and so the emergency of stocking and manipulation with hydrogen bombs is eliminated.

Electronic pressure control is the important factor in faster gas chromatographic analysis. The viscosity of gas increases with rising temperature (in the case of temperature program) and so the flow rate decreases. By this way the time of analyses extends, the response decreases and the column efficiency lost when the gas speed lets down the optimal value [21]. Electronic pressure control enable continuous changing the head pressure and due to the constant flow rate of carrier gas is possible during the whole analysis including temperature program.

The maximum output pressure is very important for the pressure regulation in fast gas chromatography. Inasmuch as very narrow-bore columns (internal diameter 0.1 mm or less) are used in fast gas chromatography the considerably higher pressure is necessary to reach the optimal gas speed in comparison with conventional columns. During analysis in the constant flow mode the important parameter of the electronic pressure control unit is also the maximum increase of pressure. This is mostly problem of using instrumentation so the constant pressure mode is often used in fast gas chromatography [22].

3.2 Chromatographic column parameters

The column parameters, as length, internal diameter and film thickness of stationary phase of capillary column significantly influence the speed of gas chromatographic analysis. The simply way how to reduce the time of analysis is shortening of column length. Due to fact that number of column plates is directly proportional to a column length this procedure could be applied only if lower column efficiency is acceptable. Shortening of column leads to degradation of separation efficiency.

As the theory of fast gas chromatography shows that the more effective way how to increase the speed of analyses is using columns with narrower internal diameter [13]. The number of column plates is inversely proportional to column internal diameter, so the separation efficiency of column enhances by reduction of internal diameter [23]. That means if internal diameter of column decreases on the half, the number of column plates rises by twice. For example the number of column plates is the same as with the column of 50 μm of internal diameter and 5 m length as with the column of 250 μm of internal diameter and 25 m length [24]. When the narrower internal diameter of column is used the reduction of column length is possible and due

Tab. 2 Porovnání relativních rychlostí proudění různých nosných plynů (doba analýzy je nepřímo úměrná rychlosti proudění nosného plynu) [13] / Comparison of relative speeds for several types of carrier gases (the run time is inversely proportional to the speed) [13]

Nosný plyn / Carrier gas	Relativní rychlost / Relative speed
Vodík / Hydrogen	1
Helium / Helium	0,78
Dusík / Nitrogen	0,24

Tab. 3 Vliv vnitřního průměru kapilární kolony na délku kolony L (při stejném počtu teoretických pater $n=100\ 000$) a průměrnou rychlost nosného plynu \bar{u} pro helium [22] / *The influence of internal diameter of capillary column on column length (at the same column plates $n=100\ 000$) and on the average velocity \bar{u} of carrier gas as helium [22]*

Vnitřní průměr / Internal diameter (mm)	L (m)	\bar{u} (cm/s)
0.53	50	23
0.25	25	33
0.15	15	36
0.10	10	40

kapacity kolony. Pro běžné analýzy je použitelný nejmenší vnitřní průměr 0,050 mm. Ještě tenčí kapilární kolony již mají příliš malou kapacitu a nejsou vhodné pro rutinní analýzy [25,26].

3.3 Teplotní program

V rychlé chromatografii je důležitým parametrem také rychlost ohřevu chromatografické pece a její následné ochlazení umožňující zahájení další analýzy. Vzhledem ke krátké době analýzy je zapotřebí vyšších rychlostí ohřevu pece. Moderní plynové chromatografy umožňují vyhřátí pece rychlostí 50–100 °C/min. V konvenčních chromatografech rychlému ohřevu brání velký objem pece. Proto, aby se podařilo zrychlit ohřev, se vkládá do pece izolační polštář zmenšující objem pece [27]. Tímto způsobem však nelze zvýšit rychlost ohřevu razantním způsobem. Pro velmi rychlé programování teploty se používají nekonvenční topná zařízení. Kapilární kolona se umísťuje do kovové trubice, která je odporově vyhřívána a umožňuje bleskový a přitom reprodukovatelný nárůst teploty rychlostí až 100 °C/s.

Tato přídavná topná tělesa se vyznačují nízkou teplotní kapacitou, proto jejich zchlazení na počáteční teplotu je poměrně rychle (z 300 °C na 50 °C za méně než 30 s) [28,29]. V případě konvenčních chromatografů je možné využít kryto-chlazení pomocí stlačeného oxidu uhličitého nebo dusíku.

3.4 Detektory

V celém systému instrumentace při rychlejší a zejména pak rychlé chromatografii je důležité, aby detektor nepřispíval k rozšiřování chromatografické zóny, a tak ve svém důsledku nesnižoval účinnost kolony. Kritickým parametrem z tohoto hlediska je objem cely detektoru. Pokud by byl příliš velký, docházelo by k výraznému rozšiřování zóny a v konečném důsledku ke snížení meze detekce.

U detektorů citlivých na hmotnostní průtok, jako je např. v pivovarské analytice nepoužívanější plamenoionizační detektor (FID), kde mrtvý objem je v tomto případě prostor mezi koncem kolony a plamenem detektoru, se problém řeší pomocí zvýšeného průtoku přídavného plynu, aniž by docházelo k negativnímu ovlivnění meze detekce.

Dalším typem detektoru, používaným při rozborech piva, např. při stanovení vicinálních diketonů, je detektor elektronového záchytu (ECD). Ten se chová jako koncentrační detektor, proto je důležité, aby cela byla co nejmenší. Na druhé straně u tohoto detektoru je nutné, aby se vysokoenergetické elektrony emitované β -zářičem mohly srazit s molekulami nosného plynu a mohly tak vzniknout sekundární elektrony s nižší energií. Proto musí být vždy zachována určitá vzdálenost mezi anodou a katodou. Pro tento účel byly zkonstruovány mikro-ECD detektory [22].

Hmotnostní detektory představují další skupinu detektorů, která nabývá na významu. Slouží nejen ke kvantifikaci, ale také k identifikaci a potvrzení látek. Přispívají i ke zrychlení analýzy, zejména v kombinaci s dekonvolučními technikami. Pro skenující detektory, jako jsou kvadrupolové hmotnostní detektory nebo iontové pasti, je v plném scanu možné získat maximálně 10–20 spekter/s. To je na hranici použitelnosti pro rychlou chromatografii. Proto je nutné při rychlé chromatografii použít neskenující hmotnostní detektory typu time-of-flight. Tyto detektory totiž umožňují až 500 plných spekter/s [30].

Další nároky v oboru rychlé chromatografie jsou v souvislosti s detektory kladeny na rychlost elektroniky, přesněji řečeno na dostatečně velkou vzorkovací frekvenci. K dobrému popsání chromatografického píku je zapotřebí minimálně 20 bodů [31,32]. Vzhledem k tomu, že v rychlé chromatografii jsou píky velmi úzké, je tento požadavek kritický. Například pro šířku píku 50 ms je nutná frekvence sběru dat 200 Hz. S tím se zároveň značně zvětšuje objem získaných dat, který je při současné úrovni výpočetní techniky bez obtíží zpracovatelný.

to this the speed of analyses accelerates without losing of separation efficiency.

The value of linear velocity of carrier gas is another parameter for speed up of analysis time. The slope of $H - \bar{u}$ curves drops with reducing of internal diameter and these curves become more flat and the optimal speed increases. From this reason the carrier gas speed could be increased without significant losing of efficiency. Some typical values for helium as carrier gas are shown in Tab. 3 [22]. So the higher speeds than optimal could be used and the degradation of efficiency is considerably lower in comparison with the columns with bigger internal diameter.

However the reduction of the column internal diameter leads to downsizing of the column capacity. The smallest internal diameter is 0.05 mm for usual analysis. The capacity of furthermore narrow bore capillary columns is too low and these columns are not suitable for routine analyses [25,26].

3.3 Temperature program

The maximum allowable heating rate and evidently also the cooling time of the chromatographic oven are hence very important parameters in fast gas chromatography. Due to short time of analysis higher speed of oven heating is required. The modern gas chromatographic ovens allow maximum programming rates of 50–100 °C/min. Higher heating rates are difficult to obtain due to higher thermal mass of conventional ovens. Since the heating and cooling of the oven also depends on the oven dimensions, reducing the oven size allows faster ramping. Reducing the oven size can be done by an oven insert (pillow) [27]. Faster ramping cannot be increased dramatically by this way. For very fast programmed heating non conventional heating blocks are used. The capillary column is placed inside a resistively heated metal tube. It provides flash and reproducible heating rates up to 100 °C/s.

These added heating blocks are characterized by low thermal capacity and so the cooling is quite fast (from 300 to 50 °C in less than 30 s) [28,29]. In the case of usual gas chromatographs the cryo-cooling with compressed carbon dioxide or nitrogen can be used.

3.4 Detectors

In the whole system of the faster or fast gas chromatographic instrumentation it is important that peak broadening caused by the detector must be small enough to preserve the column efficiency. The volume of detector cell is a critical parameter from this point of view. If this volume is too big an expressive peak broadening could appear and eventually the decrease of the detection limit resulted.

In brewing analytics the flame ionization detector (FID) is very often used and it is sensitive on mass flow. In this type of detector the dead volume is a space among the end of column and the flame of detector. The problem with peak broadening is solved by enhanced of flow rate of make-up gas without negative influence on limit of detection.

Another type of detector frequently used for beer analyses, e.g. for the determination of vicinal diketones, is electron capture detector (ECD). This detector works as concentration detector and so it is very important to be as smallest as possible. On the other hand it is necessary that the high-energetic electrons emitted by β -source could push together with the molecules of carrier gas and secondary electrons with lower energy could form. From this reason a minimum space among anode and cathode must be kept. For this purpose micro ECD detectors were developed [22].

Mass selective detectors represent another group of detectors whose importance is rapidly growing. They are primarily used not only for quantification but also for analyte identification and confirmation. Mass detection is also a means of reducing the analysis time, especially if combined with deconvolution techniques. For scanning detectors such as the quadrupole and ion trap instruments a maximum of 10 – 20 spectra/s in full-scan mode are limited. This is just on the edge of applicability for fast gas chromatography. So non-scanning mass detectors, such as time-of-flight analysers, are suitable. These detectors can provide up to 500 full spectra/s [30].

Other requirements in fast gas chromatography related detectors consist in speed of electronics. The sampling frequency of the detector must be high enough to provide at least 20 data points across the peak for an accurate representation of the peak [31,32]. This request is critical because as in fast gas chromatography the peaks are very narrow. For example for peak width 50 ms the sampling frequency 200 Hz is necessary. The amount of collected data significantly grows up but it is no problem with contemporary level of computer equipments.

4 ZÁVĚR

V článku je ukázán vliv průměru chromatografické kolony a typu nosného plynu na rychlost plynově chromatografické analýzy. Využitím velmi tenkých kolon v kombinaci s vodíkem jakožto nosným plynem a použitím elektronické regulace tlaku nosného plynu a dále termostatů s mimořádně rychlým ohřevem lze výrazným způsobem zkrátit dobu analýzy. Jako detektory lze použít plamenionizační detektor s přídavným plynem eliminující ztrátu citlivosti v důsledku rozmytí píků nebo mikro-ECD detektor. Detektory musí být vybaveny elektronikou umožňující dostatečně rychlý sběr dat.

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM 6019369701. Autoři také děkují subjektům sdruženým v ČSPS za podporu při řešení tohoto úkolu.

*Recenzovaný článek
Do redakce došlo 6. 4. 2009*

LITERATURA / REFERENCES

- Martin, A. J. P., Synge, R. L. M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J.* **35**, 1941, 1358–1368.
- James, A. T., Martin, A. J. P.: Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.* **50**, 1952, 679–690.
- James, A. T., Martin, A. J. P.: Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *Analyst* **77**, 915–932.
- Golay, M. J. E.: *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1958.
- Golay, M. J. E.: *Gas Chromatography*, Butterworths, London, 1958, 36.
- Desty, D. H., Goldup, A., Swanton W. T.: *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1962, 105.
- Sacks, R., Smith, H., Nowak, M.: High-speed gas chromatography. *Anal. Chem.* **70**, 1998, 29A–37A.
- Van Es, A., Janssen, J., Cramers, C. A., Rijks, J.: Sample enrichment in high speed narrow bore capillary gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **11**, 1988, 852–857.
- Klemp, M. A., Akard, M. L., Sacks, R. D.: Cryofocusing inlet with reverse flow sample collection for gas chromatography. *Anal. Chem.* **65**, 1993, 2516–2521.
- Akard, M. L., Sacks, R. D.: High speed GC air monitoring using cryointegration for sample collection. *J. Chromatogr. Sci.* **32**, 1994, 499–505.
- Dagan, S., Amirav, A.: Fast, very fast and ultra-fast gas chromatography-mass spectrometry of thermally labile steroids, carbamates and druha in supersonic molecular beams. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 1996, 737–752.
- van Deursen, M. M., Beens, J., Janssen, H. G., Leclercq, P. A., Cramers, C. A.: Evaluation of time-of-flight mass spectrometric detection for fast gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **878**, 2000, 205–213.
- Korytár, P., Matisová, E.: Rýchla plynová chromatografia. *Chem. Listy* **95**, 2001, 470–476.
- Korytár, P., Janssen, H. G., Matisová, E., Brinkman, U. A. Th.: Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and application. *Trends Anal. Chem.* **21**, 2002, 558–572.
- Klee, M.S., Blumberg, L.M.: Theoretical and practical aspects of fast gas chromatography and method translation. *J. Chromatogr. Sci.* **40**, 2002, 234–247.
- Blumberg, L. M.: Theory of fast capillary gas chromatography. Part 1: Column efficiency. *J. High Resolut. Chromatogr.* **20**, 1997, 597–604.
- Blumberg, L. M.: Theory of fast capillary gas chromatography. Part

4 CONCLUSIONS

This review is focused on the influence of the internal diameter of the chromatographic column and the type of carrier gas on the time of gas chromatographic run. Using of very narrow columns in combination with hydrogen as carrier gas and electronic pressure control unit and also flash heating blocks the time of analysis can be radically reduced. Flame ionization detector with make-up gas for elimination of peak broadening or micro-ECD detector could be successfully used. Detectors must be equipped with electronics enabling high sampling frequency.

Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6019369701) and by members of the Czech Beer and Malt Association is gratefully acknowledged.

- Speed of analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* **20**, 1997, 679–687.
- Blumberg, L. M., Berger, T. A.: Molecular basis of peak width in capillary gas chromatography under high pressure drop. *Anal. Chem.* **65**, 1993, 2686–2689.
- Giddings, J. C., Seager, S. L., Stucki, L. R., Stewart, G. H.: Plate height in gas chromatography. *Anal. Chem.* **32**, 1960, 867–870.
- David, F., Sandra P.: Use of hydrogen as carrier gas in capillary GC. *Am. Lab.* **31**, 1999, 18–19.
- Grand, D. W.: *Capillary Gas Chromatography*. Wiley, Chichester, 1996.
- Korytár, P., Matisová, E.: Inštrumentácia pre rýchlu plynovú chromatografiu. *Chem. Listy* **95**, 2001, 783–790.
- Zeeuw de, J., Vonk, N., Smits, R., Gummersbach, J.: Efficient and fast analysis of a wide range of chemical products using a non-polar 0.15-mm-I.D. capillary column. *Int. Lab.* **29**, 1999, 28–30.
- Leclercq, P. A., Cramers, C. A.: High-speed GC-MS. *Mass Spectr. Rev.* **17**, 1998, 37–49.
- Jaulmes, A., Ignatiadis, I., Cardot, P., Vidal-Madjar, C.: Characterization of peak asymmetry with overloaded capillary columns. *J. Chromatogr.* **395**, 1987, 291–306.
- Ghijssen, R. T., Poppe, H., Kraak, J. C., Duysters, P. P. E.: The mass loadability of various stationary phases in gas chromatography. *Chromatographia* **27**, 1989, 60–66.
- David, F., Gere, D. R., Scanlan, F., Sandra, P.: Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **842**, 1999, 309–319.
- van Deursen, M. M., Beens, J., Cramers, C. A., Janssen, H. G.: Possibilities and limitations of fast temperature programming as a route towards fast GC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **22**, 1999, 509–513.
- Dallüge, J., Ou-Aissa, R., Vreuls, J. J., Brinkman, U. A. Th., Verhaar, J. R.: Fast temperature programming in gas chromatography using resistive heating. *J. High Resolut. Chromatogr.* **22**, 1999, 459–464.
- van Deursen, M.M., Beens, J., Janssen, H. G., Leclercq, P. A., Cramers, C. A.: Evaluation of time-of-flight mass spectrometric detection for fast gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **878**, 2000, 205–213.
- Annino, R.: Practical limits of high speed chromatography: Evaluation with a computer based theoretical model of several commercially available gas chromatographs. *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 1996, 285–290.
- Dyson, N.: Peak distortion, data sampling errors and the integrator in the measurement of very narrow chromatographic peaks. *J. Chromatogr. A*, **842**, 1999, 321–340.