

PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE A JEJÍ APLIKACE V ORGANICKÉ ANALÝZE

Jiří G.K. Ševčík

Katedra analytické chemie PŘF UK, Albertov 2030, CZ-128 40 Praha 2

sevcik@natur.cuni.cz

Plynová chromatografie je jednou z nejranějších a nejčastěji používaných separačních metod. Význam plynové chromatografie pro rozvoj metodologie analýzy byl záhy oceněn udělením Nobelovy ceny pánům Martin(ovi) a Synge(ovi) v roce 1952.

Analytická metoda plynové chromatografie je částí analytického postupu získání informace o složení směsí látek ve smyslu zadání. Jak vyplývá z níže uvedeného diagramu, je zadání problému klíčovým článkem určujícím jednotlivé stupně analytického postupu a kriteria posuzující získanou informaci. Z výše uvedeného vyplývá i rozmanitost uspořádání analytické metody plynové chromatografie.

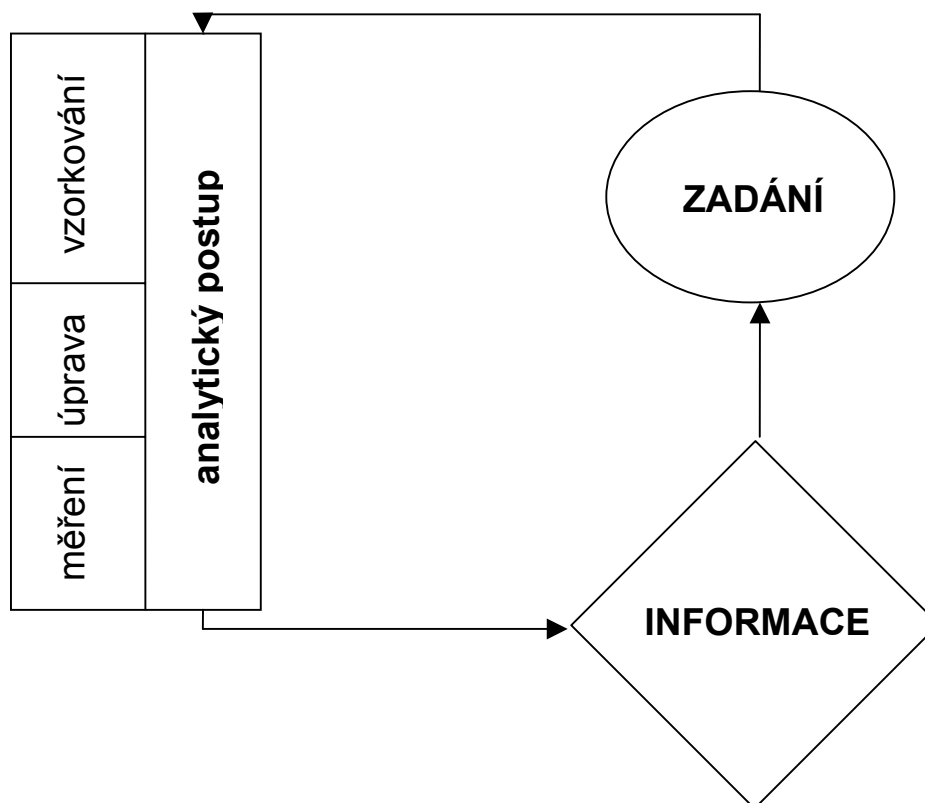


Fig. 1

Základní schema analytického řešení

Použitelnost metody plynové chromatografie pro analytické řešení je podmíněna zadáním a nikoli možnostmi samotné metody, neboť získané výsledky řešení se stanou informací jen poskytují-li odpověď, která je relevantní zadání. Při nesplnění těchto podmínek se vynaložený intelektuální a finanční potenciál stává pouze informačním šumem.

Výše uvedená poznámka má upozornit čtenáře, že dále uváděné vztahy, popisy a diskuse jsou relevantní pouze v případě odpovídajícím zadání a že sebeobsažnější diskuse dílčího problému, bez udání zadání, nevede k řešení.

1. Základní pojmy

Analytická metoda plynové chromatografie je založena na opakovaném ustavení rovnovážného poměru koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází, nazývaný rozdělovací koeficient K_D . Platí

$$K_D = \frac{c_s}{c_M} \quad (1)$$

K opakovanému ustavení dochází v důsledku unášení analytu nacházejícího se v mobilní fázi nad nový, analytem dosud neobsazený díl stacionární fáze. Tento transportní děj (migrace) analytu od počátku ke konci kolony je tedy určen lineární rychlostí u mobilní fáze v koloně, [$\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$]. Kolonou mající délku L [cm], potom projde mobilní fáze od počátku ke konci kolony v čase t_M , označovaným jako mrtvý čas. Platí

$$t_M = \frac{L}{u} \quad (2)$$

Obdobně čas setrvání analytu v koloně, tj. v mobilní fázi, pohybujícího se průměrnou lineární rychlostí \tilde{u} je určen rovnicí (3) a označuje se jako retenční čas analytu t_R

$$t_R = \frac{L}{\tilde{u}} \quad (3)$$

Vztah mezi průměrnou lineární rychlostí analytu a mobilní fáze je dán rovnicí (4) a odpovídá poměru množství analytu v mobilní fázi (V_M je objem mobilní fáze analytu) vzhledem k jeho celkovému množství v mobilní a stacionární fázi. Platí

$$\tilde{u} = u \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \frac{1}{1 + \frac{c_S V_S}{c_M V_M}} = u \frac{1}{1 + K_D \frac{V_S}{V_M}} = u \frac{1}{1 + k'} \quad (4)$$

kde poměr součinu rozdělovacího koeficientu s objemem solutu ve stacionární fázi k objemu analytu v mobilní fázi se označuje jako kapacitní poměr k' , zatímco poměr objemů mobilní a stacionární fáze se označuje jako fázový poměr β . Platí

$$k' = K_D \frac{V_S}{V_M} = \frac{K_D}{\beta} \quad (5)$$

Dosažením do rovnice (4) za lineární rychlosti z rovnic (2) a (3) získáme rovnici (6) a jejím uspořádáním rovnicí (7)

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} * \frac{1}{1 + k'} \quad (6)$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (7)$$

Rovnice (7) je klíčovou chromatografickou rovnicí popisující vztah mezi rozdělovacím koeficientem (podle rovnice (5)) a měřitelným retenčním chováním analytu a mobilní fáze. Vypočítaná hodnota t_R' se označuje jako čistý retenční čas a vyjadřuje setrvání analytu v separačním systému.

Pohyb analytu v separačním systému je převážně určen migrací vyvolanou mobilní fází, nosným plynem. Vedle migrace se však analyt pohybuje i difuzí a to jak v mobilní, tak i ve stacionární fázi. Zatímco migrační pohyb odpovídá směru tlakového spádu, je difuzní pohyb na tlakovém spádu nezávislý a je ve všech směrech. Tento neorganizovaný pohyb vede k rozšíření zóny analytu v separačním systému a vzrůstá s dobou setrvání analytu v separačním systému. Analyty opouštějící separační systém mají tedy konečnou šířku píků (elučních zón) w , která vzrůstá s retenčním časem.

Jak již bylo uvedeno, dochází během dělení k opakovanému ustavení rovnováhy. Délka separačního systému L je tedy rozdělitelná na větší počet úseků, označovaných jako teoretická patra N , odpovídajících násobnému počtu ustavení rovnováhy, výškovému ekvivalentu teoretického patra H (*HETP*). Výškový ekvivalent teoretického patra je úměrný šířce eluční zóny analytu. Pro počet teoretických pater platí

$$N = \frac{L}{H} \quad (8)$$

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 * \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (9)$$

Rovnice (9) ukazuje, že čím větší je šířka eluční zóny, tím menší je počet teoretických pater, tzn. tím menší je počet opakovaně ustavených rovnováh a tím neúčinnější je separační systém.

2. Základní uspořádání metody

Základní uspořádání analytické měřicí metody plynové chromatografie je znázorněno na následujícím schematu 2 a ukazuje její interdisciplinaritu. Část „mobilní fáze“ a „vzorkování“ převážně vychází z řešení chemického inženýrství. Část „separační systém“ je úzce spjata s obecnou chemií, zvláště pak s oblastí slabých interakcí. Část „měřicí systém“, „zpracování signálu“ a „vyhodnocení“ je vztažena k aplikované fyzice, matematice a elektronice.

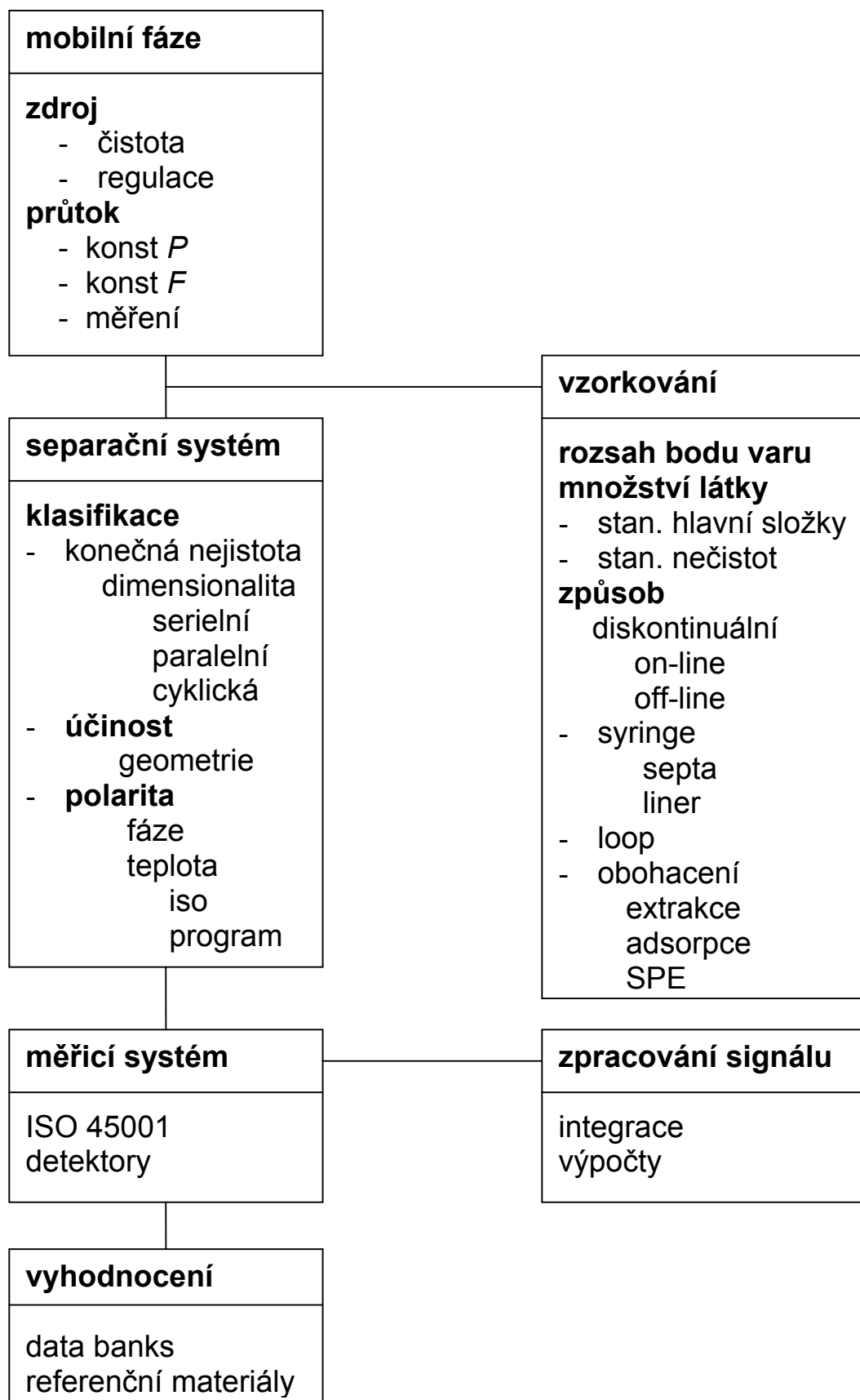


Fig. 2 Základní schema uspořádání metody plynové chromatografie.

Komplexita výše uvedeného uspořádání metody, často přesahující intelektuální možnosti jedince provést její úspěšnou optimalizaci a využít všech jejích možností, je důvodem postupného vývoje plynové chromatografie od universálních řešení přes black-boxes k expertním systémům.

3. Mobilní fáze

V návaznosti na rovnici (9) lze z hlediska průměrné lineární rychlosti posoudit různé procesy v koloně. Ukázalo se, že lineární rychlost významně ovlivňuje účinnost separačního systému a že existuje optimální rychlost vedoucí k vysoké účinnosti a rychlé separaci. Obecným řešením závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H na průměrné lineární rychlosti nosného plynu \bar{u} je tzv. van Deemter(ova) rovnice, mající tvar hyperboly. Platí

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_s \bar{u} + C_M \bar{u} \quad (10)$$

kde A je koeficient Eddy difuze, B je koeficient podélná difuze, C_s je koeficient přenosu hmoty ve a směrem ke stacionární fázi a C_M je koeficient přenosu hmoty ve a směrem k mobilní fázi.

Zvýšení účinnosti a rychlosti separace při optimálním průtoku nosného plynu může dosádnout až faktoru 4krát. Tato skutečnost je důvodem pozornosti věnované regulaci mobilní fáze.

Mobilní fází v plynové chromatografii je inertní plyn, jako jsou helium, argon, dusík, kysličník uhličitý a vodík, obecně označované jako nosný plyn. Na rozdíl od ostatních separačních metod se mobilní fáze, nosný plyn v plynové chromatografii, neúčastní slabých interakcí s analytem.

Hlavním kriteriem **výběru nosného plynu** jsou požadavky měřicího systému. Zatímco optimální výběr nosného plynu z hlediska separačního procesu je určen potlačením difuzních dějů, je kriterium měřicího systému určeno podmínkou nejvyšší citlivosti měření. Ve většině případů tento rozdíl posuzovacích kriterií není ve vzájemném rozporu, s výjimkou použití směsi argon+methan

s detektorem elektronového záchytu (ECD). (Pozn. opravdu je výhodnější použít dusík.)

Hlavním problémem nosných plynů (mobilní fáze) v plynové chromatografii jsou v nosném plynu se nacházející nečistoty interagující s analytem nebo stacionární fází. Z tohoto hlediska jsou kritickými nečistotami vodní pára a kyslík a to jak pro separační systém (chemická změna stacionární fáze, tzv. stárnutí a z něho vyplývající omezená přesnost výsledků pozorování), tak i pro měřicí systém (detekce ECD a MS). Z výše uvedeného plyne kritické posouzení hladiny znečištění vodní parou a kyslíkem a použití vyššího stupně čistoty zásobníků nosných plynů, či v serii zařazených filtrů.

Je však třeba zdůraznit, že nečistoty v nosném plynu nemusí vždy pocházet ze zásobníků (tlakových lahví), ale ve většině případů jsou „home made“ nesprávnou instalací, např. použitím nekovových vedení mezi tlakovou lahví a plynovým chromatografem, použitím konstrukčně a profesionálně chybných spojení a těsnění, použitím vedení s letovanými (včetně stříbrem) spoji, použitím regulátorů s gumovými membránami v prostorech s větším výskytem rozpouštědel jako jsou např. úpravy vzorků, paralelně používané metody TLC, LC a GC, použitím on-off (toggle) ventilů s pruživou a gumovým sedlem, předávkováním vzorkem, použitím saponátových roztoků jako leak detektorů, vniknutím vnější atmosféry do systému při výměně tlakových lahví, apod.

Výše uvedené chyby v instalaci mají postupný a dlouhodobý efekt. Operátor tyto nedostatky identifikuje zpravidla na

- posunu retenčních indexů polárních látek,
- zkracování retenčního času,
- pozvolné změně základní linie detektoru, zpravidla ve formě dlouhodobých vlny tvořících profilů,
- zásadní změnou výsledků analýzy mezi posledním v pátek a prvním v pondělí,
- významnými změnami průběhu analýz v teplotním a isothermálním programu,
- pokračováním trendu i po výměně zásobníků nosných plynů.

Odstranění chyb v instalaci je velmi složité a velmi nákladné, neboť zpravidla vyžaduje výměnu všech komponent. Řadě potíží lze předejít instalací systému nosného plynu podle následujícího schématu.

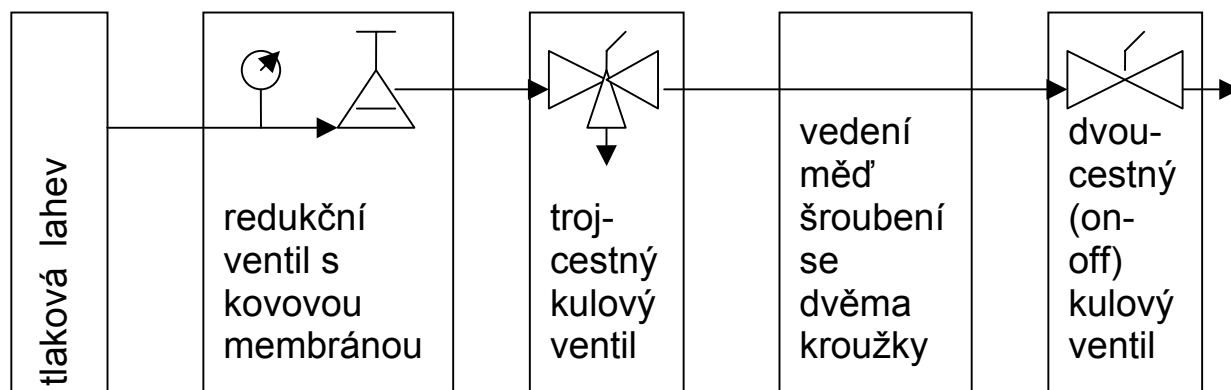


Fig. 3
Základní komponenty vedení nosného plynu

Retenční čas v chromatografickém systému je vedle vedle míry interakčních vztahů analyt-stacionární fáze určen lineární rychlostí mobilní fáze (viz rovnice (4)). V daném experimentálním uspořádání je lineární rychlost úměrná objemové rychlosti nastavitelné **regulátory konstantního průtoku** nosného plynu.

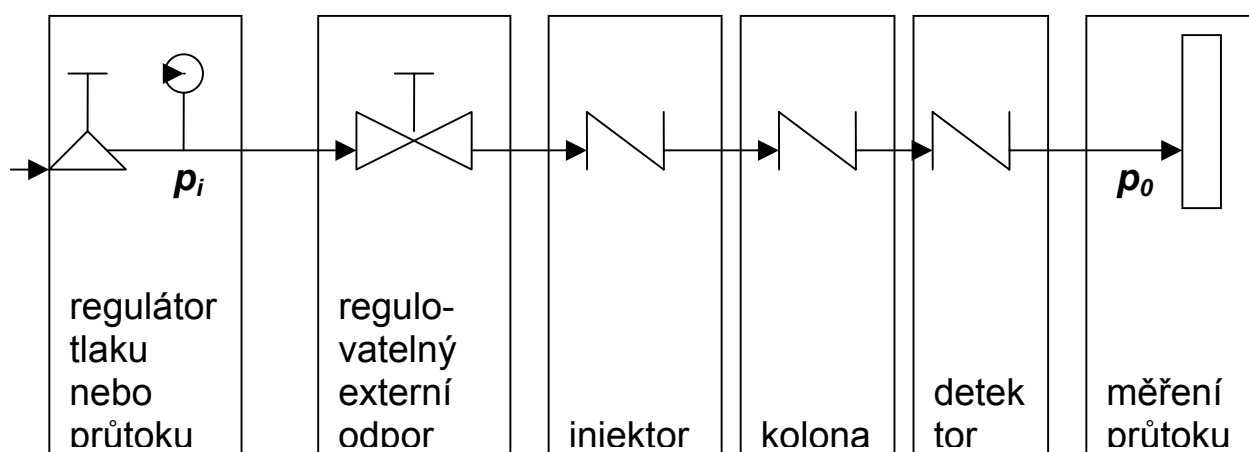


Fig. 4
Pneumatické komponenty separačního systému; vstup do regulátoru tlaku nebo průtoku je brán z výstupu dvojcestného ventilu podle Fig. 3.

Obecně platí, že průtok nosného plynu je funkcí tlakového spádu $\Delta(p_i - p_0)$ mezi tlakem na vstupu p_i a na výstupu p_0 , vizkosity plynu η , která je funkcí teploty a s teplotou vzrůstá, $\eta = f(T^{3/2})$ a pneodynamického odporu separačního systému, převážně určeného konstrukčními parametry injektoru a kolon.

Pro regulaci konstantního průtoku nosného plynu jsou používány regulátory mechanické a elektronické, regulující

- konstantní vstupní tlak (konst. p_i), nebo
- konstantní hmotnostní průtok (konst. F).

Regulovaný konstantní vstupní tlak p_i je zdrojem konstantního průtoku jen při konstantním výstupním tlaku a neměnných pneodynamických podmínkách celého systému podle výše uvedeného schématu. Změna délky kolony, či změna jejího efektivního průměru v důsledku přeorganizování náplně v důsledku stárnutí kolony změní odpor systému a vede ke změně průtoku, přestože nastavená hodnota vstupního tlaku zůstala nezměněná. Podobně za podmínek teplotního programu se průtok nosného plynu změní a to tím více, čím větší je použitý teplotní rozsah a čím větší je tlakový spád (např. více u náplňových než u kapilárních kolon, více s dusíkem než vodíkem jako nosným plynem).

Operátor používající regulaci konstantního vstupního tlaku nemá jinou indikaci o změně průtoku, než prodlužující se retenční čas. Obecně lze říci; není-li přesně znám skutečný tlakový spád (viz kap. 4, Fig. 5, odpor) a není-li udána změřená lineární rychlost nosného plynu, je přesnost měření retenčních časů analytů nedostačující. Tato skutečnost je stejná pro mechanické i elektronicky kontrolované regulátory konstantního vstupního tlaku.

Regulátory konstantního vstupního tlaku jsou finančně nenáročné a v každém případě je doporučeno použít regulátor s kovovou membránou, neboť u regulátoru je jedna strana membrány otevřena proti okolní atmosféře (je nastavován přetlak proti okolí) a nečistoty (včetně vodní páry) v ní přítomné se nemohou dostat do nosného plynu. Levná řešení, používající k regulaci pouze externí regulovatelný odpor, např. jehlový ventil, nejsou vhodná pro rutinní, přesnost vyžadující měření. Tento způsob regulace je rovněž spojen s většími

bezpečnostními riziky, neboť při nekontrolovaném přerušení vedení nosného plynu kdekoli za regulátorem (viz. Fig. 4) dojde k úniku nosného plynu s vysokou průtokovou rychlostí a k vyprázdnění tlakové lahve do atmosféry laboratoře.

Druhým typem regulátorů průtoků v plynové chromatografii jsou tzv. **regulátory konstantního hmotnostního průtoků.**

Mechanické regulátory konstantního hmotnostního průtoků jsou založeny na zpětné vazbě reagující na tlak v děliči průtoků za regulátorem. Vzrůstá-li tlak, např. v důsledku ucpání systému, vzrůstu teploty, apod., působí tato změna na membránu a vede k jejímu většímu otevření a tak zvýšení vstupního tlaku a zachování nastaveného průtoků.

Operátor pracující s tímto typem regulátoru vidí rostoucí hodnotu vstupního tlaku na manometru během teplotního programu, popřípadě pokles hodnoty tlaku k nule při přerušení vedení nosného plynu, např. při proděravění septa.

Mechanické regulátory konstantního hmotnostního průtoků vyžadují na vstupu regulovaný tlak (výstup na dvoucestném ventilu na Fig. 3) zpravidla o 1 bar vyšší, než je výstupní tlak p_i (viz. Fig. 4). Membrány regulátorů jsou zhotovovány jak z plastů, tak z kovu. Jelikož membrána je z obou stran obklopena nosným plynem, může být potenciálním zdrojem znečištění pouze degasing samotného materiálu membrány. Jelikož regulátory pracují s děličem, mají vždy specifikovaný maximální průtok, zpravidla v rozsazích do 1 ml/min, do 10 ml/min, do 100 ml/min a do 1000 ml/min.

Elektronické regulátory konstantního hmotnostního průtoků jsou založeny na proporčním ventilu řízeném měřením tepelné kapacity plynu. Při klesajícím průtoků, např. při teplotním programu, vzniká rozdíl mezi nastavenou a měřenou hodnotou a ten vede k dalšímu otevření ventilu a dosažení požadovaného průtoků.

Elektronické regulátory konstantního hmotnostního průtoku jsou zpravidla celooceľové, podobně jako mechanické jsou se specifikovaným maximálním průtokem, zpravidla do 1 ml/min, do 10 ml/min, do 100 ml/min a do 1000 ml/min. Jelikož se tepelná vodivost mění se složením plynů, jsou regulátory buď kalibrovány pro určitý nosný plyn a nebo dovolují softwarovou úpravu přes interface s počítačem.

Mechanické i elektronické regulátory konstantního hmotnostního průtoku vedou ve srovnání s regulátory konstantního vstupního tlaku k přesnějším výsledkům, zrychlení analýz a větší bezpečnosti práce v laboratoři (i při ulomení kolony, či proděravění septa regulátor neposkytne větší, než nastavený průtok).

Zjištění lineární průtokové rychlosti nosného plynu lze provést výpočtem podle rovnice (2). Toto zjištění není samoučelné, neboť dovoluje rychlou kontrolu experimentálních podmínek. Při lineárních rychlostech 15 až 30 cm/sec by mrtvý čas t_M pro 10 metrů kolony neměl být delší než 1 minuta (nedostatečné dělení a dlouhá doba analýzy) a ne kratší než 30 sekund (nedostatečné, avšak rychlé dělení).

Pro výpočet objemové rychlosti nosného plynu se používá

- měření objemu, např. naplnění objemu byrety ohraničeného mýdlovou bublinou, tzv. bublinkoměr,
- měření vzosu tělíska v závislosti na jeho hmotnosti a vizkozitě plynu, tzv. rotametr,
- měření tepelné vodivosti plynu.

Obecně je měření objemu nejpřesnější, neboť je nezávislé na aktuálním složení (např. nečistoty) nosného plynu, které ovlivňuje jak vizkozitu, tak i tepelnou vodivost. Přestože se měření provádí za laboratorní teploty a tlaku, je možné výsledky přímo použít i bez korekcí na tlak, teplotu a rozpouštění a difuzi v saponátu.

Přepočet na lineární rychlost lze provést z geometrických údajů kolon. U kapilárních kolon přímo, u náplňových kolon započítáním 30% průměru.

4. Vzorkování

V tomto odstavci diskutovaná hesla (viz Fig. 2) jsou z hlediska použitelnosti analytické metody plynové chromatografie základním stupněm při upřesňování zadání.

Metoda plynové chromatografie vyžaduje, aby všechny látky vstupující do dělicího systému byly v plynné fázi. Tento požadavek určuje jak **rozsah** analyzovatelných látek, tak i možnost jejich kvantifikování. Obecně lze v podmínkách plynové chromatografie analyzovat látky do bodu varu $BP \leq 800^\circ\text{C}$, počtu uhlíkových atomů < 100 a relativní molekulové hmotnosti $MW \leq 1600$. Nejčastější aplikační rozsah se však pohybuje ve spodní polovině maximálních rozsahů. Za výše zmíněných podmínek je plynová chromatografie potenciální metodou pro 30000 organických látek. Plynová chromatografie využívá především slabých interakcí analytu se stacionární fází, která obecně vykazuje největší podíl disperzních interakcí, méně polárních/dipolárních a jen výjimečně interakce přenosu náboje (acid/base). Tomuto zastoupení interakčních sil odpovídá i menší vhodnost použití plynové chromatografie pro skupiny organických látek s donor-akceptorovými vazbami. Zvláštní aplikační skupinu tvoří optické isomery z důvodu jejich selektivní biologické aktivity.

Aplikační rozsah plynové chromatografie není určen pouze těkavostí látek, ale také **množstvím látek**, které může být ještě přesně stanoven; $S_a \geq 10 * S_{noise}$. Jelikož celkové množství analytu m_a je rozděleno v časovém intervalu šířky píku w , je měřené množství $m_{a,sensed}$ závislé na experimentálních podmínkách v systému panujících průtocích F a detekovaného objemu V_{sensed} . Platí

$$m_{a,sensed} = \frac{m_a}{(F + F_{make-up})} * V_{sensed} * \frac{1}{w} \quad (11)$$

Pro signál detektoru S_a s citlivostí $(k_a * a_a)$ potom platí

$$10 * S_{noise} \leq S_a = (k_a * a_a) * m_{a,sensed} \quad (12)$$

Rovnice (11) poskytuje zdůvodnění k úvaze o volbě metody s náplňovou nebo kapilární kolonou (první zlomek, použití spliteru) a s krátkou a dlouhou kolonou (druhý zlomek, šířka píku).

Velmi často je plynová chromatografie spojována s představou měření pouze velmi malých množství, obzvláště environmentálních polutantů. Jak ukazuje následující tabulka (1), metoda plynové chromatografie se používá přibližně stejně často pro analýzu stopových množství (méně než 100 ppb) jako pro analýzu hlavních složek (více než 1%).

Tab. 1

Četnost plynově chromatografických aplikací podle koncentračního rozsahu

Koncentrační rozsah [ppm]	Četnost [%]
< 0,001	6,5
0,001 – 0,100	13,7
0,100 – 1,0	10,8
1 - 100	28,1
100 – 10 000	19,4
10 000 <	21,6

Zadání, které určilo koncentrační rozsah a účel analýzy nepřímo určilo i **způsob** vzorkování. Plynově chromatografická analýza mezi dvěma opakovanými měřeními má vždy určitou dobu trvání a není kontinuální. V některých typech aplikací je však četnost opakování za časovou jednotku brána jako výsledek kontinuálních měření, např. analýza zemního plynu je definována ISO(em) 4krát za hodinu, monitoring pracovního prostředí 10krát za hodinu.

S častou frekvencí vzorkování jsou většinou spojeny metody **on-line** vzorkování pomocí dávkovací smyčky. Za těchto podmínek je plynový chromatograf blízko místa měření, dávkovací smyčka je promývána analyzovanou směsí přiváděnou nedlouhým by-passem. Vzorek je bez dalších úprav analyzován ve stejném čase. Tento způsob vzorkování vylučuje hlavní zdroje chyb, kterými jsou úprava

vzorku, kontaminace a lidský faktor včetně přesnosti dávkování. Na druhé straně tento způsob vzorkování dovoluje i optimalizaci nejen postupu vzorkování, ale i samotného separačního procesu, např. délky kolony.

Podstatně častějším způsobem vzorkování je **off-line** metoda, odběr vzorku a jeho následná analýza je provedena na různých místech a v jiném čase. Tento postup je zatížen většími chybami než on-line metoda a to především v důsledku velkého počtu operací před vlastní analýzou. Následující tabulka (2) ukazuje četnost jednotlivých zdrojů chyb.

Tab. 2

Četnost chyb při off-line plynově chromatografické metodě

Zdroj chyby	Četnost [%]
úprava vzorku	36,7
kontaminace	29,8
operátor	17,0
dávkování vzorku	16,5

Zvláštní kapitolu tvoří vzorkovací metody s **obohacovacím stupněm** a to jak pro vzorky z plynné fáze, tak i pro vzorky z kapalné fáze. Používají se metody extrakce, absorpce s následnou extrakcí, adsorpce s následnou extrakcí, či thermodesorpce, extrakce s tuhou fází (SPE) a následnou desorpce. Hlavní problém těchto metod nespočívá v kumulaci chyb podle tabulky (2), ale v nedostatečně definovaných-známých hodnotách rozdělovacích poměrů mezi fázemi (viz rovnice (1)). Odstranění tohoto nedostatku obohacovacích metod je předmětem intenzivního zájmu, obzvláště ve spojení s metodou SPE, pro kterou jsou předpokládány podobné vztahy jako mezi solutem a stacionární fází. Aplikace těchto metod je vázána na přesné dodržení pracovních postupů, neboť změna v matici vzorku zpravidla vede k významné změně výsledků.

Dávkování vzorku do separačního systému je spojeno s několika technickými úskalími, která mají vliv na průběh separace. Mezi hlavní problémy **injektoru**

patří teplota injektoru, teplotní gradient a převod tepla, rovnoměrnost proudění v injektoru a místa s turbulentním prouděním, objem injektoru a expanzní objem, chemická resistance. Tento komplex problémů je aktivně ovlivnitelný operátorem a proto je mu věnována další pozornost.

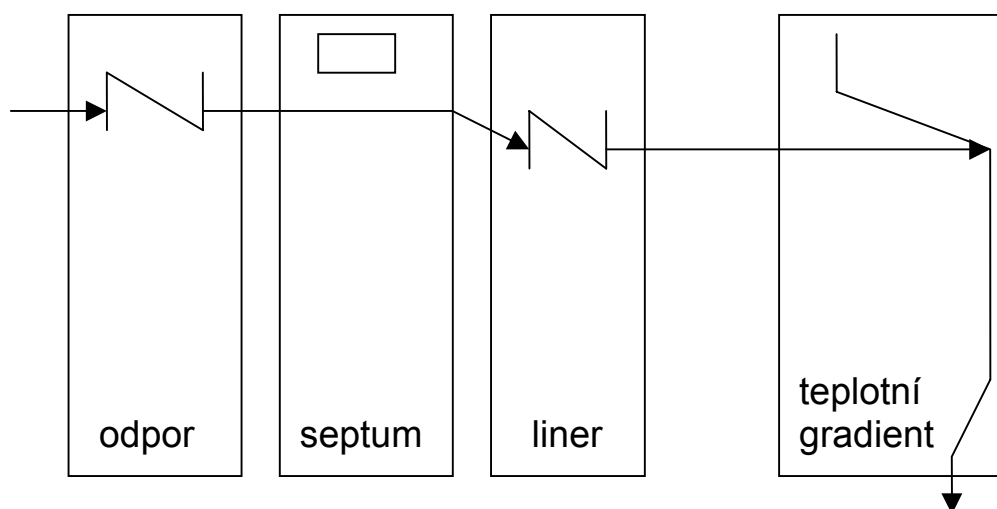


Fig. 5

Funkční komponenty injektoru

Teplota injektoru v klasickém uspořádání je volena tak, aby při dávkování došlo k okamžitému vypaření vzorku a na žádných místech (povrchu septa, povrchu liner a případně jeho náplně, povrchu a upevnění kolony) nedošlo k následné kondenzaci. Volená teplota injektoru odpovídá střední části injektoru, ve které se nachází liner a je zpravidla o 50°C vyšší než teplota kolony. Vyšší teplota injektoru není vhodná, protože prostřednictvím mechanických spojů mezi injektorem a kolonou injektor ovlivňuje teplotu kolony a tak přesnost výsledků. Teplotní gradient je tedy jak směrem ke koloně, tak i směrem k septu, jehož druhá strana je ve styku s okolním prostředím.

Převod tepla mezi vypařovaným vzorkem a injektorem je vždy sáláním. Velká hmotnost injektoru zajišťuje dostatečný zdroj tepla a nevede k poklesu vnitřní teploty liner při vypaření vzorku.

Liner, vyměnitelná, zpravidla křemená vnitřní část injektoru má několik funkcí. V prvním stupni má vytvořit chemicky inaktivní prostředí pro zplyněný vzorek, neboť konstrukční část injektoru je zpravidla z nerez oceli. Druhým úkolem liner je homogenizace vytvořeného plynného vzorku a úprava profilu proudění. Homogenizaci podporují různé tvary labyrintů, či náplně a to jak ve formě předkolon, tak i křemenné vaty. Tyto náplně, obzvláště s thermodegradovanými zbytky septa, či částmi vzorku vykazují velmi často chemickou aktivitu a mohou se projevit buď selektivně, ve vztahu k určitému typu látek ve vzorku (jeho absorpcí, např. postupné zvyšování odezvy analytu s opakovaným měřením) nebo obecně vytvářením chvostujících píků.

Umístění liner v injektoru není náhodné. Při kvalitních konstrukcích je prostor mezi ocelovým tělem injektoru a vnější stěnou liner omýván nosným plynem, který tak zabraňuje vzniku míst s nepohybujícím se vzorkem. Rozměry prostorů injektoru jsou voleny tak, aby proudění odpovídalo laminárnímu proudění.

V závislosti na aplikaci jsou voleny různé vnitřní objemy liner. Obecné úvahy respektují následující pravidla: vzrůst tlaku v injektoru v důsledku vypaření vzorku nesmí překročit 0,2 bar (injektovaný objem 1 μ l kapalného vzorku zaujme při vypaření objem kolem 0,5 ml), rychlost vyprázdnění objemu injektoru by měla být menší než 1 sec. Rychlost vyprázdnění objemu je podmínkou pro potlačení mimokolonových vlivů na účinnost separačního systému (dosažení nízké hodnoty počáteční šířky píku w_0), zatímco nezvýšení tlaku v injektoru o více než 0,2 bar je podmínkou pro udržení čistého, vzorkem nekontaminovaného vedení nosného plynu (viz dále o úloze odporu podle Fig. 5). V této souvislosti je třeba upozornit, že nástřik většího množství čistého rozpouštědla (více než 2 μ l), např. se záměrem „vyčistit“ injekční blok, vede zpravidla k dlouhodobému výraznému znečištění rozvodu nosného plynu.

Přestože úkolem **septa** je pouze utěsnění systému a dostatečná elasticita pro průnik jehly, mohou se septa stát zdrojem jak provozních, tak i základních aplikačních problémů. Plasty používané pro septa mají různou tepelnou odolnost a liší se v chemických a mechanických vlastnostech. Ve většině případů konstrukčních řešení je nosný plyn veden k vnitřnímu povrchu septa, které takto

omývá, současně tak zabraňuje kondenzaci vypařeného vzorku na jeho povrchu a ochlazuje jej. Nedostatečnost ochlazení, či nedostatečná tepelná odolnost septa vede k jeho thermodegradaci, přičemž produkty thermodegradace spojitě znečišťují separační systém a vedou k nepřesným výsledkům.

Schema Fig. 5 uvádí na prvním místě směru toku nosného plynu **odpor**. Ve většině případů si operátor neuvědomuje jeho existenci, přestože v plynové chromatografii je jeho přítomnost bezpodmínečně nutná a má několik důvodů, mezi nimi obzvláště: zabránit vniku expandovaného vzorku do systému vedení nosného plynu, zajistit ohřev nosného plynu před jeho vstupem do injektoru. Diskutovaný odpor, zpravidla ve formě kapiláry navinuté na těle injektoru je dimenzován tak, aby vytvářel tlakový spád 0,2 bar. V důsledku tohoto odporu je skutečný tlakový spád na koloně menší. Za těchto podmínek nedojde ani v případě dávkování objemu 2 μ l kapaliny k takovému nárůstu tlaku, který by vedl k obrácení směru toku nosného plynu a vniku vzorku do chladných částí vedení nosného plynu. Jestliže operátor pozoroval během nástřiku zvýšení tlaku na manometru za regulátorem průtoku nosného plynu (viz Fig. 4, p_i), potom s největší pravděpodobností je odpor nefunkční, nebo injektované množství příliš velké. V obou případech je však vedení kontaminováno vzorkem. Operátor bude pozorovat dlouhodobé změny nulové linie a změnu selektivity dělení.

Dávkování vzorku se provádí zpravidla **injekční stříkačkou**. Konstrukce lze rozdělit do dvou hlavních skupin: první umožňuje nasátí vzorku do odměrného válce, přičem následně může být jehla prázdná, druhá skupina pracuje s naplněnou jehlou. Tyto dva typy skupiny injekčních stříkaček se liší v přesnosti dávkování. Neznámý obsah jehly způsobuje buď zakřivení kalibračních křivek (dávkovaný objem zahrnuje i neznámý objem jehly) a v důsledku nemožnosti kontroly naplnění jehly malou přesnost. Uvedené typy injekčních stříkaček se liší způsobem nástřiku. Je-li dávkování prováděno s naplněnou jehlou, dochází k postupnému odpařování vzorku z jehly při pronikání septem a tak ke snížení účinnosti dělení (velká hodnota w_0). Dávkování s prázdnou jehlou dovoluje přesný odečet nasátého množství vzorku, ohřátí jehly při jejím pronikání septem bez odpařování vzorku, rychlé injektování při odpařování již v jehle a po

zpětném vytažení pístu, ještě před vytažením jehly z injektoru, přesné určení dávkovaného množství.

V plynové chromatografii existuje několik technik vpravení vzorku na kolonu. Vývoj metod má společného jmenovatele, kterým jsou tři základní kritéria: první kritérium bere zřetel na množství analytu vzhledem k množství stacionární fáze nacházející se v teoretickém patru (množství analytu musí být dostatečně malé, aby mohlo dojít k ustavení rovnováhy ve smyslu rovnice (1)), druhé kritérium respektuje optimální průtok kolonou vzhledem k optimálnímu průtoku injektorem (objemová rychlost v injektoru musí být tak velká, aby objem injektoru byl vypláchnut v době kratší než 1 sec), třetí kritérium minimalizuje vliv mimokolonových příspěvků na šířku píku (počáteční šířka píku w_0 by měla být co nejmenší). Různá označení injekčních technik, např. split, solvent flush, falling needle, on-column, vycházejí z optimalizace všech tří výše uvedených kritérií.

5. Separační systém

Vlastní rozdělení vzorku vychází z podmínky, že hodnota rozdělovacího koeficientu analytu 1 a 2 se liší. Pro rozdělení směsi musí pro každou stacionární fázi za konstantní teploty a tlaku platit nerovnost

$$K_{D_1} \neq K_{D_2} \quad (13)$$

Vlastností separačního systému je jeho **účinnost** vyjádřená počtem teoretických pater N podle rovnic (8) a (9). Reálná účinnost systému, tj skutečný počet opakovaných ustavení rozdělovacího koeficientu, je však z důvodu počáteční šířky píku (způsobeného rozšířením zóny při injektování) a konečné doby potřebné pro transport nosného plynu od počátku na konec kolony (mrtvý čas, viz rovnice (2)) nižší než teoretická účinnost. Platí

$$N_{real} = 16 * \left(\frac{t_R - t_M}{\sqrt{(w^2 - w_0^2)}} \right)^2 \quad (14)$$

Hodnota účinnosti však nevyovídá o rozlišení analytů, tj. o schopnosti systému se s vysokou pravděpodobností vyjádřit k přítomnosti analytu. Separační systém lze tedy posoudit na základě počtu úplně rozdělených píků mezi dvěma následnými n-alkány. Toto posuzovací kritérium se označuje jako **separační číslo** 100 a označuje se SN_{100} . Platí

$$SN_{100} = \frac{1}{4} * \frac{A' - 1}{A'} * \sqrt{N_{real}} \quad (15)$$

kde A' je koeficient polaroty stacionární fáze definovaný podle rovnice (16)

$$A' = \frac{t_{R_{n+1}} - t_{r_n}}{t_{R_n} - t_{R_{n-1}}} \quad (16)$$

Výše uvedený vztah podle rovnice (15) vyjadřuje zbytkovou nejistotu separace, neboť hodnota $100/SN_{100}$ odpovídá počtu retenčních indexů, které při náhodném sdružení vytvoří latentní pík. Popis separačního systému pomocí separačního čísla SN_{100} je základním parametrem pro vyjádření nejistoty separační techniky. Rovnice (15) rovněž ukazuje, že výsledek separace není určen pouze účinností systému, ale i jeho polaritou.

Přestože **polarita** separačního systému (stacionární fáze, kolony) bývá vyjadřována jednou hodnotou, je třeba poznamenat, že její definice není jednotná a že polarita není tvořena jedním typem interakce. Výsledná polarita systému je tvořena součtem všech slabých interakcí, kterými jsou disperzní interakce, polarita-dipolarita a interace přenosu náboje. Jelikož všechny typy interakcí jsou fyzikálně chemické povahy, jsou závislé na teplotě. Ve většině případů s rostoucí teplotou klesá podíl disperzních interakcí a polarita separačního systému vzrůstá

(operátor může v případě teplotního programu pozorovat jiný vzor rozdělení směsi, použije-li jinou počáteční teplotu, či jiný teplotní gradient). Numerické vyjádření polaritativity je potom závislé na použitém modelu, zohledňujícím váhy a aditivitu interakcí a musí obsahovat informaci o základním posuzovacím kritériu a o teplotě, pro kterou hodnota polaritativity platí.

Nejstarším a možná dosud nejčastěji používaným systémem vyjádření polaritativity stacionárních fází je systém posunu retenčních indexů vybraných sloučenin (Rohrschneider, McReynolds). Jelikož však vybrané sloučeniny neodpovídají pouze jedné specifikované interakci, je interpretace posunu retenčních indexů nejednoznačná. Proto se současný vývoj posuzování polaritativity stacionárních fází posunul ke kvantifikování solvatace. Ve stavu rozpracování je model z roku 1993, který umožňuje kvantitativně popsat separační děj jako součet všech slabých interakcí solutu a solventu (LSER – linear solvation energy relationship, často označovaný jako Abrahamův model). Výhodou modelu LSER je nezávislá charakterizace analytu a stacionární fáze systémem specifických konstant, které vzájemnou interakcí tvoří výsledek separace. Tento přístup se tak zdá být nadějnou cestou pro optimalizaci analytické metody plynové chromatografie.

Postup pro **rozdělení směsí** organických látek metodou plynové chromatografie má několik, operátorem ovlivnitelných stupňů. Jsou to účinnost kolony a polarita stacionární fáze (viz rovnice (15)). Základní rozhodování operátora je vzhledem k chemické povaze jednotlivých látek směsi (operátor nemůže provést analýzu směsi, o které neví, z jakých látek se skládá). Obecně platí, že pro rozdělení isomerů, které mají podobné vlastnosti je třeba použít vysoké účinnosti kolony N_{real} , zatímco pro rozdělení látek s jinými vlastnostmi je vhodné využít členu polaritativity v rovnici (15), přičemž platí pravidlo podobnosti, např.

pro alifatické uhlovodíky, nevykazující polarizovatelnost, nebo možnost přenosu náboje jsou disperzní interakce využitelným základem pro dělení a stacionární fáze pro dělení bude nepolární,

pro aromatické uhlovodíky vykazující polarizovatelnost bude použita stacionární fáze s polarizovatelnými funkčními skupinami, např. fenylem a fáze použitá pro dělení bude vykazovat středně velkou polaritu,

pro alkoholy a fenoly vykazující acid-base vlastnosti bude použita stacionární fáze s acid-base funkčními skupinami, např. ve formě polyethylenglykolu a fáze použitá pro dělení bude vykazovat velkou polaritu.

V plynové chromatografii je známo a bylo používáno několik set různých **stacionárních fází**. V současné době došlo k omezení výběru a v prodeji (stacionární fáze ani kolony si v současné době nikdo sám nepřipravuje) zůstaly jen fáze, které lze připravit s vysokou reprodukovatelností a které zajišťují vysokou tepelnou a chemickou stabilitu. Dalším důvodem pro omezení počtu stacionárních fází se stala dostupnost knihoven retenčních indexů pro identifikaci látek. Vzhledem k tomu, že počet normovaných typů analýz stále stoupá, je i možnost volby stacionární fáze stále omezenější.

Poté, co bylo rozhodnuto o typu stacionární fáze, je druhým výběrovým kritériem účinnost kolony, která je vyjádřena hodnotou výškového ekvivalentu teoretického patra H podle rovnice (10). Při porovnání různých typů chromatografických kolon lze zjistit, že optimální hodnota H různých uspořádání se liší maximálně faktorem dvakrát. U náplňových kolon je vyšší hodnota H způsobena vyšší hodnotou koeficientu A a C_s , než u kapilárních kolon. Podstatný rozdíl účinnosti náplňových a kapilárních kolon je tedy způsoben dosažitelnou délkou kolony. Jelikož s prodlužující se délkou kolony se prodlužuje i doba analýzy je třeba zvolit kompromis mezi účinností a dobou analýzy (dosažení většího rozlišení než $R \geq 1,5$ nepřispívá k zlepšení výsledku a vede pouze ke zbytečnému nárůstu nákladů analýzy). V plynové chromatografii obecně platí, že analýza by měla být provedena do kapacitního poměru $k' \leq 5$ (viz rovnice 5). Této hodnotě by měly být uzpůsobeny ostatní experimentální parametry, obzvláště pak teplota kolony a způsoby analýzy v různých modech, např. solvent flush, back flush.

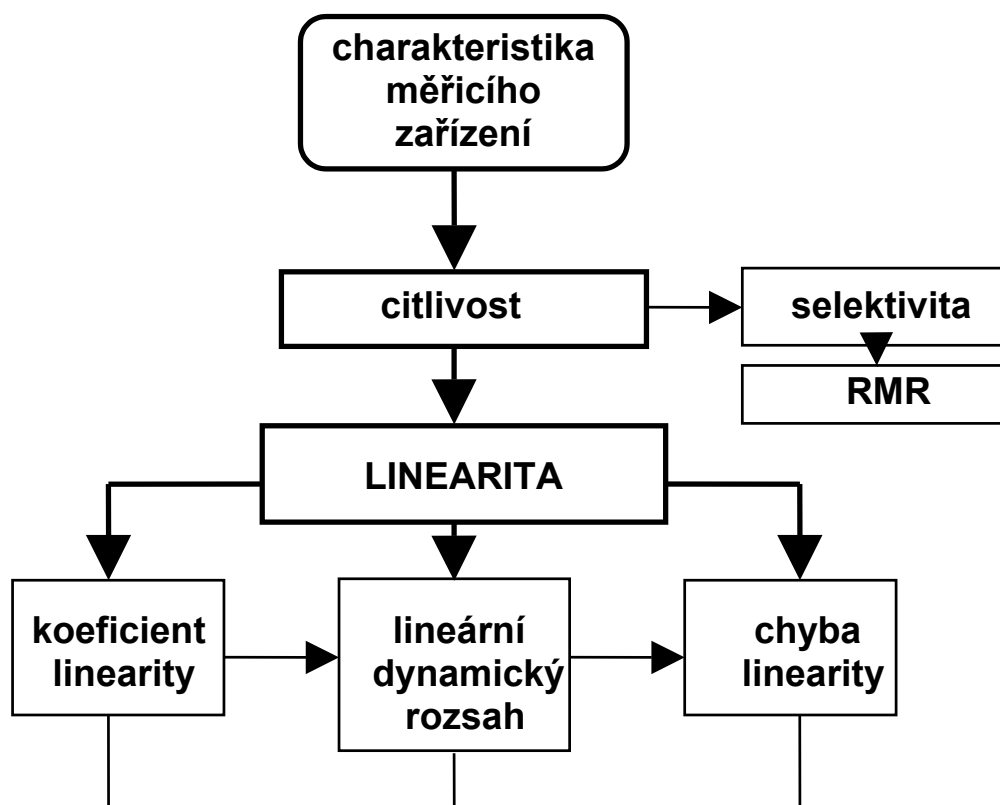
V některých případech je operátor postaven před otázku práce za konstantní teploty kolony, nebo v tak zvaném **teplotním programu**. Obecně platí, že se vzrůstající teplotou klesá podíl disperzních interakcí a vzrůstá podíl polárních interakcí. Proto při dělení isomerů teplotní program nevede ke zlepšení rozlišení, zatímco u polárních látek vede ke zlepšení rozlišení. V obou případech vede

teplotní program ke zkrácení elučních časů, nemusí však vést ke zhrácení doby analýzy, která je čas mezi dvěma opakovanými analýzami (po ukončení teplotního programu je třeba kolonu ochladit a teplotně stabilizovat).

Z výše uvedených odstavců by měl čtenář nabýt dojem, že jakékoli uspořádání nevyhovuje všem možným aplikacím, ale zpravidla jen určité části vzorku. Tuto skutečnost lze slovně popsat tak, že žádný jednodimensionální systém (systém ve kterém se pro sledovaný analyt nezmění kapacitní poměr k' (viz rovnice (7)) nevede k nulové zbytkové nejistotě. Toto poznání se stalo základem vývoje více dimensionálních systémů plynové chromatografie (MDGC).

6. Charakteristika detektoru

Pozornost bude věnována definici a velikosti parametrů charakterizujících detektor a způsobu jejich určení.



Detektory měřicích zařízení lze vyhodnotit a vzájemně srovnat vyčíslením parametrů modelu odezvy měřicího zařízení, zapsané ve tvaru rovnice (12). Vyhodnocení jiných forem zápisu modelu odezvy nedovoluje obecně určit parametry charakterizující měřicí zařízení.

Citlivost měřicího zařízení vyjadřuje transformační funkci výstup/vstup a je součinem konstrukčních (k_a) a pro analyt specifických (a_a) vlastností. Platí

$$k_a * a_a = S_a / m_a' \quad (17)$$

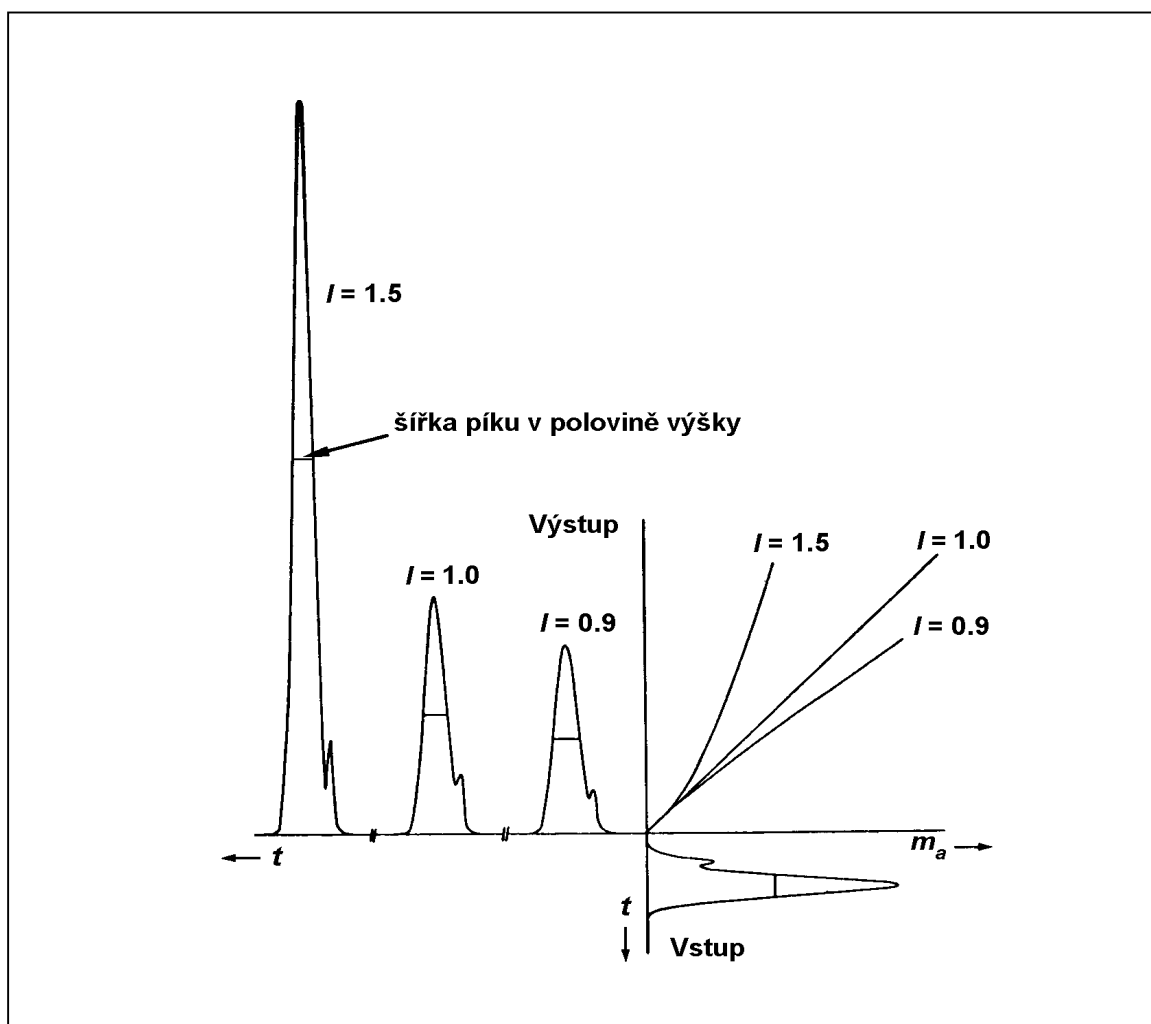


Fig. 6

Zkreslení výstupu detektoru v důsledku proměnlivé citlivosti pro různou hodnotu koeficientu linearitu

Z rovnice (17) vyplývá, že citlivost měřicího zařízení bude konstantní a nezávislá na množství analytu m_a pouze při $l = 1$. Není-li tato podmínka splněna, je měření v širším rozsahu množství analytu chybné, jak je ukázáno na obrázku 6. Podmínkou správného měření je konstantní hodnota citlivosti, vyžadující linearizovanou formu transformační funkce výstup/vstup ve tvaru

$$l\sqrt{k_a * a_a} = l\sqrt{S_a / m_a} \quad (18)$$

Rozměr citlivosti odpovídá výše uvedené definici a závisí na rozměru výstupního signálu (elektrického signálu) a rozměru vstupního signálu (množství analytu), např. $V \cdot g^{-1}$, $A \cdot ppm^{-1}$, $Hz \cdot mol^{-1}$, počet $\cdot g^{-1} \cdot s$ apod. Z rozměru citlivosti vyplývá rozměr množství analytu při jeho analytickém stanovení.

Selektivita Γ_a je vlastnost měřicího zařízení vyjadřující poměr citlivosti dvou analytů v daném měřicím zařízení. Platí

$$\Gamma_a = \frac{k_{st} * a_{st}}{k_a * a_a} \quad (19)$$

Z rovnice (19) vyplývá, že selektivita je vždy relativní a závislá na volbě standardního analytu (st). Poměr velikostí analytických vlastností standardu a analytu (a_{st}/a_a), např. tepelné vodivosti, ionizačního potenciálu apod., se nazývá **relativní molární odezva - RMR_a** a uplatňuje se v normalizaci velikosti odezev na jednotkové látkové množství.

Linearita výstupu odezvy měřicího zařízení je vyjádřena třemi parametry popisujícími konstantní hodnotu exponentu l množství analytu způsobujícího signál S v rozsahu množství analytu $\langle m_{a,min}, m_{a,max} \rangle$ v předem dohodnutém pásmu nepřesnosti (Fig. 7). Tyto parametry se nazývají **koeficient linearity l** , **lineární dynamický rozsah** a **chyba linearity**.

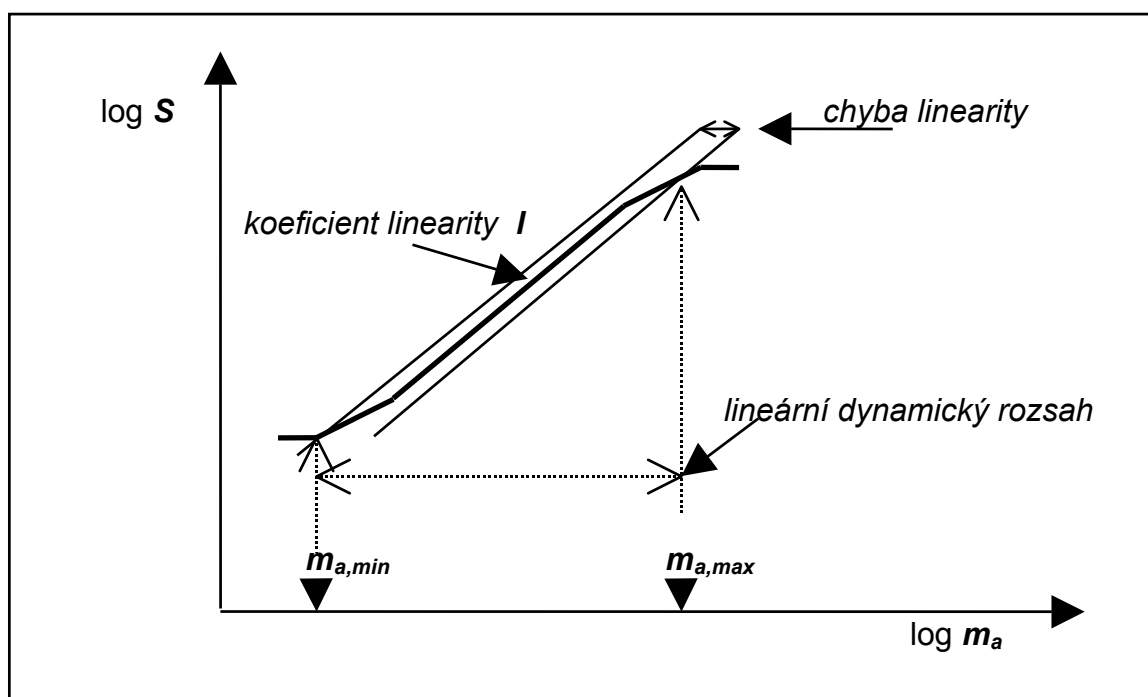


Fig. 7
Základní pojmy linearity měřicího zařízení

Koeficient linearity I je definován jako směrnice funkční závislosti $\log(S) = f[\log(m_a)]$. Platí

$$I = [\log S - \log(k_a * a_a)] / \log m_a \quad (20)$$

Jako lineární je označováno měřicí zařízení, jehož koeficient linearity je roven jedné, $I = 1$. Pouze platí-li tato podmínka, je citlivost konstantní a není funkcí množství analytu. Koeficient linearity nejvýznamněji ovlivňuje signál detektoru a měl by být znám pro použité měřicí zařízení a rozsah množství daného analytu (stanovení koeficientu linearity je uvedeno níže).

Chyba linearity představuje předem dohodou akceptovanou míru odchylek od konstantní hodnoty citlivosti při zachování konstantní hodnoty koeficientu linearity. Chyba linearity je volitelná a je zřejmé, že zvolením větší chyby dochází k rozšíření specifikovaného lineárního dynamického rozsahu, nikoli však

k linearizaci odezvy detektoru. Chyba linearity by neměla být zvolena větší než $\pm 5 \%$ z důvodů správné interpretace měřené odezvy.

Lineární dynamický rozsah je rozsah množství analytu, v němž platí hodnota zjištěného koeficientu linearity v rámci povolené chyby linearity. V lineárním dynamickém rozsahu je citlivost detektoru konstantní. Pro měřicí zařízení tedy může existovat několik lineárních dynamických rozsahů, lišících se koeficientem linearity. Problémem praktických měření je deformovaný tvar křivky odezvy, jak je ukázáno na Fig. 7. V případě dynamických měření, např. elučních profilů, prochází množství analytu několika lineárními dynamickými rozsahy a odezva detektoru je funkcí několika koeficientů linearity. Vyhodnocení okamžité odezvy (signálu) detektoru vede proto ke správnějšímu popsání funkční závislosti $S = \log(m_a)$ než vyhodnocení integrální odezvy detektoru.

Lineární dynamický rozsah měřicího zařízení je vyhodnocován z linearizované formy odezvy detektoru (Fig. 8) a je závislý na zvolené chybě linearity.

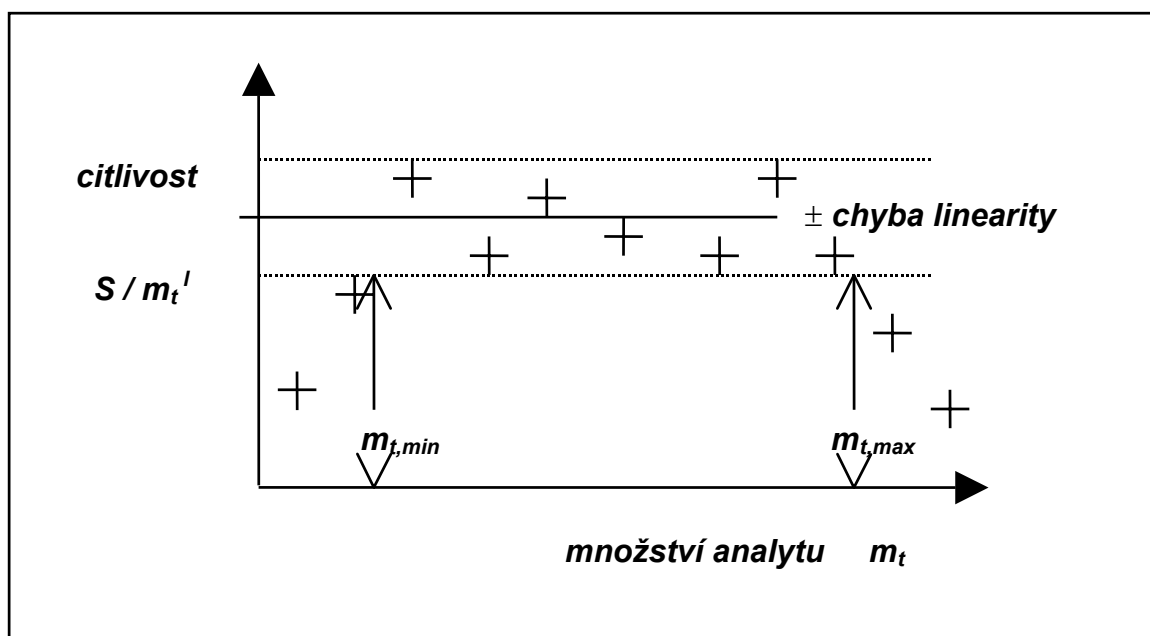


Fig. 8

Příklad vyhodnocení lineárního dynamického rozsahu

Stanovení charakteristik měřicího zařízení vyžaduje měření odezvy detektoru v širokém rozsahu množství analytu. Abychom zkrátili potřebný čas a omezili chyby opakovaného nástřiku analytu, jsou nejvýhodnější metody spojitého přívodu analytu do detektoru v definovaném časovém profilu. Metody opakovaných nástřiků různých množství analytu jsou časově náročné, vyznačují se značným rozptylem a měly by být použity jen v nejkrajnějším případě.

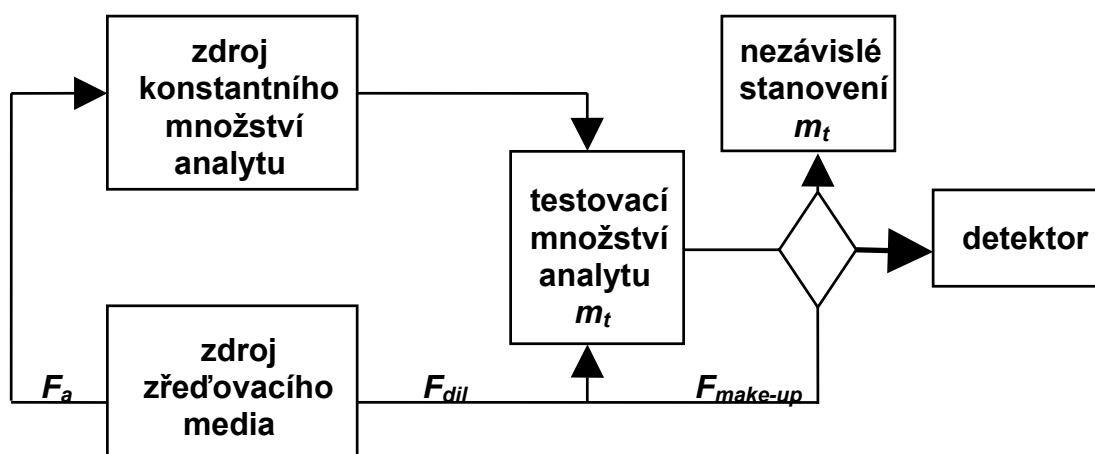


Fig. 9

Schéma zařízení kontinuálního toku testovacího množství analytu pro změnu skokem a logaritmickým zředěním

Kontinuální tok testovacího množství analytu lze získat buď s konstantní, skokově se měnící časovou závislostí, anebo s logaritmicky se měnící hodnotou množství analytu. Pro skokovou změnu testovacího množství m_t platí

$$m_t = m_a * \frac{F_a}{F_a + F_{dil}} \quad (21)$$

kde

F_a je průtok nosného media zdrojem analytu produkujícího množství m_a ,
 F_{dil} je průtok zřed'ovacího media.

Pro testovací množství m_t v případě logaritmického zředění platí

$$m_t = m_a * \exp(-F_a * t_t) \quad (22)$$

kde

t_t je doba průtoku nosného media F_a a m_a je počáteční množství analytu ve zdroji.

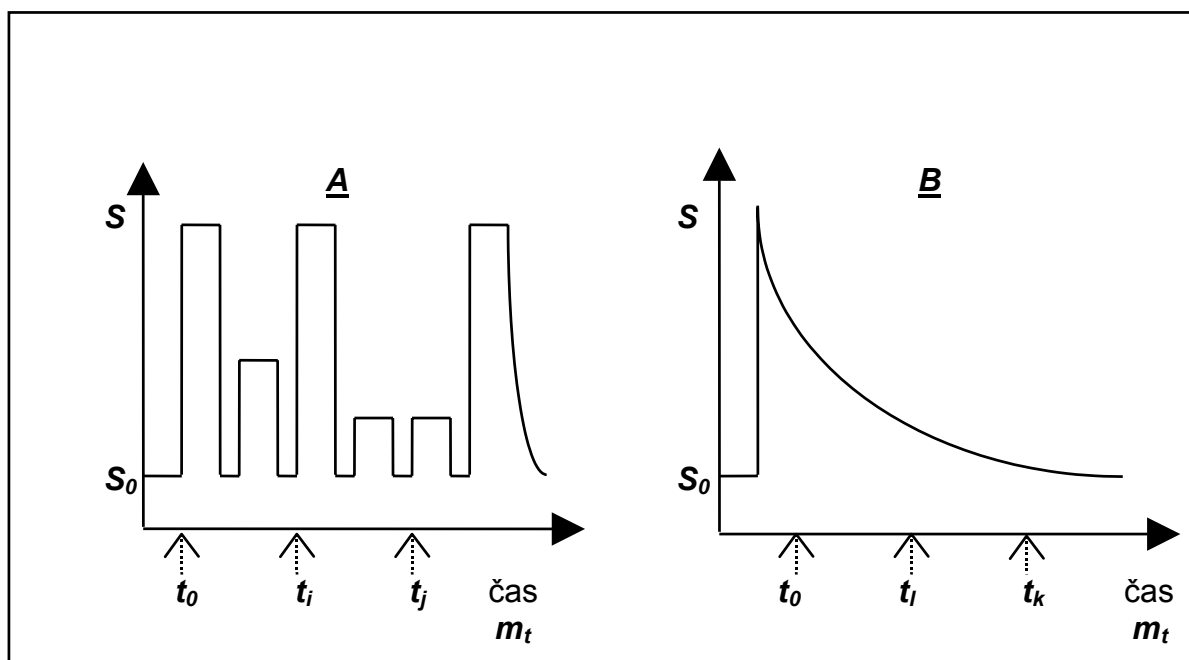


Fig. 10

Ukázka časové změny signálu detektoru testovaného různými množstvími analytu:
A - skoková změna způsobená změnou zředovacího průtoku F_{dil} , rov.(21), základní signál S_0 odpovídá odvedení testovací směsi analytu mimo detektor,
B - logaritmické zředění, rov.(22)

Princip těchto metod je schematicky znázorněn na obrázcích Fig. 9 a 10. Zdroj konstantního množství analytu m_a představuje určité množství analytu v konstantním objemu, které se buď spojitě doplňuje v případě zdroje skokové změny, např. permeační trubice, proud standardní směsi plynů, nasycená pára nad kapalinou apod., nebo se nedoplňuje v případě logaritmického zředování. Zdroj zředovacího media je realizován rychlým a programovatelným

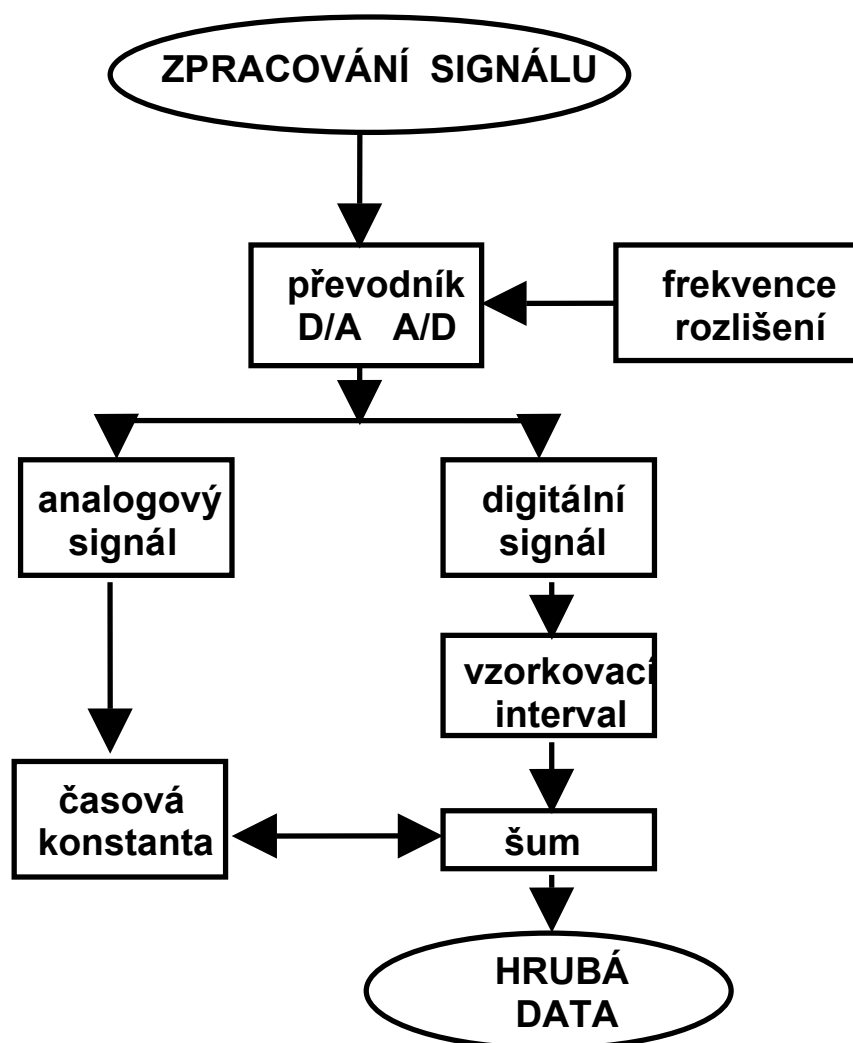
regulátorem průtoku. Přepínací ventil před detektorem dovoluje komplementární stanovení množství analytu v testovací směsi a kontrolu nulového signálu detektoru během jednoho experimentu. Ze znalosti průtoků nosného media v časech t_i , t_j se vypočítá testovací množství analytu $m_{t,i}$, $m_{t,j}$ a časová osa experimentu se zamění za osu množství.

Charakteristiky detektoru se určí podle následujícího schématu:

- 1) Signál detektoru a množství analytu se převedou na logaritmus a provede se lineární regresní analýza, $\log S = f(\log m_t)$, např. obrázek Fig. 7.
- 2) Směrnice přímky regresní analýzy určí **koeficient linearity** l , viz rov. (20).
- 3) Koeficientem linearity l se umocní testovací množství analytu m_t^l .
V případě, že $l < 0,95 ; 1,05 >$, je možné použít $l = 1$, což však vede ke zkrácení lineárního dynamického rozsahu.
- 4) Vypočítá se citlivost měřicího zařízení, $(k_a * a_a) = S / m_t^l$, která bude konstantní pro určitý rozsah množství analytu, $(k_a * a_a) = f(m_t^l)$, např. obr. 8,
- 5) Zvolí se maximálně přijatelná odchylka od konstantní hodnoty citlivosti, např. $\pm 3\%$ a vytvoří se pás kolem vypočítané střední hodnoty, např. obr. 8,
- 6) Hodnotami vymezujícími tento pás se určí *lineární dynamický rozsah* $\langle m_{t,min}; m_{t,max} \rangle$, např. obr. 8.

7. Zpracování signálu

Měřený signál detektoru je spojitě zpracováván a v současné době převážně ukládán v paměti měřicího zařízení jako soubor hrubých dat. Tato hrubá data obsahují vedle signálu i šum, stejně jako údaje o nulové linii (signál bez přítomnosti analytu) a jsou následně zpracovávána.



Signál je okamžitý výstup, zpravidla ve formě elektrické veličiny detektoru, jehož model byl již popsán. Z modelu vyplývá, že měřený signál není pouze funkcí množství analytu. Příspěvek samotného měřicího zařízení S_i je způsoben konstrukčními vlastnostmi přístroje a je označován jako základní, nulová linie měřicího zařízení. V důsledku statistických fluktuací mechanismu detekce, parametrů okolí a konstrukčních materiálů je měřený signál zatížen šumem, což se projevuje náhodným zvýšením nebo snížením měřeného signálu. Signály lze posuzovat z hlediska jejich spojitosti v čase a spojitosti amplitudy. Na základě tohoto rozdělení vznikají různé typy signálů (Fig. 11), z nichž se analogové a číslicově zpracovávané signály nejčastěji uplatňují v měření.





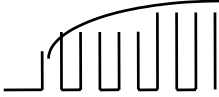
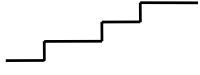
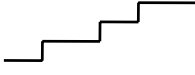
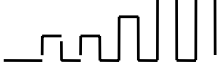
	spojitý čas 	diskrétní čas 
spojitá amplituda 	analogový signál 	číslicový signál 
diskrétní amplituda 	impulsní signál 	digitální signál 

Fig. 11

Rozdělení signálů podle spojitosti v čase a v amplitudě

Bezprostřední signál senzoru je až na výjimky analogový. Jeho úpravou v detektoru vzniká a je dále zpracováván buď analogový, nebo digitální signál. Signály s diskretním časem (číslicové a digitální signály) nejsou spojitou funkcí a označují se jako posloupnosti, časové řady. Signály detektorů jsou zpracovávány za účelem zjištění jejich střední hodnoty, součtu či násobení a redukce šumu.

Šum oscilující kolem základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou a jak vyplývá ze statistického pojetí, je součet pozitivních a negativních výchylek šumu v dostatečně dlouhém časovém intervalu roven nule. Šum, jehož suma je nulová v časovém intervalu našeho pozorování se označuje jako tzv. *bílý šum* (white noise). Šum, jehož suma je nenulová, je tzv. *náhodný šum* měření a šum, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování se označuje jako *drift* (Fig. 12). Šum je významný jen z hlediska

intervalu pozorování, např. šířky elučního píku, a je tedy zřejmé, že se změnou intervalu pozorování se posune význam jednotlivých druhů šumu.

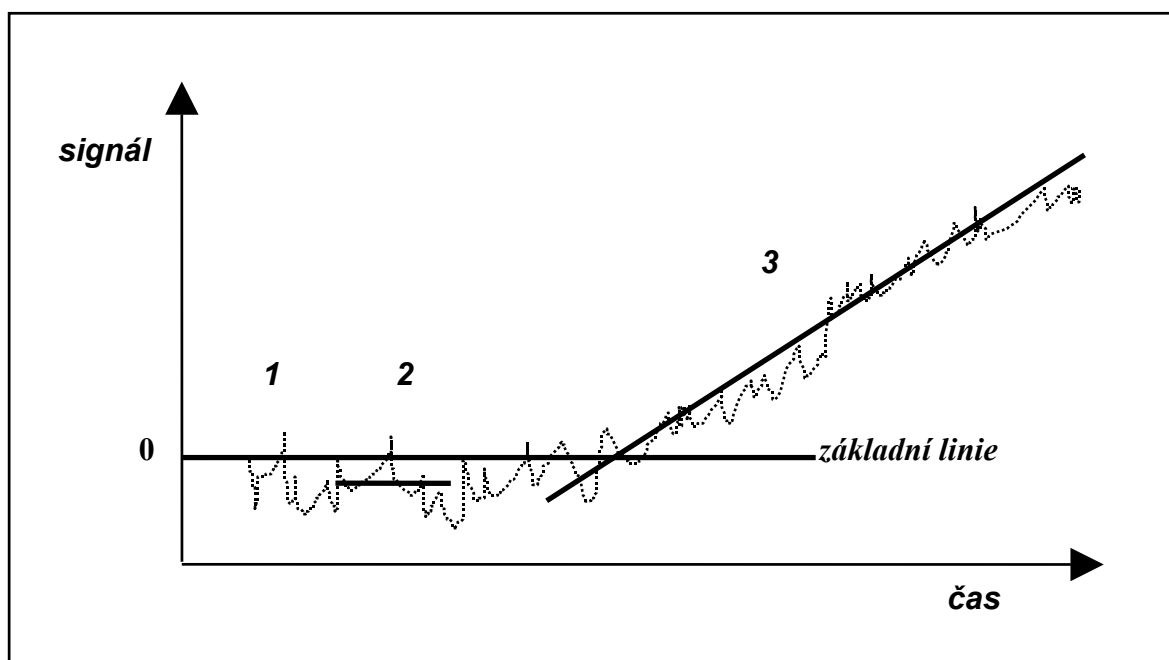


Fig. 12

Znázornění typů šumu ve vztahu k intervalu pozorování; **1** - bílý šum, **2** - náhodný šum, **3** - drift.

Různé formy signálu detektoru jsou navzájem převoditelné elektronickými komponentami nazývanými **převodník A/D** nebo **D/A** charakterizovanými rychlostí převodu a formátem rozlišení (udávaným v počtu bitů).

Analogový signál je zkreslen řadou časových konstant τ , počínaje objemem detektoru a konče způsobem elektronického zpracování signálu. Zkreslení signálu narůstá s rostoucí časovou konstantou a pro rychlé děje může vést k významnému potlačení okamžitého signálu a následné chybné interpretaci. Na druhé straně je analogový výstupní signál málokdy předmětem bílého šumu a rovněž náhodný šum je podstatně potlačen. Vizualizovaným příkladem analogového signálu je záznam zapisovače. Má jen zřídka $\tau < 0,3s$ a z toho důvodu jsou zapisovače nevhodné pro pozorování dějů kratší než 1 s.

V souvislosti s rychlostí odezvy měřicích zařízení je definován **čas odezvy**, který odpovídá času dosažení 90% konečné hodnoty signálu jednotkové změny a je složen z časového úseku **zpoždění** (dosažení 10% konečné hodnoty signálu) a časových **intervalů vzrůstu** či **poklesu** (dynamické chování mezi 10 a 90 % konečného signálu). Je třeba zdůraznit, že odezva nefyzikálního detektoru (tzv. chemických a biochemických detektorů) je zpravidla nesymetrická a je významným nedostatkem těchto měřicích zařízení (Fig. 13).

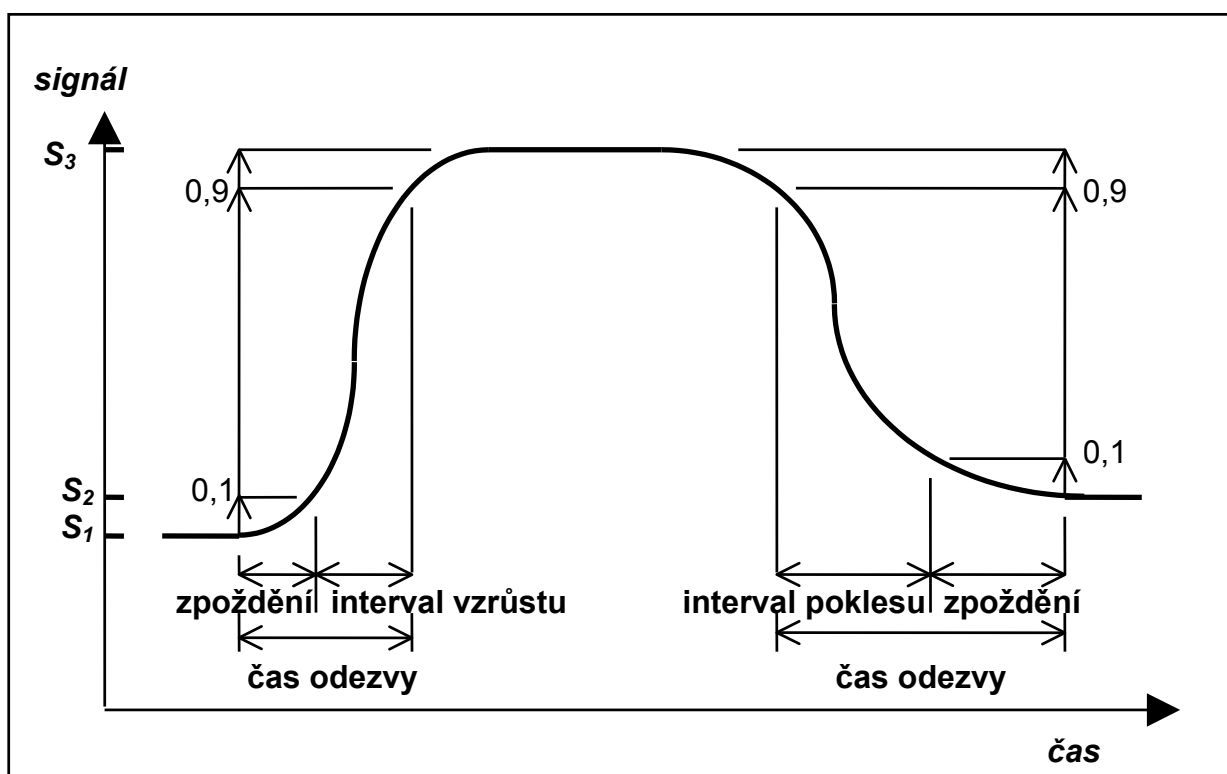


Fig.13

Čas odezvy měřicího zařízení podle ISO 9169.

Číslicově zpracovávaný signál vzniká vzorkováním analogového signálu. Vzorkování je opakovaným načítáním (se vzorkovací frekvencí f) vstupu po určitý časový úsek (w), který je charakterizován průměrnou hodnotou signálu (Fig. 14). Vznik číslicového signálu není zatížen časovou konstantou a v důsledku vysokých frekvencí vzorkování ($f > 25 \text{ kHz}$) je vhodný i pro pozorování velmi rychlých dějů. Interval vytváření průměrné hodnoty signálu je však velmi úzký, zpravidla kolem $4 \mu\text{s}$, a proto vznikající číslicový signál významně "kopíruje" šum analogového signálu.

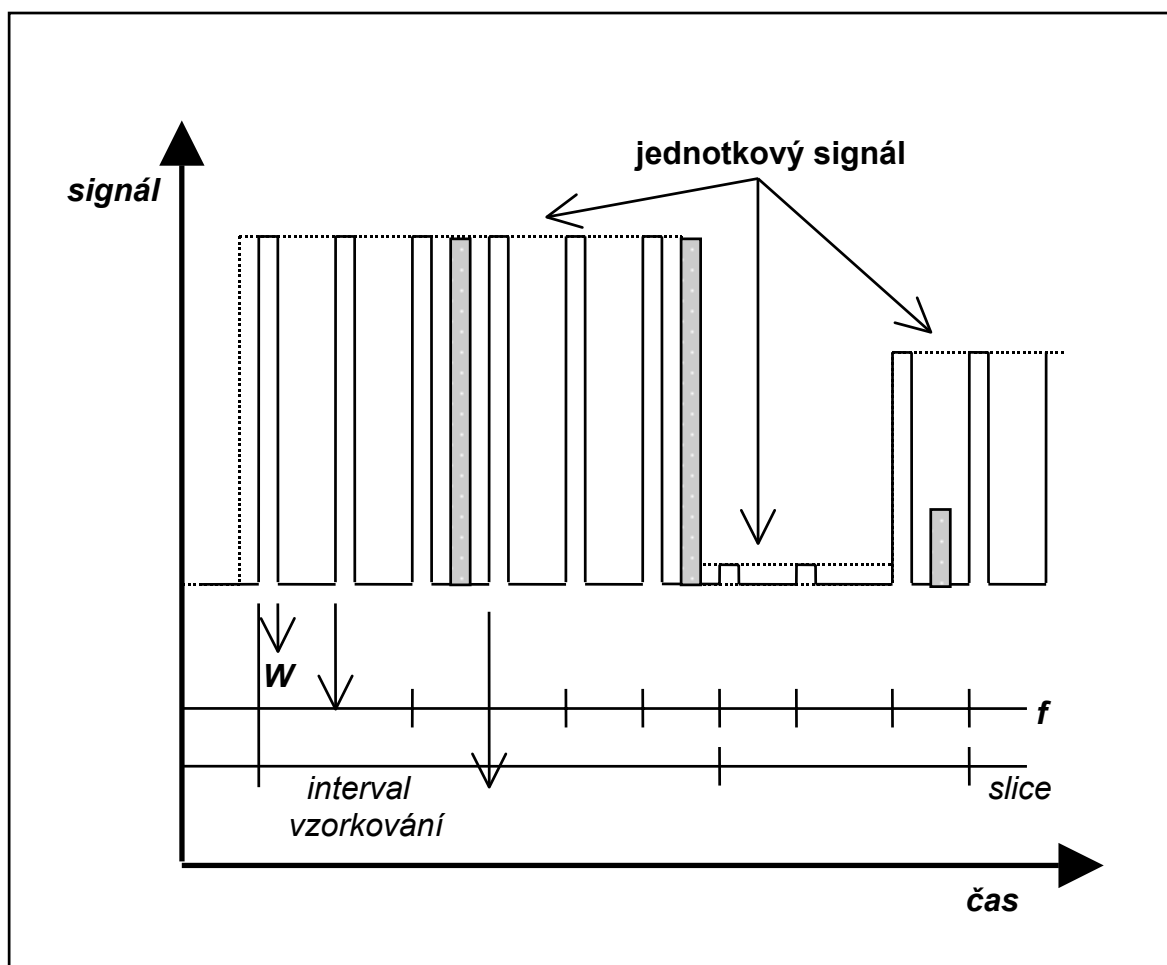


Fig. 14

Jednotkový signál (tečkovaná linie) znázorněný jako digitální signál s vzorkovací frekvencí f a délce vytváření průměrné hodnoty w a jeho zpracování na průměrnou hodnotu časového intervalu vzorkování (vyšrafováno).

Velké množství okamžitých snímaných signálů (např. v případě 25 kHz převodníku získáme 25 000 údajů za vteřinu) není přímo použitelné, jak z hlediska jejich množství, tak i jejich zatížení šumem. Proto je určitá časová sekvence následných okamžitých signálů zpracovávána s cílem vytvoření průměrné hodnoty pro delší časový úsek a potlačení bílého šumu. Takto vzniklá nová hodnota signálu je charakterizována průměrnou hodnotou signálu reprezentujícího konstantní, na konstrukci přístroje a algoritmu zpracování signálů závislý časový úsek, který je označován jako "slice". Tyto hodnoty jsou ukládány do paměti přístroje.

Na základě popsaného zpracování signálu jsou vytvořena hrubá (angl. raw) data, představující záznam pozorovaného děje. Z vytvořených hrubých dat není možné dekonvoluovat ("získat zpět rozkladem") skladbu původních signálů. Takto vytvořená hrubá data představují pouze nepatrnou změnu časové distribuce proti původnímu signálu, která neovlivňuje výsledek měření. Podstatnou výhodou zpracování signálu je redukce šumu a vytvoření opakovatelně vyhodnotitelného souboru dat.

Algoritmy pro výše uvedené zpracování signálu tvoří charakteristiku použitého měřicího zařízení. Operátor objednáním přístroje zvolil parametry vzorkování signálu a převodníku A/D, které dále nemůže měnit. Pouze v některých případech je možno zvolit rozdílnou frekvenci f_{slice} pro pomalé (nízká frekvence, delší trvání t_{slice}) a rychlé děje.

Vytvořením souboru hrubých dat je ukončena "pasivní role operátora" na měření (nemůže ovlivnit parametry elektronického vzorkování, převodníku A/D, časovou konstantu měřicího zařízení, integrační interval *slice*, parametry a způsob zápisu hrubých dat do paměti). Znalost jejich geneze je však nutná pro zhodnocení analytického procesu.

Zpracováním neměnných souborů hrubých dat vznikají nové, účelové soubory dat s redukováným šumem a určenou nulovou linií signálu. Hrubá data s rozměrem signálu (často označovaná jako *slice*) představují hustou síť bodů průběžného pozorování děje a jsou stále ještě zatížena šumem. Ve fázi zpracování dat jsou na základě zjištěné nebo zadané délky intervalu pozorování (např. šířky elučního píku) hrubá data podrobena analýze s cílem vytvořit nový, účelový soubor relevantních dat s redukováným šumem a určenou nulovou linií. Na rozdíl od souboru hrubých dat udávajících velikost celkového signálu představují tato nově vytvořená data signály nad určenou nulovou linií.

Výše uvedené zpracování probíhá na základě vhodného algoritmu vycházejícího ze zjištění, že časový úsek odpovídající změně pozorovaného děje lze popsat omezeným počtem ekvidistantních časových úseků či bodů, reprezentativních

pro pozorovaný děj. Šířka časového úseku (*bunch*) je podmíněna pozorovaným dějem a použitou metodou měření a je předmětem optimalizace, neboť při zvolení velké šířky intervalu budou potlačeny náhlé změny pozorovaného děje, zatímco v případě malé šířky budou data zatížena šumem.

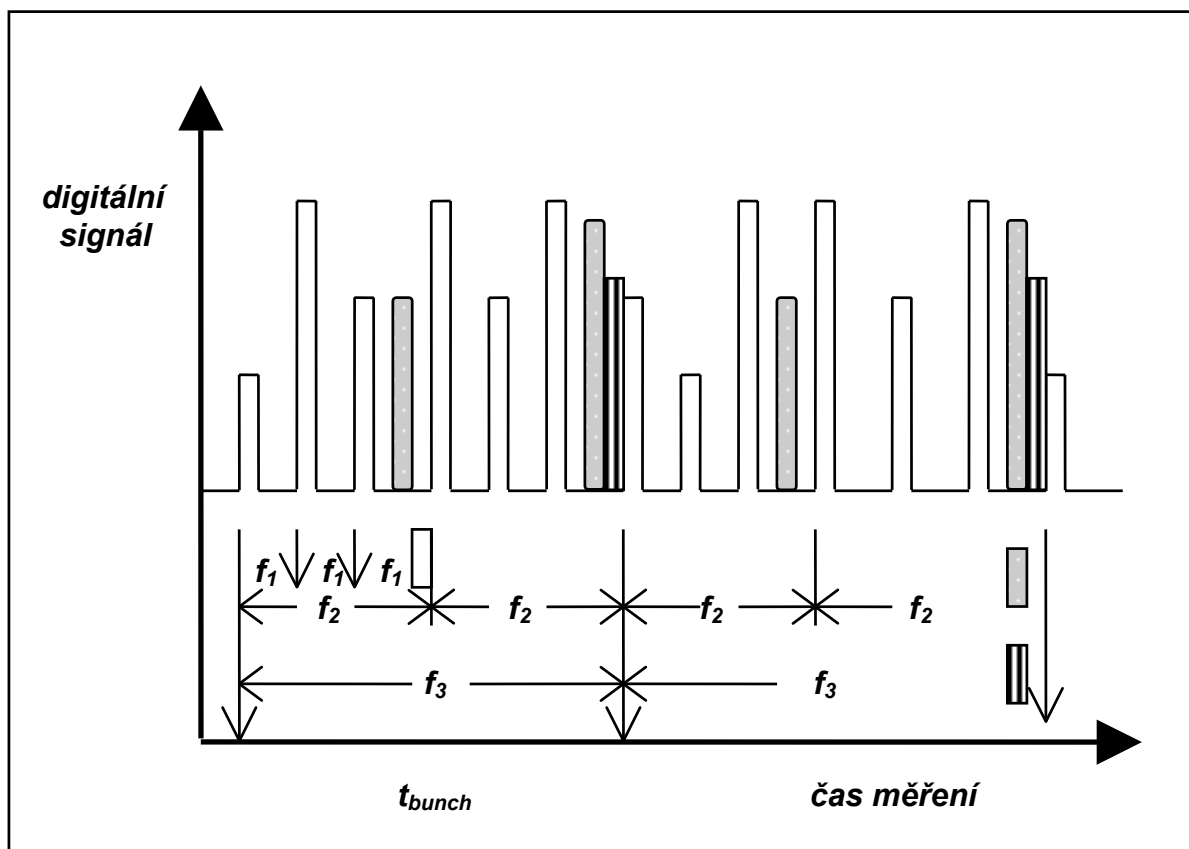


Fig. 15

Zpracování hrubých, měřicím zařízením podmíněných dat (*slice*) o frekvenci f_1 volbou intervalu - frekvence bunch f_2 , f_3

Počet *bunch* popisujících časový úsek po dosažení poloviční změny pozorovaného děje je např. v separačních metodách volen kolem 7 až 9. Jestliže se při měření doba trvání pozorovaného děje mění (např. píky v chromatogramu), je nutné, aby pro vytvoření srovnatelných podmínek měření pro časné a pozdější pozorování (dříve a později eluované píky) zůstal počet bodů - časových úseků *bunch*, popisujících změnu pozorování stále stejný. Při splnění této podmínky roste počet hrubých dat (*slice*) sdružených do nového

bodů (*bunch*) s postupujícím časem pozorování, avšak podmínky pozorování, např. relativní změna intenzity mezi *bunch*, podíl šumu na signálu atd., jsou nezávislé na době pozorování.

Na základě tohoto algoritmu jsou pak sdružena ta hrubá data (*slice*), která se nacházejí v nově definovaném časovém úseku (Fig. 15). Data odpovídající nově vzniklému bodu (*bunch*) jsou charakterizována střední hodnotou signálu vypočítanou z hrubých dat (*slice*) nacházejících se v časovém intervalu *bunch*; platí

$$\mathbf{S}_{bunch} = \sum_n \mathbf{S} / n \quad (23)$$

a pro délku časového intervalu *bunch* platí

$$t_{bunch} = n * t_{slice} \quad (24)$$

kde n je počet intervalů hrubých dat.

Touto úpravou hrubých dat byl dále potlačen náhodný šum a vytvořen předpoklad pro určení nulové linie signálu a pokračující potlačení šumu.

Délka volby intervalu *bunch* je aktivním prvkem vytváření dat vyžadujícím souhlas operátora. Praktický význam volby jednotlivých parametrů se projeví při pozdějších, tzv. post-run výpočtech.

Princip určení **nulového signálu** vychází z výše uvedeného postupu sdružení dat do stejného počtu časových intervalů *bunch* pro sledovaný děj a jejich následné derivační analýzy. Předpokládáme, že změna signálu způsobená analytem je větší než možná náhodná změna nulové linie. Z derivační analýzy nově vzniklých dat tedy vyplývá, že v průběhu pozorování odpovídá nulová linie časovým okamžikům, v nichž je velikost 1. derivace pod určitou zvolenou hodnotou (tzv. *threshold*).

Na obrázku Fig. 16 (představujícím derivaci dat z Fig. 15) je ukázán význam intervalu t_{bunch} na tvar nulové linie signálu. Zatímco pro vysokou frekvenci f_1 je nulová linie "nekonstantní" v důsledku častého překročení zvolené hodnoty derivace (*threshold*), je při dostatečně dlouhém intervalu dat *bunch*, např. f_3 , nulová linie konstantní, a to i při nižší hodnotě zvolené změny derivace.

Zvolená hodnota časového intervalu t_{bunch} určuje tvar nulové linie signálu. V případě příliš krátké hodnoty t_{bunch} nebo velmi malé hodnoty změn derivace (v některých programech zpracování dat označované jako citlivost) je nulová linie příliš ovlivněna šumem a určení analytu v důsledku možné záměny s náhodným šumem je ztíženo. Na druhé straně může příliš velký interval t_{bunch} nebo velká hodnota změn derivace (nízká citlivost) potlačit malé změny způsobené analytem a zahrnout je do nulového signálu.

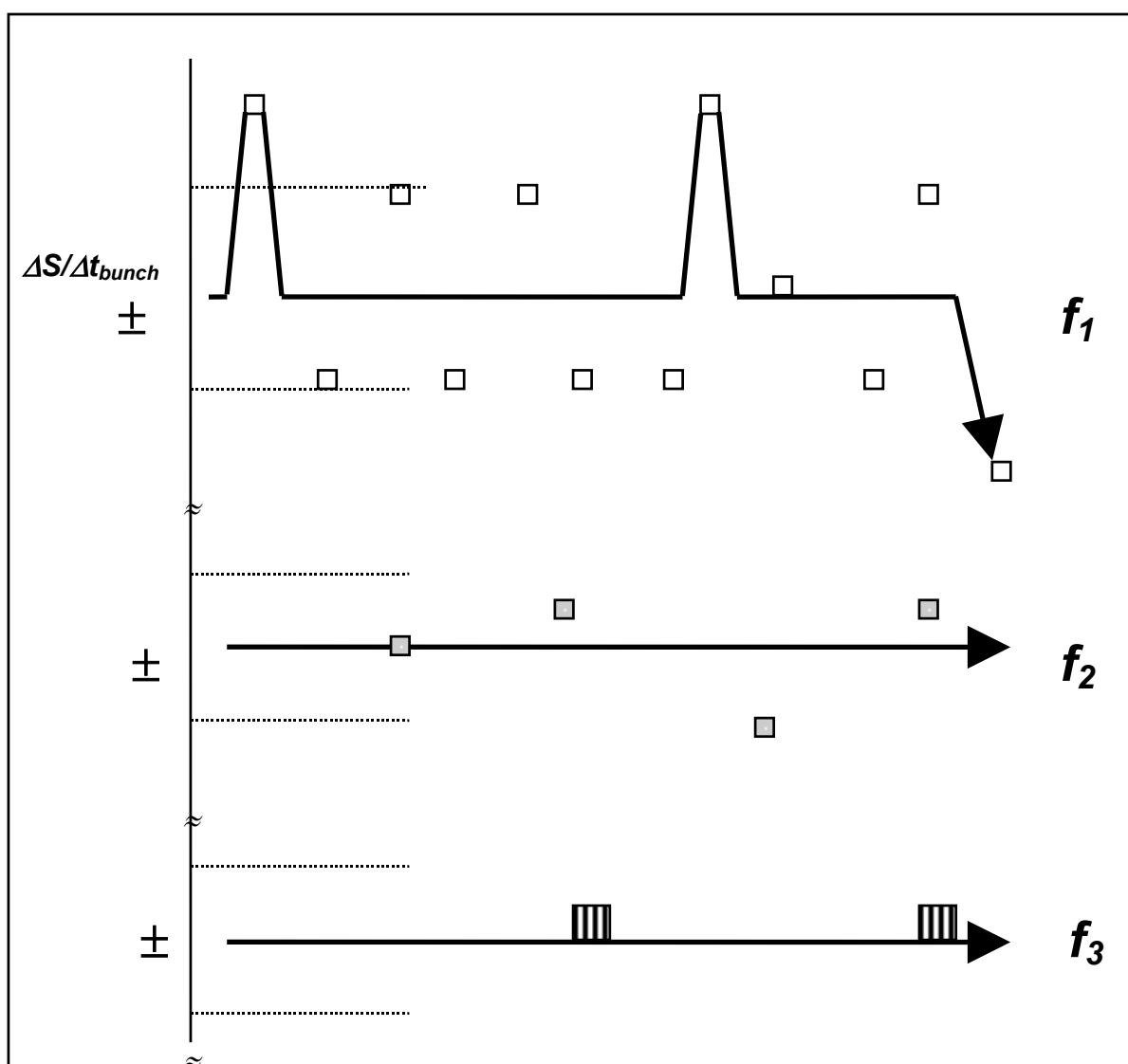


Fig. 16 Význam intervalu - frekvence zpracování dat na určení nulové linie signálu

Druhým paralelním stupněm zpracování dat je **snížení šumu**. Existuje řada metod, mezi něž v pořadí rostoucí náročnosti patří metody:

- zařazení časové konstanty (τ),
- wavelety čili digitální frekvenčně selektivní filtr pásmové propusti,
- Fourierova transformační analýza (FTA),
- adaptivní digitální filtrování (ADF).

Pro všechny metody snížení šumu je dostupné programové vybavení a volba metody je podmíněna cílem analýzy.

Časová konstanta (např. prodloužení časového intervalu t_{bunch}) odstraňuje všechny typy šumu, metoda "waveletů" umožňuje odstranění šumu v určitém frekvenčním rozsahu (tzv. digitální frekvenčně selektivní filtr pásmové propusti <low-pass; high-pass >), FTA provádí frekvenční analýzy v širokém rozsahu frekvencí a ADF je učící se systém schopný aplikovat získané zkušenosti na nový soubor dat.

Mezi rušícími vlivy měření se vyskytují i náhlé a intenzivní změny měřeného signálu, tzv. spikes, jejichž příčinou jsou poruchy správné funkce měřicího zařízení. Tyto změny nejsou šumem, neboť nemají frekvenční složení a jsou odstranitelné až při následném zpracování dat (následných, angl. post-run výpočtech). Vyskytují-li se častěji, proveďte kontrolu hardwaru.

Nové soubory dat vzniklé uvedeným postupem jsou podstatně menší než výchozí soubory hrubých dat a jsou zobrazením pozorovaného děje, např. chromatogramu, záznamu spektra apod.

Rozhodnutí, zda uchovat původní soubory hrubých dat, nebo až jejich zpracované formy, závisí na tom, zda v budoucnu chceme nově zpracovávat data z jiného zorného úhlu, s jiným nastavením posuzovacích kritérií, nebo pouze dokumentovat provedené měření. Poskytuje-li dokumentovaný záznam veškeré

informace potřebné k jeho okamžité i pozdější interpretaci, je vhodné tento záznam uložit jako nový soubor dat a zrušit soubor hrubých dat. V ostatních případech je vhodné ponechat soubor hrubých dat a neukládat okamžité zpracování, které může být kdykoli identicky opakováno.

Nahrazení souboru hrubých dat souborem zpracovaných dat je možno provést pouze se souhlasem operátora.

8. Vyhodnocení

Vyhodnocení plynově chromatografické analýzy může probíhat buď z hlediska identifikace eluentů, nebo identifikace a stanovení eluentů.

Pro **identifikaci eluentů** jsou vždy použity porovnávací metody a to ať již vypočítaných retenčních hodnot na libovolné referenční bázi, např. n-alkánů, esterů, relativní retence, atd. Operátorem je volena ta metoda, pro kterou je k dispozici největší knihovna dat a to ať již vlastních, nebo jinak dostupných. V této souvislosti je třeba upozornit na porovnání experimentálních podmínek referenčních a vlastních dat. Např. známá Sadtlerova knihovna retenčních indexů je např. změřena pro tloušťku vrstvy filmu stacionární fáze 0,2 a uváděné hodnoty mohou být zatíženy absorpcí na povrchu kapiláry. Dále je třeba upozornit na specifikaci separačního čísla SN_{100} , které vyjadřuje zbytkovou nejistotu provedeného měření.

Pro **stanovení množství** analytu se používají všechny kalibrační metody (metoda standardního přídávku, metoda vnitřního standardu a metoda vnějšího standardu). Velmi často se v plynové chromatografii používá zjednodušená metoda vnitřního standardu označovaná jako metoda 100%. Variabilita výsledků je způsobena především rozdíly v RMR mezi jednotlivými analyty, rozdíly v citlivosti měřicích zařízení, časovým posunem (často v hodinových intervalech) mezi opakovanými analýzami a nestandardním postupem při zpracování signálu a následných post-run výpočtech.