

2 D analitičke metode

2D tečna hromatografija

Vremenski okviri

- Kasne sedamdesete i rane osamdesete Postavljaju se principi metode i konceptulani i teorijski modeli. Pokazuje se da je moguće dobiti analitičku metodu sa neuporedivo boljim razlaganjem od klasične tečne hromatografije.
- Početak devedesetih – Metoda ima velike mogućnosti ali je spora (više sati ili čak i dana) – ograničena upotreba
- Poslednjih deset godina – 2D-tečna hromatografija visoke rezolucije završava se za manje od sat vremena i dalje se razvija

Tehnički razvoj

- U početku su se 2D tečni hromatografi sastavljali od pojedinačnih komponenti 1D tečnih hromatografa (pumpe, detektori i drugi delovi uzimani su iz modularnih kompleta 1D hromatografa) – nije praktično postojao 2D hromatograf istih karakteristika – svi su bili pomalo različiti
- Danas postoje komercijalni instrumenti

Šta je 2D tečna hromatografija?

- Ideja potiču od 2D hromatografije na papiru
- Konvencionalno razdvajanje na koloni (1D):
 - Jedna kolona
 - stalna ili promenjiva brzina eluenta
- 2D
 - Uzorak razdvojen na prvoj koloni propušta se kroz drugu kolonu (2D)
 - Stalna ili promenjiva brzina eluenta

Izgleda jednostavno?

Ako su kolone istih karakteristika za bolje razdvajanje uzmete dužu kolonu

Duže vreme kviri formu pikova i otežava njihovu naknadnu obradu

Ako je prva kolona bila za razdvajanje organofosfornih pesticida kakva mora biti druga da bi ih dalje razdvojila i povećala stepen razdvajanja?

Nameće se zaključak da druga kolona i pripadajući detektor moraju da rade kao selektivni analitički sistem za uzorak koji je prošao kroz prvu kolonu. Druga kolona mora da ima potpuno drugačiju selektivnost sa ciljem da poveća verovatnoću da će pikovi koji su potpuno ili delimično preklapljeni nakon prolaska kroz prvu kolonu, biti na njoj razdvojeni i posebno detektovani. Tako se separacija jedne kolone ne sabire sa separacijom druge nego množi (pretpostavlja se da je ponovno mešanje uzorka pri prelasku iz jedne u drugu kolonu zanemarivo).

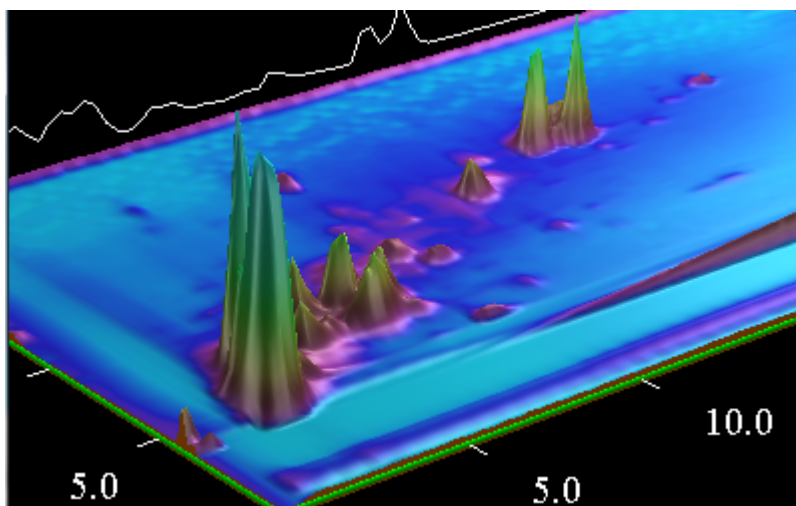
Tehnike

Postoje dve osnovne tehnike 2D tečne hromatografije:

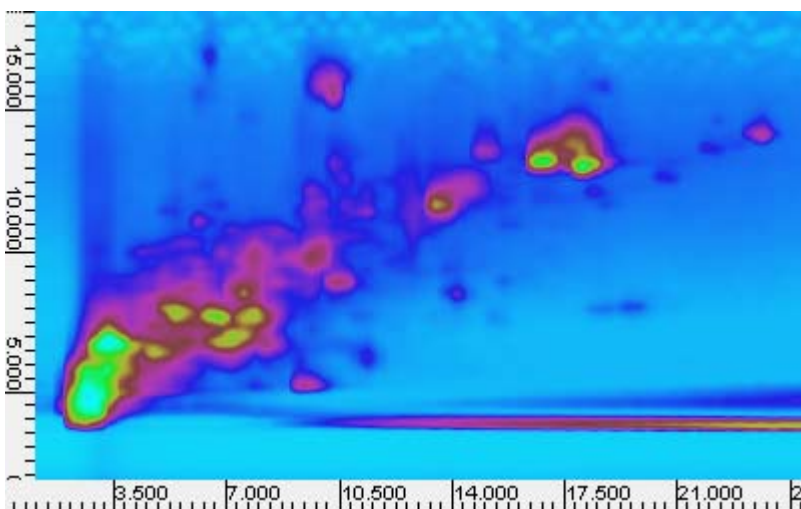
1. LCxLC – kod koje se uzorak kontinualno iz prve kolone uvodi u drugu (eng. „*Comprehensive 2D liquid chromatography*“)
2. LC-LC – kod koje se samo pojedini delovi uzorka propuštaju kroz drugu kolonu (eng. „*Heart-cutting 2D liquid chromatography*“)

Tako je bilo u početku. Danas su poznate mnoge kombinacije metoda koje daju potpuno nove metode. U ovoj oblasti je poslednja reč analitičke tehnike (bar dok se piše ovaj tekst) LC-GCxGC-MS/MS ili 5D metoda koja se sastoji od 1D tečnog hromatografa zatim 2D gasnog hromatografa i na kraju ultra brzog trostrukog kvadropolnog masenog spektrometra (tandem masenog spektrometra - dva masena jedan iza drugog. Dakle 1 tečni, dva gasna i dva masena instrumenta.

Treba praviti razliku između MS i MS/MS. U prvom slučaju uzorak se jonizuje dok je MS/MS tehnika namenjena određivanju strukture i analizi molekula.



Tipičan 2d tečni hromatogram sotverski obrađen



Isti hromatogram kako ga je snimio aparat.

U predmetu MMFH učili smo koji sve načini postoje da se potpuno ili delimično preklopljeni pikovi razdvoje. To je bio jednodimenzioni problem. Ovde se prepoznaju i razdvajaju „kružna polja“ i na osnovu gradijenta inteziteta određuje intezitet i položaj pika.

Upotreba:

- Proteini i peptidi
- Farmaceutske analize
- Analiza polimera
- Analiza hrane
- Analiza životne sredine

Uzorci:

- Biološke ćelije, krv, urin, životna sredina (utvrđivanje prirodnosti i porekla uzoraka, forenzika)
- Traganje za *biomarkerima* (mogućnost da se na osnovu ranog otkrivanja promene koncentracije proteina i malih specifičnih molekula ustanovi početak bolesti).

Kombinacije tečnih hromatografa uobičajene u praksi po metodama razdvajanja

- Prvi hromatograf može biti bilo koji
 - (obrnuto fazni (jake hidrofobne interakcije), (oznaka RPLC)
 - jonoizmenjivački, (oznaka IEC)
 - gel-separacija (separacija na osnovu veličine molekula – nije prava hromatografija, samo se izvodi na isti način i ima iste efekte) (molekulsko sito) (oznake SEC, GPC, GFC)
 - normalno fazni, (oznaka NPLC)
 - sa hidrofilnom interakcijom (hidrofilna stacionarna faza – razdvaja male polarne molekule), (oznaka HILIC)
 - sa srebrnim jonima (poreklo direktno iz hromatografije na papiru - stacionarna faza presvučena srebrnim jonima – razdvaja lipide, poliaromatične ugljovodonike)
 - na kritičnim uslovima (tečna faza se nalazi blizu kritične tačke – razdvajanje i istraživanje polimera), (oznaka LCCC)
- Drugi hromatograf u nizu radi obično na principu obrnutih faza

Neke od kombinacija su teže izvodljive zbog moguće nekompatibilnosti mobilne faze (jonska - gel-separacija). Posebno su dobre kombinacije:

RPLC sa RPLC, HILIC i IEC

HILIC i HILIC, GFC i GFC (GFC označava gel-filtracionu hromatografiju)

Odnos LC-LC i LCxLC

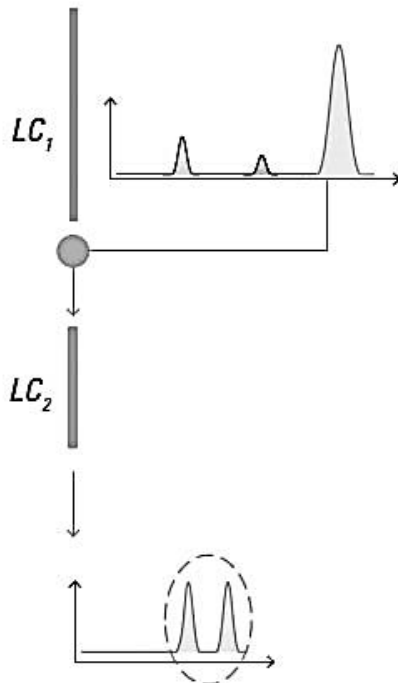
LC-LC se koristi kad postoje supstance od posebnom interesa za koje znamo kad se pojavljuju u vremenu. Tada se one probacuju u drugu kolonu na dalje razdvajanje.

Varijante:

- Deo uzorka se prebacuje na dalje razdvajanje u momentu kao se pojavljuje na prvoj koloni (mora postojati nedestruktivni detektor na prvoj koloni i ne sme doći do ponovnog mešanja uzorka).

- Uzorak iz prve kolone se skuplja i čuva i na razlaganje na drugu kolonu šalje kasnije (OF LINE varijanta)

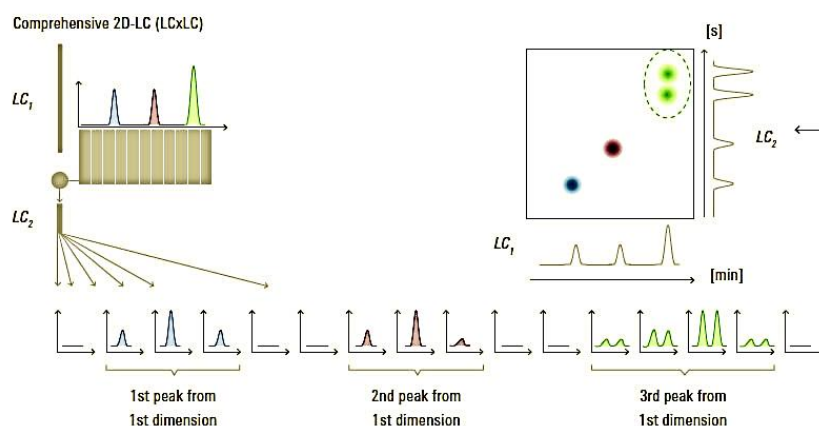
STOP and GO varijanta – uzorak se propušta kroz prvu kolonu, sakupi i zaustavi i onda se kasnije propušta kroz drugu kolonu.



•

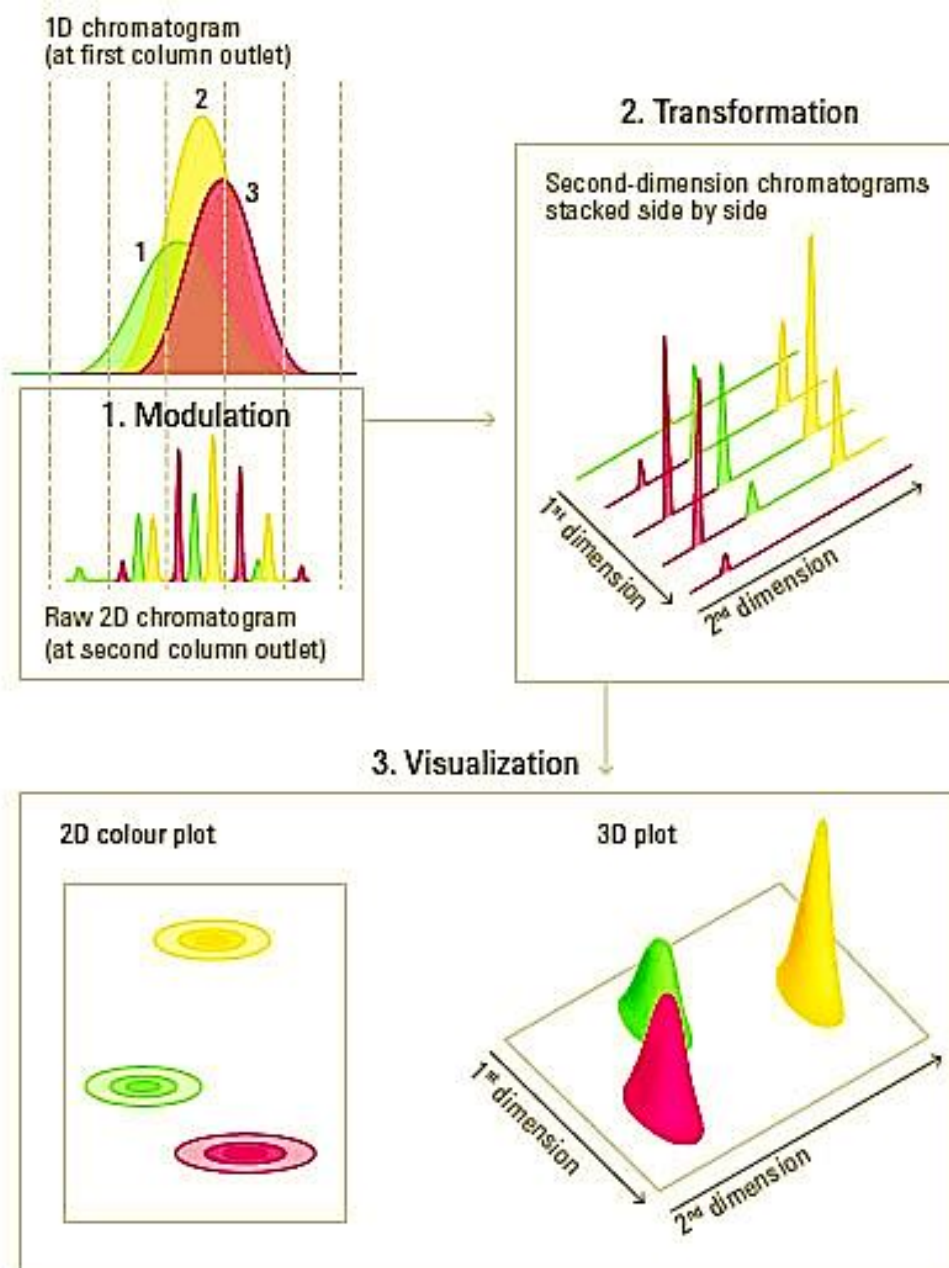
Šta znači sakuplja i naknadno šalje na drugu kolonu? Kako sakuplja, kako čuva?

LCxLC



U konstantnom prebacivanju uzorka iz prve i drugu kolonu hromatogram se formira kao na slici

Šta se stvarno dešava



SERIJE PODATAKA SA 2D HROMATOGRAMA (NA IZLAZU IZ DRUGE KOLONE) SE PRIKUPLJAJU ZA VREME TRAJANJA SEPARACIJE NA PRVOJ KOLONI. TI PODACI SE PRIKUPLJAJU U OBLIKU MATRICE SA DVE KOLONE. U PRVOJ KOLONI JE VREME OD POČETKA PRVOG HROMATOGRAMA NA DRUGOJ KOLONI. U DRUGOJ KOLONI JE INTENSITET SIGNALA NA DETEKTORU NA IZLASKU IZ DRUGE KOLONE. PAROVI PODATAKA SE PRETVARAJU U STRINGOVE TIPA N2D GDE JE N BROJ FRAKCIJE UZORKA KOJI JE IZ PRVE KOLONE PREBAČEN U DRUGU (prebacivanje uzorka iz prve u drugu kolonu se podešava i naziva se modulacija). SERIJE PODATAKA SA DETEKTORA DRUGE KOLONE SE

REARANŽIRAJU U KOLOR-KONTUR PLOT A ZATIME SE VIZUALIZUJU TAKO DA SE TE KONTURE PRETVORE U PIKOVE SA POLOŽAJEM MAKSIMUMA NA MESTU NAJVEĆEG INTENZITETA U KONTURI. DA BI SE TO URADILO GUBE SE NEKI DETALJI JER JE KONAČNA VIZUALIZACIJA NARAVNO DIGITALNA PA SE GUBI DEO PODATAKA.

PRINCIPI I KVALITET 2D HROMATOGRAFIJE

Jedna od veličina koja može opisati kvalitet hromatografije je kapacitet pika (n_c).

Kapacitet pika je maksimalan broj pikova koji mogu stati u separacioni prozor koji predstavlja razliku u vremenima izlaska iz kolone između prvog i poslednjeg pika. To se odnosi na podjednake i dobro razdvojene pikove. U praksi to gotovo nikad nije tako pa je ta veličina više teorijska (hipotetička). Iz statističkih analiza se zna da je za takvo razdvajanje neophodno da je razlika između susednih pikova najmanje 4 standardne devijacije pika (4σ).

Podrazumevajući istu širinu pika i gradijentni prolazak kroz kolonu kapacitet pika je dat formulom:

$$n_c = 1 + \frac{t_{R, \text{poslednji}} - t_{R, \text{prvi}}}{4R_s} = 1 + \frac{t_{R, \text{poslednji}} - t_{R, \text{prvi}}}{\bar{W}}$$

Gde R označava vreme zadržavanja u koloni (retenciono vreme), R_s : U različitim metodama dekonvolucije pikova i multivarijantne analize ta se vrednost uzima kao vrednost potrebna da se dva preklapljenika razdvoje na dva maksimuma i obično se uzima da je jednaka 1.

U praksi je jednaka širina pikova i jednaka razdvojenost praktično nemoguća pa je koncept kapaciteta pika proširen sa brojem hemijskih vrsta u uzorku. Srednji broj posmatranih pikova (p) je u vezi sa brojem hemijskih komponenti u smeši (m) i kapacitetom pika preko jednačine:

$$p = m \exp\left(-\frac{m}{n_c}\right)$$

Veličina m/n_c naziva se saturacioni faktor (α) i kad je on mali u separacioni prostor staje mali broj pikova.

Jedna od najvažnijih posledica ove teorije (Davis-Giddings-ova teorija) je da grafik broj pikova u funkciji broja analitičkih komponenti ima maksimum na $0.37 \cdot n_c$. To znači da ako imamo veliki broj uzoraka sa 100 komponenti i ako je kapacitet pika 100, uz razumno trajanje analize od 30 min, na hromatogramu ćemo videti u proseku samo 37 pikova. Pikovi mogu bit singletni, dubletni, tripletni, itd. Ako su singletni broj vidljivih pikova pada na 18. To opet znači da ćemo na takvim snimcima, bez poboljšanja razdvajanja, videti 18 singletnih i 19 dubletnih ili multipletnih. To znači da moramo, ako želimo dobro razdvajanje sa manjom upotrebom matematike, obezbediti vrlo visok kapacitet pika.

PROTOK KROZ KOLONU:

Kao i kod 1D hromatografije protok kroz kolonu može biti:

- Kontinualan, nepromenjiv u vremenu

- Protok promenljiv u vremenu – gradijentni protok – gradijent protoka (veoma važna veličina)

Od vrste protoka kroz kolonu zavisi i standardna devijacija pika.

Za konstantan protok važi:

$$s_{kon} = \frac{t_0}{\sqrt{N}} (1 + k)$$

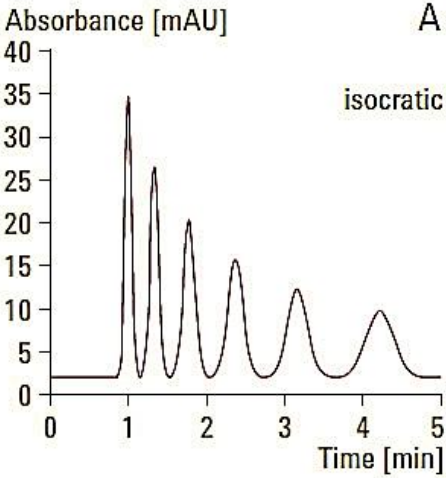
Gde je $t_0 = V_M / F$, tj. mrtvo vreme kolone jednako je odnosu mrtve zapremine kolone i brzine eluenta kroz kolonu (zapremina kroz vreme), a k retencioni faktor rastvora jednak $1 - t_0/t_R$. t_R je retenciono vreme. N je broj teorijskih nivoa kolone

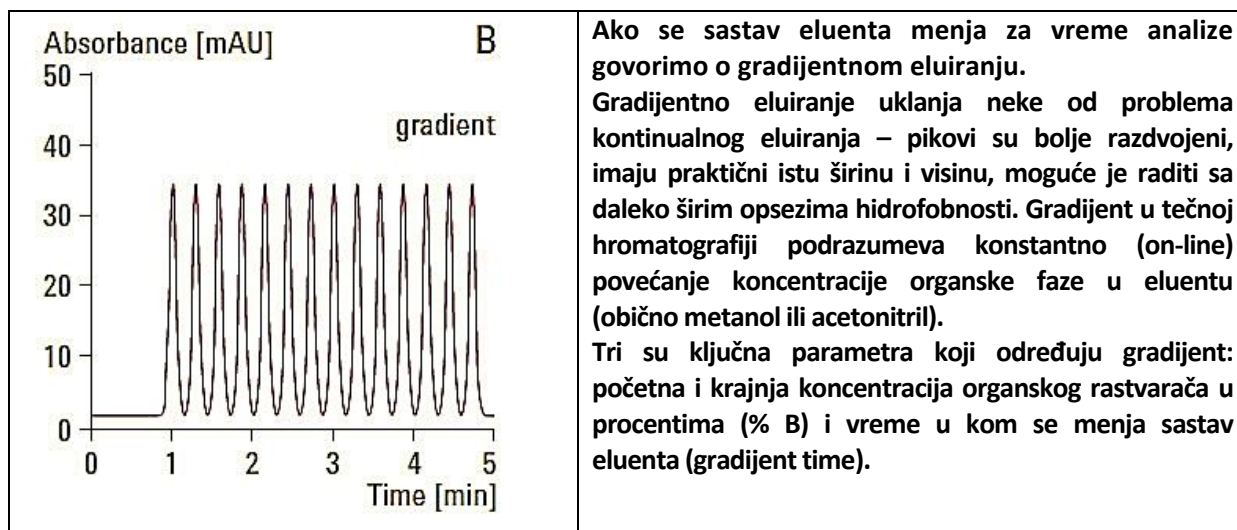
Za gradijentne uslove je:

$$s_{grad} = \frac{t_0}{\sqrt{N}} G(p) (1 + k_e)$$

$G(p)$ je kompresioni faktor kolone ($>0,58$, <1), k_e je retencioni faktor u trenutku kada rastvorena supstanca napušta kolonu. k_e je jednako $(k_0 / (b k_0 + 1))$ gde je b brzina izmene koncentracije eluenta.

OSNOVNE RAZLIKE IZMEĐU DVA NAČINA PROTOKA KROZ KOLONU

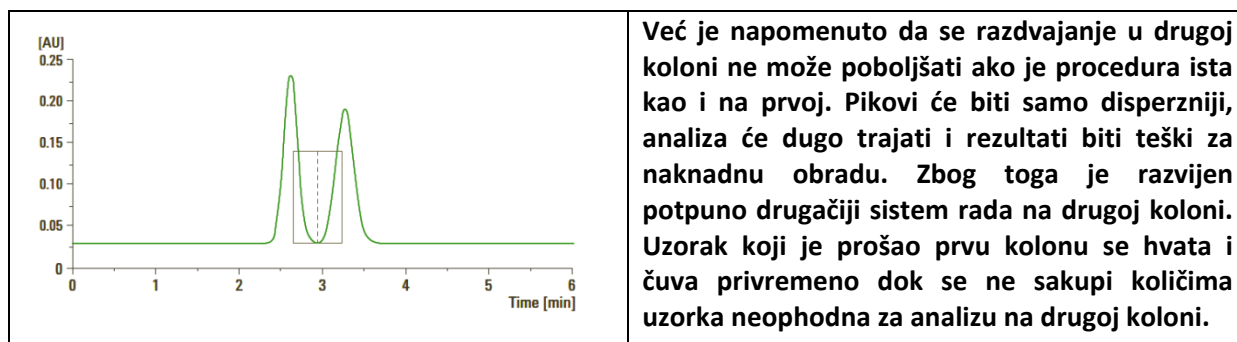
	Osim razlika u standardnoj devijaciji pika, različiti načini protoka kroz kolonu imaju čitav niz drugih posledica. Ako je protok eluenta kroz kolonu konstantan, komponente uzorka koje izlaze iz kolone prve biće slabo razdvojene. One koje izlaze kasnije imaju šire pikove manje visine iako možda imaju istu koncentraciju i isti odgovor detektora kao prethodne komponente (disperzija pikova). Osim toga ako radimo sa RPLC i u analitu su prisutne komponente širokog opsega hidrofobnosti, vreme analize može biti vrlo dugo sa potpuno neizvesnim čišćenjem kolone.
---	--



RETENCIONA VREMENA (vremena zadržavanja u koloni)

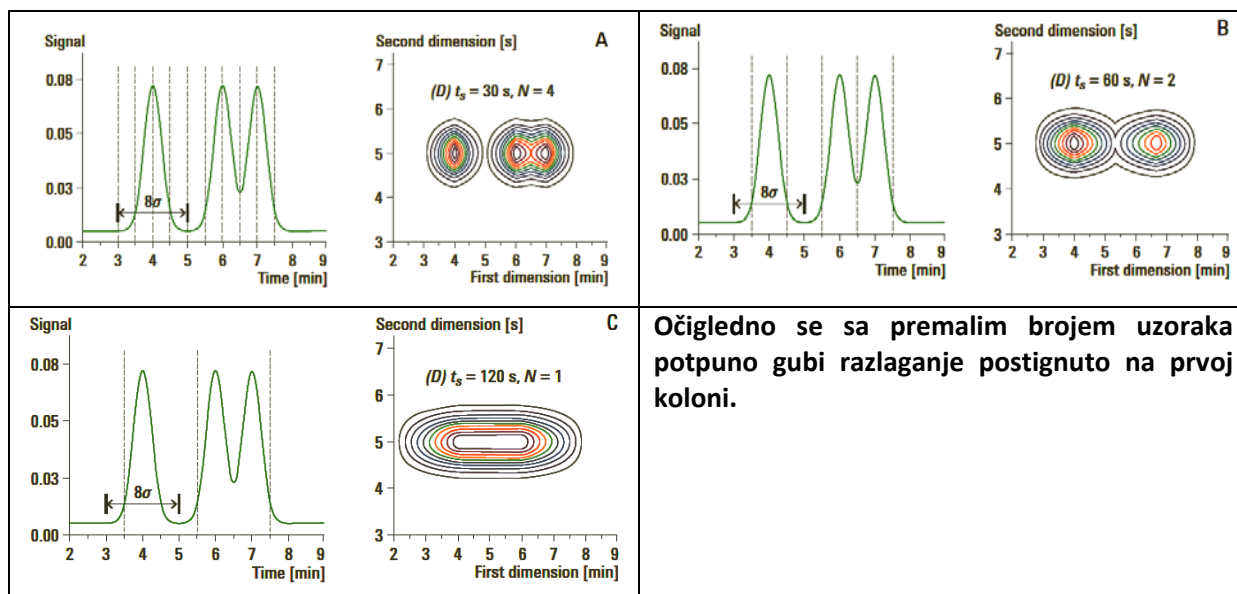
Kod kontinualnog eluiranja analit se kroz kolonu kreće brzinom koja zavisi od njegovog particionog koeficijenta između mobilne i stacionarne faze. Analit se kroz kolonu kreće konstantnom brzinom koja je u suštini određena osobinama stacionarne faze. Mera zadržavanja u koloni je retencioni faktor.

U gradijentnoj hromatografiji to nije tako. U početku, kad je %B nizak, analiti se nalaze na početku kolone praktično nepokretni. Promenom sastava eluenta analiti počinju da se kreću kroz kolonu i što se sastav eluenta više menja, analit „ubrzava“ kroz kolonu.

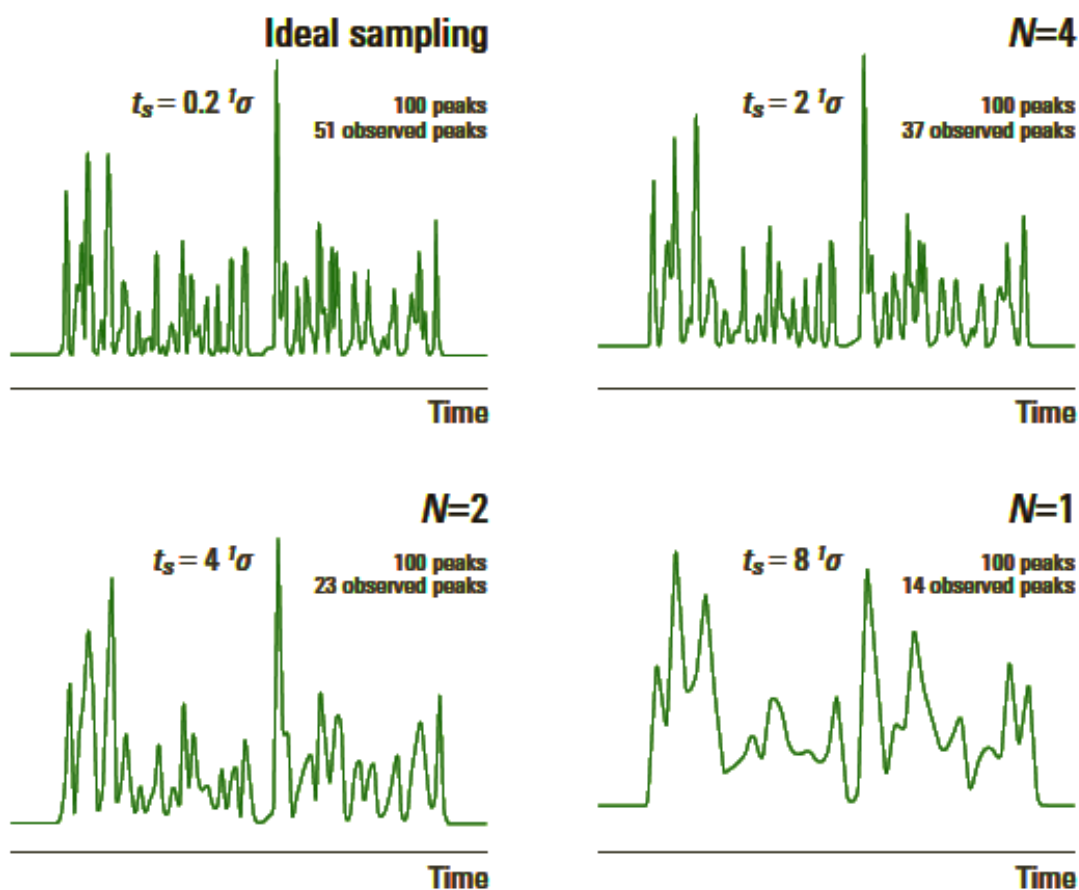


Problem je što je taj veoma mali deo ukupne zapremine 1D pika podložan ponovnom mešanju (eng. *remixing*). Taj problem su teorijski razradili Murphy, Schule and Foley. Njihova osnovna ideja je prikazana na slici iznad. Zamislamo da prikupljamo uzorke čiji je zapreminski ekvivalent oko 4 standardne devijacije širine pika. U zavisnosti od toga kad je uzorak uzet u odnosu na položaj maksimuma pika (to se zove faza uzorkovanja) sasvim je moguće da dođe do određenog ponovnog mešanja već razdvojenog analita i gubljenja razlaganja. Ako je kraj jednog uzorka na slici u trećem minutu, a drugi počeo sa uzimanjem u 2,9 minuta neće doći do ponovnog mešanja. Ako se faza uzorkovanja proširi na pr. od 2.6 do 3.2 minute razdvajanje se gubi. Jedna od najvažnijih posledica njihove teorije je da je za dobro razdvajanje na drugoj koloni i izbegavanje ponovnog mešanja u petlji za uzorak, potrebno uzeti tri do četiri uzorka za 8 standardnih devijacija širine pika.

Kak to sve utiče na rezoluciju na drugoj koloni vidi se na sledećim slikama:



Efekat brzine uzorkovanje najbolje se vidi na sledećim slikama (t_s je veme uzorkovanja):



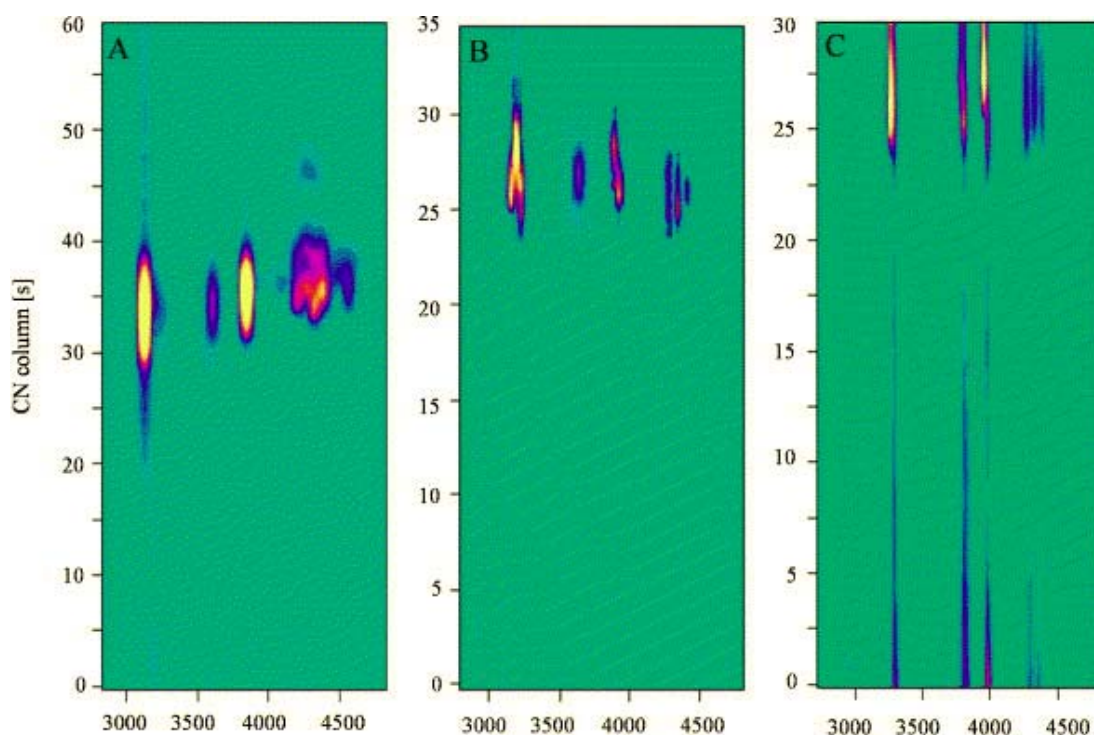
Iako uobičajena 4 uzorka po piku daju znatno manju rezoluciju od ideakne (37 PREMA 51) i ta brzina uzorkovanja je toliko velika da se u praksi gotovo i ne može (za sada) postići.

U 2D hromatografiji je u prvoj dimenziji uobičajena upotreba gradijenta uz nešto niži protok eluenta od optimalnog. Tako se znatno snižava kapacitet pika ali se obezbeđuje potrebna količina uzorka za prebacivanje u drugu kolonu. U drugoj dimenziji eluiranje je uglavnom bilo konstantno

zbog vremena potrebnog za ponovno uravnotežavanje kolone (vraćanje u početno stanje). Kolona mora nekoliko puta da se ispere sa eluentom u kom je mali procenat organskog rastvarača. Osim toga teško je u kratkom roku (nekoliko minuta) obezbediti stabilne gradijente. Razvojem novih stacionarnih faza, pumpi i ostalih pratećih delova gradijentno eluiranje postaje praksa i u drugoj dimenziji.

Razmotrimo malo detaljnije ceo proces tečne hromatografije da bi uočili neke vrlo važne detalje. Pod uslovima koji su tipični za skoro sve metode tečne hromatografije od momenta ubacivanja uzorka u kolonu (INJEKTIRANJE, INJEKTOR) i početka kretanja uzorka kroz kolonu, uzorak se u stvari sve više razblažuje – zapremeni uzorka dodaje se zapremina eluenta. U drugoj koloni se uzorak još više razblažuje i ako se ne preduzmu odgovarajuće mere koje smanjuju efekte razblaženja, može se doći u situaciju da koncentracija analita opadne ispod optimalnih koncentracija za detekciju. Problem se rešava pažljivim odabirom zapremine uzorka koji se prevodi u drugu kolonu (Schure i Schoenmakers i saradnici). Generalno, veća količina uzorka je bolja ali ne i prevelika jer se zbog velike brzine eluiranja gubi oblik pikova.

Izbor modulacionog perioda ili učestanosti uzorkovanja sa prve kolone je osnovni parametar LCxLC analize. Da bi se održalo razdvajanje sa prve kolone, veliki broj frakcija se mora prebaciti iz prve u drugu dimenziju.



Na slici se vidi efekat modulacionog vremena na rezoluciju u drugoj dimenziji (A – 60 s, B – 35 s, C – 30 s). Optimalno vreme modulacije je u ovom slučaju 35 s.

KVANTITATIVNA ANALIZA:

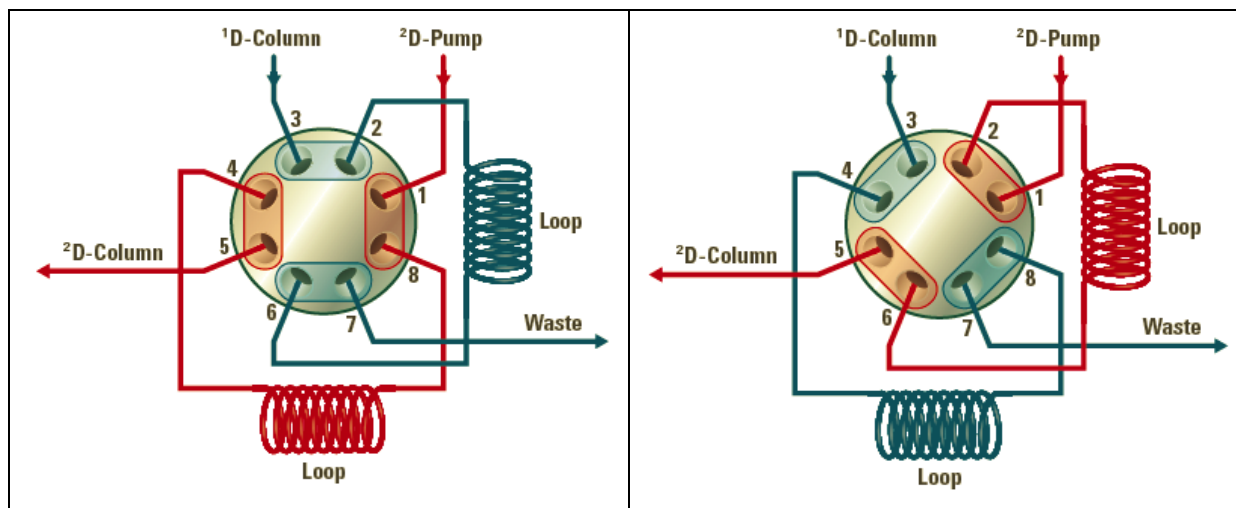
Ako analitičar nema na raspolaganju specijalni softver (razvijen za 2D gasnu hromatografiju) koji može na osnovu 2D kontur plotova izračunati koncentraciju, kvantitativna analiza se mora vršiti na

drugi način. Obično se sabiraju površine pikova u drugoj dimenziji. Tako dobijene koncentracije imaju greške do 8 %. Kvantitativna 2D tečna hromatografija tek treba da se razvija.

Srce LCxLC sistema je interfejs (modulator) koji povezuje dve kolone. Modulator je višestruki visokopritisni prekidački ventil. On omogućuje prikupljanje eluenta iz prve kolone u unapred određenim zapreminama, njegovo čuvanje i slanje u drugu kolonu. Relativno nizak protok u prvoj koloni obezbeđuje punjenje jedne petlje za uzorak (otvara se ulazni ventil u petlju). Istovremeno se otvara izlazni ventil druge petlje i uzorak velikom brzinom prebacuje u drugu kolonu.

Tipičan modulator sa osam ulaza i dva položaja prikazan je na slici

Zapremina uzorka koji se prebacuje u drugu kolonu je usko povezana sa brzinom protoka kroz prvu kolonu i jedan je od važnijih parametara koji se podešava u razvoju metode. Već je rečeno da ta zapremina mora biti relativno velika (zbog detekcije) ali ne ni prevelika. To znači da postoji optimalna koja se mora podesiti. Iako postoje neka pravila o tom podešavanju (podešavanje podrazumeva odabir prave zapremine petlje) ipak se bez probe to ne može tačno odrediti.



Pre ubacivanja frakcije u drugu kolonu, analiza prethodne frakcije mora biti završena. Vreme analize na drugoj koloni mora biti manje ili jednako modulacionom periodu (frekvenciji uzoraka na drugoj koloni).

2D GASNA HROMATOGRAFIJA

Po vremenu nastanka starija je od 2D tečne hromatografije i praktično sve što je rečeno za tečnu važi i za gasnu hromatografiju.

OSNOVNE RAZLIKE:

Ono što ih bitno razlikuje je prestanak potrebe za izborom kompatibilnih kolona. Ovde su moguće gotovo sve kombinacije kolona. Važno je da prolazak kroz drugu kolonu bude mnogo brži nego kroz prvu i da se kolone razlikuju po selektivnosti (druga kolona je kraća i manjeg unutrašnjeg prečnika). Tradicionalno se u prvoj koloni koristi nepolarna stacionarna faza, a u drugoj koloni polarna. Sadašnji trend je polarna prva, a nepolarna druga stacionarna faza. Kao druga faza sve više se koriste jonske tečnosti (podjednako su dobre i za polarne i nepolarne analite).

Izbor detektora:

Detektor druge kolone mora biti osetljiv i brz jer se radi o malim količinama analita koji brzo prolaze kroz kolonu. Kvadropolni maseni detektor je na pr. generalno spor. Odlični su FID i TOF-MS (Time Of Flight MS – danas uglavnom u upotrebi)

I ovde postoje dve tehnike:

GC-GC i GCxGC i opis im je isti kao i za tečnu hromatografiju.

Najvažnija razlika između 2D tečne i gasne hromatografije je nepostojanje promenljivog sastava eluenta i posledica - „ubrzanje“ analita kroz kolonu. U gasnoj hromatografiji tu namenu ima programirano povećanje temperature kolone („ubrzava“ analit kroz kolonu). Efekat programiranog povećanja temperature kolone je isti kao i efekat gradijentnog eluiranja – pravilnim izborom se postiže da svi pikovi dobiju praktično istu poluširinu.

Kapacitet pika je i ovde pojam oko kog se nagradila teorija gasne hromatografije i on je jednak (za izotermne uslove):

$$n_c = 1 + \frac{N^{1/2}}{4} \ln \frac{t_n}{t_1}$$

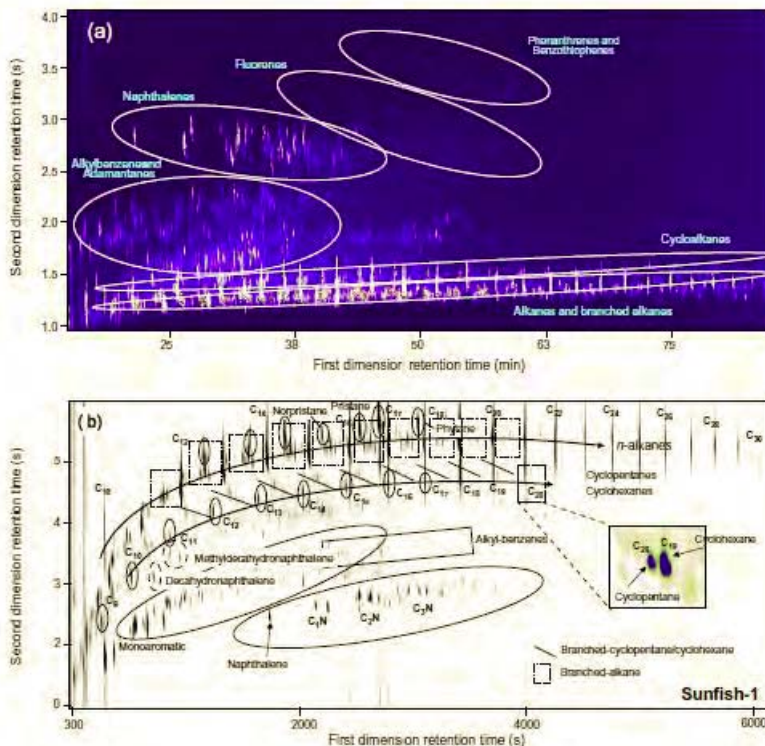
Gde je N broj platoa kolone a sa t su označena retenciona vremena poslednjeg i prvog pika. Za temperaturno programirane uslove kapacitet pika je.

$$n_c = \frac{N^{1/2}}{4} \frac{t_n}{t_1} + 1$$

Lako je pokazati da se kapacitet pika povećava oko 10 puta kad se pređe sa izotermnim uslovima na temperaturno programirane uslove. Prelaskom na 2D GCxGC uslove kapacitet pika se povećava na iznos jednak proizvodu kapaciteta na dve kolone.

Za kvalitativnu identifikaciju, svaki analit ima dva retenciona vremena – na prvoj i drugoj koloni. GCxGC eksperiment je praktično snimak uzorka na dve različite kolone (postupak identifikacije na drugoj koloni se ionako primenjuje u analitičkoj praksi). Dva retenciona vremena određuju položaj pika u ravni određenoj retencionim vremenima, a ne na jednoj vremenskoj osi

Druga interesantna osobina GCxGC hromatograma je njihova uređenost. Na 2D retencionoj ravni pikovi koji pripadaju homolognim serijama jedinjenja leže praktično na svojim područjima. Neko ko se bavi 2D gasnom će odmah na osnovu položaja pika znati kojoj klasi jedinjenja pripada neki pik. Tako nešto nije moguće u konvencionalnoj gasnoj hromatografiji (slika).

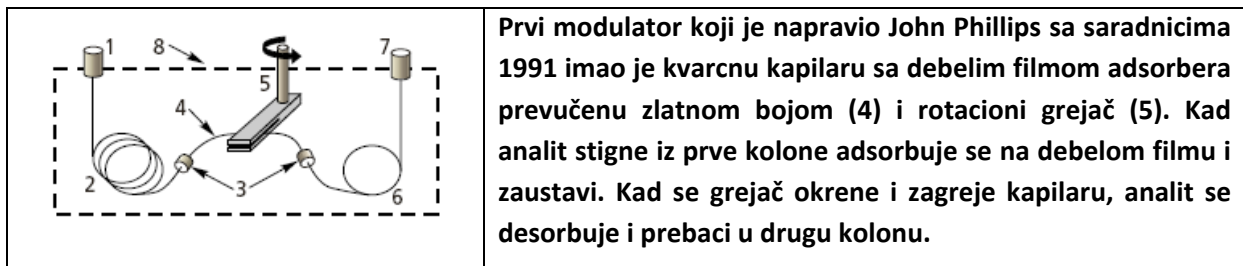


Uređeni hromatogrami i visoko reproduktivne retencione koordinate čine tehniku izuzetno primenjivom u oblasti kao što je forenzika. Jedna od prvih primena GCxGC bila je upravo u forenzici.

MODULATORI

Grejani modulatori

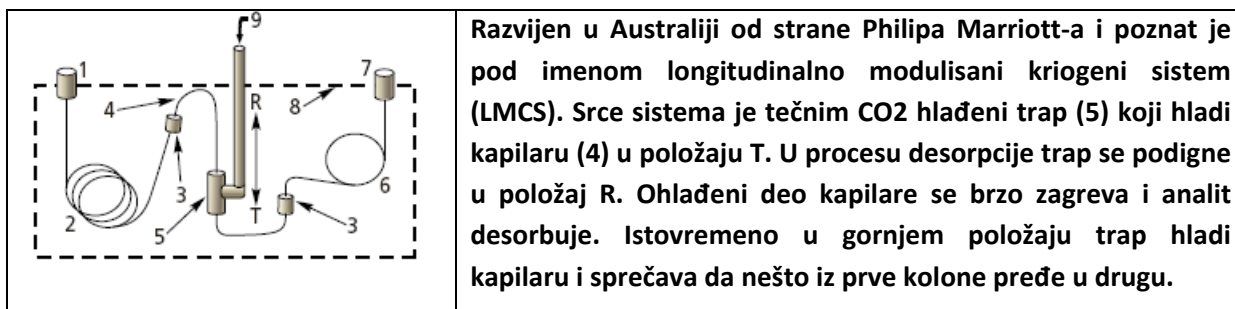
U 2D tečnoj modulatori su obični višestruki visokopritisni ventili. U 2D Gasnoj modulatori su mnogo komplikovaniji i sofisticiraniji uređaji.



Vrlo brzo je uočena velika mana takvog modulatora – dok se kapilara još nije ohladila ono što uđe u kapilaru odmah i pređe u drugu kolonu. Da bi se to izbeglo, uvedene su hladna i vruća mlaznica koje greju i hlade kapilaru („petlju za uzorak“). Vremenom su takvi modulatori postali uobičajeni sa više ili manje usavršenim konstrukcijama.

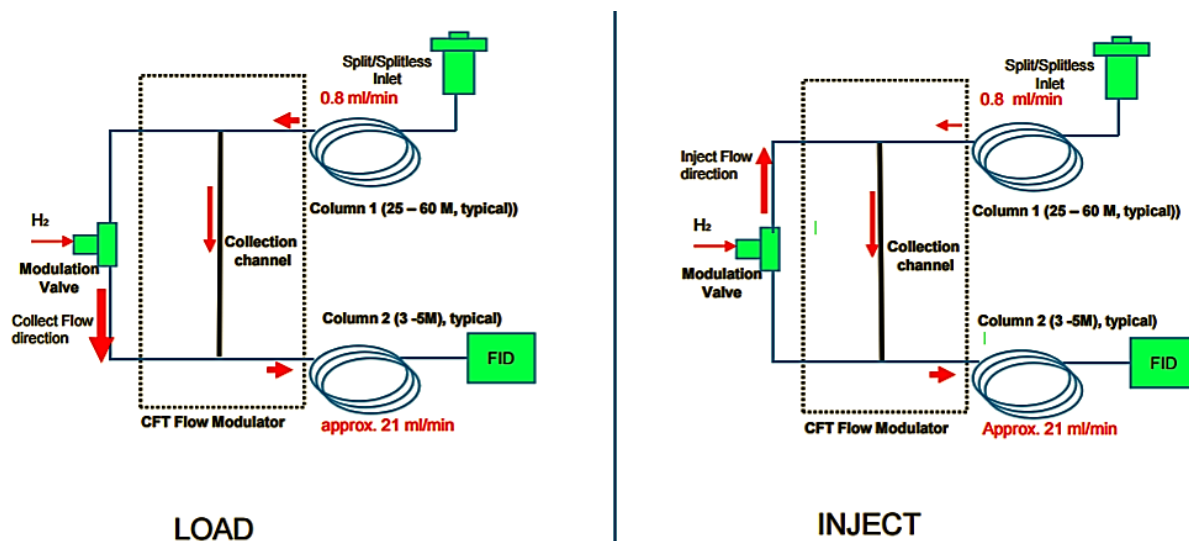
Ipak, svi oni imaju ozbiljan nedostatak. Jedno je, radi brze desorpcije, grejanje na temperaturu koja je oko 100 stepeni viša od temperature kolone što dovodi do opasnosti od termalne destrukcije kako stacionarne faze tako i analita. Drugo su pokretni delovi koji sami za sebe mogu da prave probleme. Najozbiljniji nedostatak je da se sa takvim modulatorima ne mogu analizirati isparljive organske komponente.

KRIOGENI MODULATORI



Iako je mnogo bolji od termalnog i ovaj modulator ima pokretne delove, a i temperatura tečnog CO₂ nije dovoljno niska za zaustavljanje jako isparljivih analita. Zbog toga su razvijeni kriogeni modulatori bez pokretnih delova hlađeni tečnim azotom.

Najnovije generacije modulatora su modulaciona pelja sa zatvorenim ciklusom hlađenja i tzv. modulatori protoka. Nijedna varijanta nema pokretnih delova i ne treba joj tečnost ili gas za hlađenje. Prvi metod je praktično zamrzivač koji radi na -90 oC i o njemu nema gotovo nikakvih podataka osim da radi dobro i bolje od konkurencije. Može da radi sa jedinjenjima koja imaju iznad 6 ugljenikovitih atoma.. Šema drugog je data na slici. Ni on nema pokretnih delova, nema medija za hlađenje i radi sa jedinjenjima kod kojih je broj ugljenikovitih atoma veći od 5. Ukratko, ako radite gasove ili jako iaparljive organske supstance tečni azot je nezamenjiv.



Prikazani tip modulatora pripada tzv. tehnologiji kapilarnog protoka. U širokoj je upotrebi u raznim delovima hromatografije (i ne samo nje) njom se na primer deli eluent tako da jednaki delovi odu na dva ili više detektora, vode eluenti sa dve kolone na jedan detektor, u GC-GC hromatografiji odvaja pik od interesa, itd.