
PRACE

**Instytutu Ceramiki
i Materiałów Budowlanych**

Scientific Works
of Institute of Ceramics
and Building Materials

Nr 13

ISSN 1899-3230

Rok VI

Warszawa–Opole 2013

Teksty publikowane w „Pracach Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych” poddawane są procedurze recenzyjnej

Na okładce zdjęcie z artykułu Michała Stachów

„Prace Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych” ukazują się w wersji papierowej i elektronicznej (<http://icimb.pl/opole/wydawnictwa>).
Wersją pierwotną jest wersja papierowa

Opracowanie redakcyjne: Maria Szwed, Janina Drozdowska



Wydawnictwo Instytut Śląski Sp. z o.o., Opole, ul. Piastowska 17, tel. 77 4540 123
e-mail: wydawnictwo@is.opole.pl
Nakład: 130 egz. Objętość: 5,50 ark. wyd., 6,75 ark. druk.

DARIA GAŚSIOR*

Dwuwymiarowa chromatografia gazowa – rozwój techniki na przestrzeni lat

Słowa kluczowe: dwuwymiarowa chromatografia gazowa, metody chromatograficzne, modulacja, wysoka rozdzielczość, technika „heart-cutting”.

Dwuwymiarowa chromatografia gazowa jest prężnie rozwijającą się techniką analityczną, charakteryzuje się zwiększoną zdolnością rozdzielczą oraz większą czułością w porównaniu do standardowej jednowymiarowej techniki chromatografii gazowej, co pozwala na znaczne obniżenie granicy wykrywalności analitów. Bardzo dobrze sprawdza się w przypadku analiz skomplikowanych próbek o złożonym składzie. W pracy scharakteryzowana została zasada, w oparciu o którą funkcjonuje dwuwymiarowa chromatografia gazowa, ze szczególnym uwzględnieniem budowy modulatorów jako istoty całego systemu. Omówiony został sposób prezentacji wyników oraz etap ich wizualizacji. Technika dwuwymiarowej chromatografii gazowej wykorzystywana jest coraz powszechniej, między innymi w analizie produktów ropopochodnych, analizie środowiskowej do oznaczania związków toksycznych dla organizmów, w analizie produktów żywnościowych oraz w kryminalistyce. W artykule przedstawiono wybrane przykłady aplikacyjne omawianej techniki.

1. Wprowadzenie

Chromatografia jest techniką rozdzielania związków znaną już od początku XX w. Jej intensywny rozwój nastąpił ok. 50 lat później, co potwierdza wzrost liczby publikacji dotyczących tej metody analitycznej [1–5].

Za twórcę chromatografii uważa się rosyjskiego chemika i biologa Michaiła Siemionowicza Cwieta (1872–1919), który w 1903 r. dokonał pierwszego w historii rozdzielania chromatograficznego pigmentów roślinnych, chlorofili, karotenów i karotenoidów na szklanej kolumnie wypełnionej sproszkowanym węglanem wapnia [6].

Stosując różne metody chromatograficzne można rozdzielać i oznaczać wiele składników zawartych w próbce. Na przestrzeni lat metody chromatograficzne

* Mgr inż., Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Oddział Inżynierii Procesowej Materiałów Budowlanych w Opolu.

znacznie ewoluowały i z uwagi na zastosowaną fazę ruchomą lub nieruchomą zostały wyodrębnione w nich poszczególne rodzaje. Jeżeli fazą ruchomą jest gaz, to mówimy o chromatografii gazowej. Za narodziny tej gałęzi chromatografii przyjmuje się rok 1955, kiedy to Perkin-Elmer wprowadził pierwszy chromatograf gazowy (Vapor Fractometer) zaopatrzony w detektor cieplno-przewodnościowy. Do chwili obecnej chromatografy gazowe cieszą się ogromną popularnością.

Chromatografia gazowa jest istotnym narzędziem zarówno w analizie jakościowej, jak i ilościowej, które pozwala w prosty i szybki sposób oznaczyć śladowe ilości analitu w próbce. Jest to metoda instrumentalna szeroko rozpowszechniona w analizie związków organicznych, umożliwia szybką analizę złożonych mieszanin związków chemicznych oraz ocenę ich czystości. Technika ta znalazła swoje zastosowanie w przemyśle, ochronie środowiska, farmacji, kryminalistyce, jak również w kontroli antydopingowej i w analizie składu chemicznego żywności. Zasada działania opiera się na rozdzieleniu analizowanej próbki na kolumnie chromatograficznej na skutek występowania oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy poszczególnymi związkami próbki a wypełnieniem kolumny [7]. Próbka jest wprowadzana do dozownika, gdzie pod wpływem wysokiej temperatury przechodzi w stan gazowy, a następnie, za sprawą fazy ruchomej, zostaje przetransportowana na kolumnę chromatograficzną. Fazą ruchomą jest gaz, wykazujący obojętność w stosunku do składników próbki, taki jak hel, azot czy ostatnio coraz częściej wykorzystywany wodór. Związki wymyte z kolumny trafiają do detektora, który w zależności od stężenia związku wytwarza sygnały elektroniczne określonej wielkości. Wszystkie sygnały rejestrowane są w postaci pików chromatograficznych na chromatografie [8]. Z chromatogramu wynika w jakiej kolejności wymywane są składniki, natomiast powierzchnia pików pozwala obliczeniowo określić ich stężenie.

Technika chromatografii gazowej nieustannie ewoluuje, ukierunkowując się na minimalizację czasu i kosztów analizy oraz poprawę jakości wyników, jak i zmniejszenie granic wykrywalności oznaczanych związków. Dzisiejsze osiągnięcia chromatografii gazowej skłaniają ku wykorzystywaniu znacznie krótszych kolumn chromatograficznych, zaprojektowanych do tzw. analizy fast GC [9–11]. Pozwalają one na znaczną oszczędność czasu analizy i materiałów eksploatacyjnych z nią związanych. Ponadto, z uwagi na wyczerpywanie się zasobów helu na świecie, i wynikające z niskiej podaży aspekty ekonomiczne, coraz częściej sięga się po tańszy zamiennik tego gazu jakim jest wodór [12–13]. Rozwój metod i technik chromatograficznych zmierza również w kierunku wzrostu wydajności i zdolności rozdzielczej wykorzystywanych urządzeń chromatograficznych.

Obecnie wykorzystując standardową, jednowymiarową technikę chromatografii gazowej możliwe jest wyodrębnienie ok. 100–150 pików chromatograficznych

podczas jednej analizy. Jednak często zdarza się, że taka zdolność rozdzielcza okazuje się być niewystarczająca. Problem ten może pojawiać się na przykład w analizie próbek produktów petrochemicznych, takich jak oleje, jak również mocno zanieczyszczonych próbek żywności czy też zanieczyszczeń powietrza. Ponadto, analiza w układzie jednowymiarowym bazuje na rozdzielaniu związków jedynie na podstawie jednej właściwości, a próbki poddawane analizie często charakteryzują się obecnością związków o podobnych właściwościach, co za tym idzie o zbliżonych czasach retencji, następstwem czego dochodzi do koelucji analitów. Problem ten obecny jest zwłaszcza w próbkach paliw, ekstraktach środowiskowych czy próbkach żywności.

Jednym ze sposobów na poprawę zdolności rozdzielczej jest połączenie ze sobą za pomocą interfejsu dwóch niezależnych kolumn chromatograficznych. Technika ta, nazywana dwuwymiarową chromatografią gazową (GCxGC lub 2D GC), polega na rozdzielaniu pików na podstawie kilku właściwości, charakterystycznych dla zastosowanych kolumn. W ciągu ostatniej dekady dwuwymiarowa chromatografia gazowa staje się potężną i coraz chętniej wykorzystywaną techniką analityczną, która idealnie sprawdza się w analizie skomplikowanych próbek o bardzo złożonym składzie [14]. W sposób praktyczny technika ta wykorzystana została już w latach 80. XX w. [15]. Polega ona na zastosowaniu dwóch kolumn chromatograficznych o różnych właściwościach, na przykład różniących się polarnością wypełnienia. Selektywność drugiej kolumny jest dobierana w taki sposób, aby możliwe stało się rozdzielenie analitów, które koeluowały ze sobą przy zastosowaniu pierwszej kolumny. Obie kolumny są połączone ze sobą poprzez tzw. modulator, którego rola polega na zateżaniu analitów wydostających się z pierwszej kolumny i przekazaniu ich do drugiej kolumny. Taka zasada działania charakteryzuje się zwiększoną zdolnością rozdzielczą, większą czułością, co pozwala na obniżenie poziomu wykrywalności analitów oraz większą przejrzystość chromatogramów w porównaniu do standardowej metody chromatografii gazowej [16–17]. Wykorzystywane w tej technice dozowniki, kolumny chromatograficzne, gazy chromatograficzne oraz detektory są analogiczne jak w przypadku jednowymiarowej techniki chromatografii gazowej. Kluczową rolę pełni modulator, którego konstrukcja jest w głównej mierze odpowiedzialna za pomyślny przebieg dwuwymiarowej analizy metodą GC. Proces rozdzielania w dwuwymiarowej chromatografii gazowej w literaturze naukowej kategoryzuje się ze względu na ilość frakcji przekazywanych do rozdzielenia w drugim wymiarze na dodatkowej kolumnie. Zgodnie z tą systematyką wyróżnia się tzw. *heart-cutting* GC oraz GCxGC. Anglojęzyczny termin *heart-cutting* wywodzi swoją nazwę od nadrzędnej roli etapu separacji i przenoszenia na sąsiednią kolumnę jedynie określonego podzbioru składników spośród całego konglomeratu analitów [18]. Operacja ta odbywa się dzięki modulatorowi, który stanowi „serce” systemu dwuwymiarowej chromatografii gazowej. Istotnym ograniczeniem

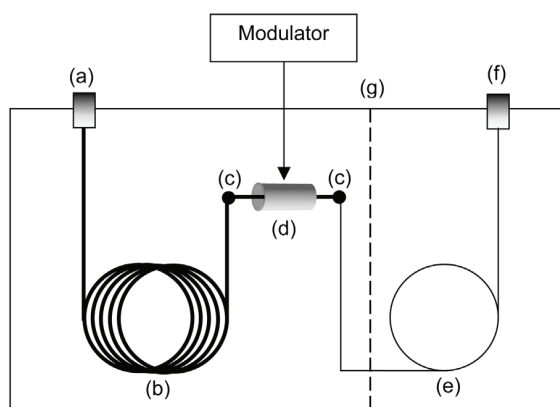
tego rodzaju analizy jest możliwość selekcji zaledwie jednej albo co najwyżej kilku frakcji wyeluowanych z pierwszej kolumny w celu dokładniejszego jej rozdzielania na drugiej kolumnie. Innymi słowy, technika ta sprawdza się w przypadku analiz ukierunkowanych na osiągnięcie konkretnego celu, czyli rozdzielania określonej frakcji. W przypadku kiedy wymagana jest całościowa szczegółowa analiza zastosowanie techniki *heart-cutting* GC jest zbyt czasochłonne i skomplikowane. W takiej sytuacji bardzo dobrym rozwiązaniem jest poddanie próbki analizie GCxGC. Rozdzielenie GCxGC dotyczy całości próbki, wraz ze wszystkimi zawartymi w niej analitami, i idealnie nadaje się do analiz próbek o skomplikowanym składzie oraz dużej ilości nieznanymi analitów.

Dwuwymiarowa chromatografia gazowa wykorzystywana jest coraz powszechniej, między innymi w analizie środowiskowej do oznaczania związków toksycznych dla środowiska, takich jak polichlorowane bifenyle (PCB) [19], wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz substancje ropopochodne, jak np. olej napędowy czy benzyna [20–22]. Metoda ta z powodzeniem sprawdza się również w analizie próbek żywnościowych, na przykład pod kątem obecności w nich pestycydów [23–24].

2. Zasada działania metody

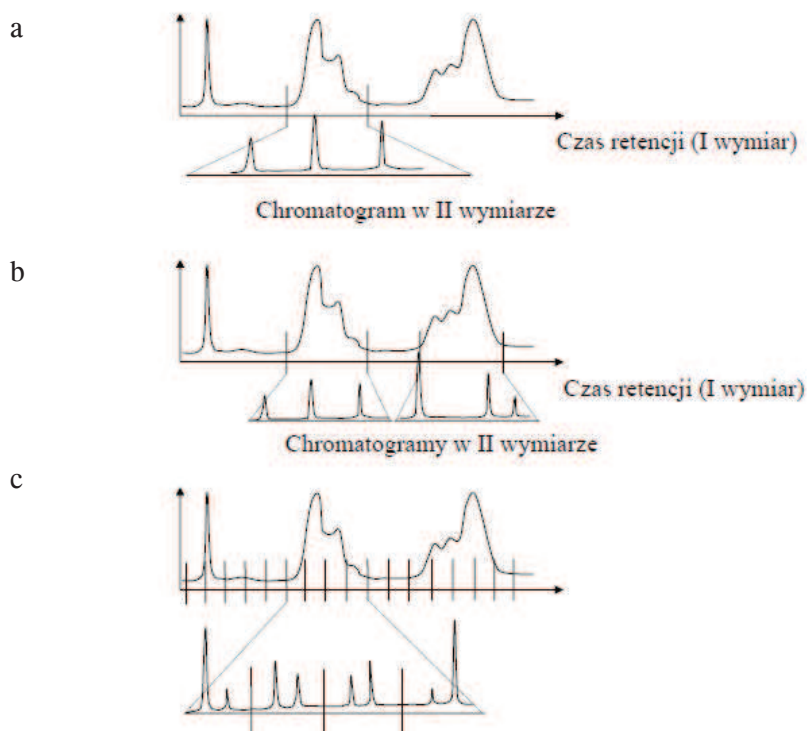
Fundamentalną zasadą chromatografii dwuwymiarowej jest rozdzielanie związków na dwóch kolumnach chromatograficznych charakteryzujących się różnymi selektywnościami. Zazwyczaj kolumny stosowane w pierwszym wymiarze mają długość 15–30 m, średnicę wewnętrzną 0,25–0,32 mm, natomiast grubość filmu fazy stacjonarnej mieści się pomiędzy 0,1 i 1 μm . Kolumny wykorzystywane do rozdzielania w drugim wymiarze powinny być znacznie krótsze oraz węższe. Jest to istotne kryterium z uwagi na konieczność znacznego skrócenia czasu analizy w drugim wymiarze w stosunku do wymiaru pierwszego. Natomiast parametry kolumn stosowanych do rozdzielania w drugim wymiarze mieszczą się w granicach: (0,5–2) m x 0,1 mm x 0,1 μm [14]. Na ogół obie kolumny połączone ze sobą za pomocą modulatora są zainstalowane w jednym piecu chromatograficznym, jednak zdarzają się rozwiązania konstrukcyjne, w których każda kolumna umieszczona jest w osobnym piecu, co pozwala w sposób bardziej elastyczny regulować temperaturę dla każdego wymiaru analizy. Jednak jest to rozwiązanie w znacznym stopniu komplikujące konstrukcję całego systemu. Ogólny schemat przykładowego rozwiązania przedstawiono na rycinie 1. Zgodnie ze schematem, próbka po wprowadzeniu do systemu poprzez dozownik ulega rozdzielaniu w pierwszym wymiarze. Następnie poszczególne frakcje kierowane są do modulatora, który gromadzi je przez określony, krótki czas, po którym zostają one naniesione na drugą kolumnę, gdzie ulegają rozdzielaniu. Dzięki takiemu zabiegowi możliwe jest rozdzielanie analitów, które koeluowały

ze sobą w pierwszym etapie analizy. Anality opuszczające kolumnę drugą kierowane są do detektora, rejestrującego sekwencje krótkich chromatogramów, powstałych w wyniku rozdzielania drugowymiarowego. W momencie nastrzyku na drugą kolumnę, kolejne frakcje, które uległy rozdzielaniu na kolumnie pierwszej, gromadzą się w modulatorze i cały proces zostaje powtórzony aż do zakończenia całej analizy [25].



Ryc. 1. Schemat systemu do wielowymiarowej chromatografii gazowej (GCxGC): a – dozownik, b – kolumna do rozdzielania w pierwszym wymiarze, c – łącznik, d – modulator, e – kolumna do rozdzielania w drugim wymiarze, f – detektor, g – piec chromatograficzny (opcjonalnie wspólny dla obu kolumn, bądź oddzielny dla każdej kolumny) [26]

Rycina 2 przedstawia wynik rozdzielania pików chromatograficznych, które w wymiarze pierwszym koeluowały ze sobą. Rycina 2 a pokazuje rozdział techniką *heart-cutting*, gdzie rozdzielaniu w dwóch wymiarach poddawana jest jedynie niewielka porcja analitów, które opuściły kolumnę po rozdziale w wymiarze pierwszym. Chromatogramy 2 b obrazują dwa razy więcej frakcji poddanych rozdzielaniu dwuwymiarowemu (podwójna analiza *heart-cutting*), jednak czas analizy analitów w drugim wymiarze uległ znacznemu skróceniu. Zmniejszenie czasu analizy w tym przypadku zapobiega koelucji analitów pochodzących z różnych frakcji, która mogłaby nastąpić w modulatorze, gdyby frakcje odpowiednio szybko go nie opuszczały. Odpowiednio zwiększając częstotliwość dozowania frakcji oraz skracając czas analizy w drugim wymiarze można poddać kompleksowej analizie dwuwymiarowej wszystkie anality zawarte w próbce (rys. 2 c). W tym wypadku mamy do czynienia z całościową analizą dwuwymiarową (GCxGC).



Ryc. 2. Schemat obrazujący zasadę wielowymiarowej chromatografii gazowej:
a – analiza *heart-cutting* GC, b – podwójna analiza *heart-cutting* GC,
c – kompleksowa analiza dwuwymiarowa GC [26]

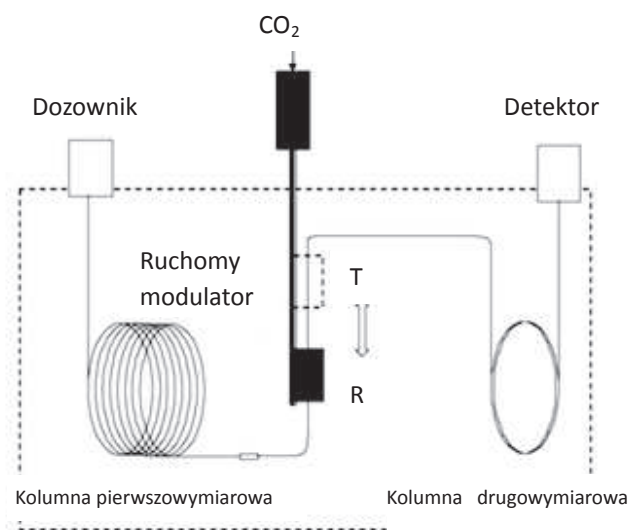
3. Modulatory w technice GCxGC

W każdej technice wielowymiarowej interfejs, stanowiący połączenie pomiędzy dwoma wymiarami, odgrywa fundamentalną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu całego systemu. W systemach wielowymiarowej chromatografii gazowej rolę takiego interfejsu pełni tzw. modulator. Na przestrzeni ewolucji techniki GCxGC największą uwagę poświęcono rozwojowi solidnego i przyjaznego użytkownikowi modulatora, który mógłby znaleźć swoje zastosowanie na wielu różnych polach aplikacyjnych. Z uwagi na zasadę działania wyróżnia się modulatory termiczne oraz zaworowe. Modulacja termiczna, ciesząca się znacznie większą popularnością i użytecznością, może wykorzystywać zarówno podwyższoną temperaturę (tzw. modulatory z ogrzewaniem), jak i obniżoną temperaturę (tzw. modulatory kriogeniczne). Niezależnie od swojej konstrukcji modulator musi pełnić trzy funkcje: 1) w sposób ciągły gromadzić małej objętości frakcje, wpływające z kolumny w pierwszym wymiarze analizy; 2) dostosować czas przetrzymywania zgromadzonych frakcji oraz częstotliwość ich dozowania, tak aby zapobiec

ich ponownemu połączeniu się; 3) wprowadzić zgromadzone frakcje do kolumny celem poddania ich analizie w drugim wymiarze [27].

Pierwszy modulator opracowano w 1991 r. [28]. Stanowił go odcinek kapilarnej kolumny, pomalowanej farbą zawierającą złoto z grubą warstwą filmu fazy stacjonarnej. Metal na powierzchni kapilary zapewniał przewodzenie prądu. Anality eluujące z pierwszej kolumny, napotykając na gruby film fazy stacjonarnej, spowalniały swoją migrację, przez co zawężały pasma chromatograficzne. Wskutek działania prądu elektrycznego przepuszczanego przez warstwę złota modulator wraz z zawartymi w nim analitami zostawał natychmiastowo ogrzewany w regularnych odstępach czasu. Wówczas anality ulegały desorpcji z kolumny pierwszej i w postaci wąskiego pasma migrowały do kolumny drugiej. Kiedy kapilara ostygła, mogła przyjąć kolejną frakcję analitów opuszczających pierwszą kolumnę. Istotną wadą tego rozwiązania był długi czas stygnięcia modulatora, podczas którego anality zanalizowane w wymiarze pierwszym niemal natychmiast trafiały na drugą kolumnę, co znacznie poszerzało ich pasma chromatograficzne. Na przestrzeni lat modyfikowano i udoskonalano konstrukcje modulatorów. Aby wyeliminować problem związany z czasem chłodzenia, wprowadzono dwa modulatory działające naprzemiennie. Kolejnym rozwiązaniem był obrotowy modulator termiczny tzw. zamiatarka [29]. Jednak istotnym minusem jego użytkowania stanowiły awarie ruchomych części modulatora. Poza tym zastosowany mechanizm zatrzymywania analitów, jakim była sorpcja w filmie fazy stacjonarnej w temperaturze pieca, ograniczała obszar zastosowania metody jedynie do związków trudno lotnych. Opracowano zatem modulator, którego istota działania polegała na zastosowaniu dwóch, połączonych ze sobą mikropułapek wypełnionych porowatym sorbentem. Desorpcja zatrzymanych w pierwszej kolumnie analitów polegała na podgrzewaniu pułapek umieszczonych w modulatorze poprzez przepuszczenie przez nie impulsów prądu elektrycznego. Sorbent wykazywał znaczną pojemność sorpcyjną, przez co znacznie efektywniej zatrzymywał lotne anality. W roku 1998 opracowano i zastosowano pierwszy modulator kriogeniczny, tzw. LMCS (ang. *Longitudinally Modulated Cryogenic System* – wzdłużnie modulowany system kriogeniczny), cieszący się dużą popularnością [30–32]. W rozwiązaniu tym zastosowano ciekły CO₂ jako czynnik chłodzący wypełniający ruchomą chłodnicę, która ochładzając odpowiednie odcinki kolumn powodowała zatrzymywanie analitów na cienkim filmie fazy stacjonarnej. Przesunięcie chłodnicy powoduje wzrost temperatury, co skutkuje desorpcją analitów do kolumny odpowiedzialnej za rozdzielenie w drugim wymiarze (ryc. 3). Zastosowanie takiej konstrukcji modulatora poszerzyło znacznie zakres stosowalności techniki, gdyż dzięki zachodzeniu desorpcji analitów w temperaturze pieca (nie powyżej tej temperatury, jak miało to miejsce w przypadku modulatorów starszych typów) możliwe stało się stosowanie wyższych temperatur końcowych w analizie. Podstawową wadą takiej konstrukcji

modulatora było zastosowanie temperatury – 50°C, która nie jest wystarczająca do zatrzymania analitów o wysokiej lotności, skutkiem czego pasma tych związków charakteryzują się znacznym rozmyciem.



Ryc. 3. Schemat budowy wzdłużnie modulowanego systemu kriogenicznego (LMCS). Frakcja analitu poddana rozdzielaniu w pierwszym wymiarze trafia do strefy chłodzonej (pozycja „T”), przez co zostaje zatrzymana, a jej pasma ulegają zwięźnieniu. Kiedy chłodnica przesuwa się na pozycję „R”, pasmo to zostanie uwolnione do kolumny przeprowadzającej analizę w drugim wymiarze. Takie umiejscowienie chłodnicy zapobiega też zbyt szybkiemu przedostawaniu się kolejnych pasm na kolumnę odpowiedzialną za rozdzielanie w wymiarze drugim [14]

W późniejszym czasie budowa modulatorów uległa dalszej modyfikacji. Zastosowano dwie dysze rozpylające ciekły CO₂ [33], kolejno zredukowano ilość dysz do jednej, a następnie wdrożono ciekły azot jako czynnik chłodzący [34], co jednak znacznie podwyższyło koszty analizy. Wprowadzono też pułapki wykonane z dezaktywowanej stali nierdzewnej [35]. Zmianie uległ również mechanizm zatrzymywania analitów, który bazował na ich wymrażaniu, dzięki czemu udało się analizować nawet najbardziej lotne związki oraz skrupulatnie regulować czas dozowania poszczególnych frakcji na kolumnę przeprowadzającą analizę w drugim wymiarze.

Obok modulatorów termicznych w technice dwuwymiarowej chromatografii gazowej wykorzystuje się, mniej rozpowszechnione z uwagi na niewielką czułość, modulatory zaworowe. Pierwszy modulator tej konstrukcji został zaprojektowany w 1998 r. [36]. Zasada działania takiego rozwiązania opiera się na wykorzystaniu zaworu membranowego, którego przełączenie w odpowiednią pozycję

powoduje skierowanie nieznacznej części próbki z pierwszej kolumny na kolumnę w drugim wymiarze. Następnie zawór jest przełączany w pozycję pierwotną i cały cykl powtarza się w regularnych odstępach czasu, aż do momentu zakończenia analizy [37]. Istotną wadą modulatorów zaworowych jest znaczna utrata czułości w porównaniu z czułością modulatorów termicznych. Wynika to z faktu, że w tym przypadku analizie poddawana jest jedynie niewielka część próbki (między 10 a 20%).

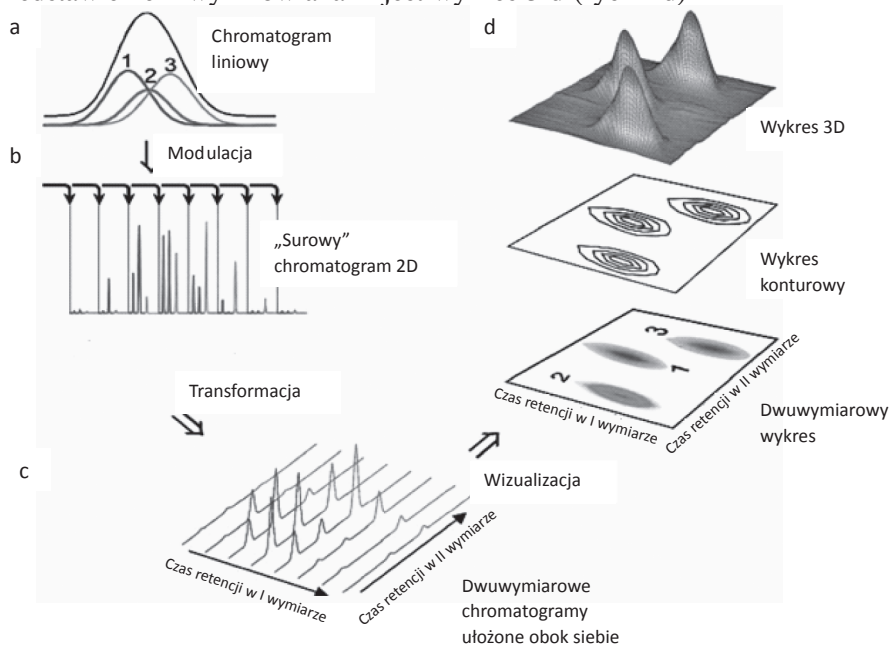
W literaturze naukowej opisanych jest wiele rodzajów modulatorów [38–40]. Wybór najodpowiedniejszego zależy od obszaru jego zastosowania. Przykładowo, chcąc analizować wysokowrzące frakcje ropy naftowej korzystniej i ekonomiczniej jest zastosować modulator kriogeniczny chłodzony ciekłym CO₂. Rozwiązanie to nie sprawdzi się w analizie związków o dużej lotności. W tym przypadku najlepsze efekty można osiągnąć korzystając z modulatorów zaworowych lub kriogenicznych chłodzonych ciekłym azotem.

4. Interpretacja chromatogramów GCxGC

Wszystkie anality zawarte w mieszaninie próbki migrują w obu kolumnach, czego rezultatem jest otrzymanie wyników w postaci dwuwymiarowej. Każdy analyt tworzy pik na dwuwymiarowej płaszczyźnie w miejscu określonym przez oddziaływanie analitów z obiema fazami stacjonarnymi. Przykładowo, połączenie dwóch zupełnie niezależnych kolumn, z których pierwsza posiada niepolarnie wypełnienie, a wypełnienie kolumny drugiej charakteryzuje się znaczną polarnością, skutkuje otrzymaniem dwóch różnych czasów retencji. Czas retencji w pierwszym wymiarze opisuje oś X, natomiast oś Y definiuje czas retencji w wymiarze drugim. Jednakże przedstawienie wyników w takiej formie nie wnosi żadnych danych na temat wielkości pól powierzchni analizowanych pików. W związku z tym otrzymane chromatogramy przedstawia się w postaci trójwymiarowej, gdzie oś Z jest charakteryzowana przez wysokość pików. Wysokość ta oznaczana jest odpowiednim kolorem, w sposób analogiczny do prezentacji danych na mapach geograficznych.

Na rycinie 4 przedstawiono cały proces analizy GCxGC z uwzględnieniem kluczowych etapów wpływających na końcową postać chromatogramu. W pierwszej kolejności następuje rozdzielanie analitów w pierwszym wymiarze (ryc. 4 a). W wyniku modulacji zbierane są serie chromatogramów, powstałych wskutek rozdzielania analitów w drugim wymiarze (4 b). Na rycinie 4 c zestawione zostały dwuwymiarowe chromatogramy ułożone obok siebie, gdzie poszczególne osie oznaczają czasy retencji analitów w pierwszej i drugiej kolumnie. Po zastosowaniu odpowiedniej wizualizacji piki mogą zostać przedstawione w postaci wykresów dwuwymiarowych, w których intensywność sygnału wyrażona jest przy użyciu koloru (bądź cieniowania) lub zastosowaniu linii łączących punkty

o takiej samej intensywności pików, tzw. warstwicy. Innym najbardziej czytelnym przedstawieniem wyników analiz jest wykres 3 d (ryc. 4 d).



Ryc. 4. Schemat analizy GCxGC ze szczególnym uwzględnieniem etapu wizualizacji danych [16]

Dzięki analizie związków metodą dwuwymiarowej chromatografii gazowej możliwe jest uzyskanie dwuwymiarowych chromatogramów o wysoce uporządkowanej naturze, co pozwala na przyporządkowanie nieznanego pików do określonej grupy związków, tylko na podstawie jego położenia na dwuwymiarowej płaszczyźnie czasów retencji.

5. Obszary zastosowań GCxGC

Zastosowanie systemu GCxGC pozwoliło na znaczne zwiększenie czułości, pojemności pikowej układu i zdecydowane polepszenie rozdzielania analitów. Zalety te powodują, że technika dwuwymiarowej chromatografii gazowej znajduje zastosowanie w wielu obszarach analitycznych, takich jak analiza środowiskowa, analiza żywności czy kryminalistyka. W początkowym etapie kształtowania się tej techniki miała ona służyć głównie oznaczaniu substancji ropopochodnych. Dlatego też w literaturze naukowej obszernie opisane jest wykorzystanie GCxGC pod kątem oznaczania tych substancji [41–49]. W pracy [50] wykorzystano technikę dwuwymiarowej chromatografii gazowej detektora che-

miluminescencji azotu do rozdzielenia związków zawierających azot w ciężkich frakcjach ropy naftowej. Poszerzenie wiedzy w zakresie tych substancji odgrywa ważną rolę w przemyśle naftowym, z uwagi na możliwość zanieczyszczenia atmosfery produktami spalania ropy naftowej oraz wprowadzania nowych metod usuwania zanieczyszczeń z produktów naftowych. Dzięki uporządkowanej naturze chromatogramów oraz wysokiej zdolności rozdzielczej techniki GCxGC oraz zastosowaniu detektora chemiluminescencji azotu (NCD) możliwe stało się oznaczenie tych składników, nawet w tak skomplikowanej mieszaninie jak ropa naftowa. Rezultatu takiego nie udało się osiągnąć tradycyjną jednowymiarową techniką chromatografii gazowej.

Zwiększona zdolność rozdzielcza oraz duża czułość, pozwalająca na znaczne obniżenie poziomu wykrywalności analitów, jakie zapewnia technika GCxGC, jest istotną zaletą, dzięki której zakres zastosowań tej techniki obejmuje również szeroko pojętą analizę produktów żywnościowych [51–53]. Badania takie przeprowadza się m.in. w celu wykrycia, bądź ilościowego oznaczania śladowych składników lub zanieczyszczeń, takich jak szkodliwe pestycydy, charakteryzujące się znaczną trwałością w środowisku oraz zdolnością kumulowania się w tkankach tłuszczowych, przez co objawy zatrucia tymi związkami mogą ujawnić się nawet po kilku latach. W pracy [54] przeprowadzono wyniki badań zawartości pozostałości pestycydów w ekstrakcie z zielonej herbaty. Do analizy wykorzystano technikę dwuwymiarowej chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-TOFMS), stosując ekstrakcję ruchomym elementem sorpcyjnym (SBSE) jako metodę przygotowania próbki. Dzięki wykorzystaniu modulacji, piki chromatograficzne otrzymane w wyniku rozdzielania składników obecnych w ekstrakcie z zielonej herbaty są znacznie węższe, co wpływa istotnie na obniżenie granicy wykrywalności oznaczanych substancji. Stosując metodę SBSE-GCxGC-TOFMS w ekstrakcie z zielonej herbaty wykryto ponad 1200 związków chemicznych, podczas gdy wykorzystując technikę metodę SBSE-GC-TOFMS udało się oznaczyć w sumie ponad 550 różnych substancji. Substancje, które w przypadku układu jednowymiarowej chromatografii gazowej koeluowały, przy zastosowaniu systemu GCxGC zostały dobrze rozdzielone.

Literatura

- [1] M a r t i n A.J., *The principles of chromatography*, „Endeavour” 1947, Vol. 6, s. 21–28.
- [2] R o b i n s o n F.A., *Recent developments in chromatography*, „The Pharmaceutical Journal” 1947, Vol. 104, s. 46–48.
- [3] U r b a c h K.F., G i s c a f r e L., *Identification of histamine in blood by paper chromatography*, „Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine” 1948, Vol. 68, s. 430.
- [4] S m i t W.M., *Chromatography of petroleum hydrocarbons*, „Discussions of the Faraday Society” 1949, Vol. 7, s. 248–255.

- [5] Fisher R.B., Parsons D.S., Holmes R., *Quantitative paper chromatography*, „Nature” 1949, Vol. 164, s. 183.
- [6] Tswett M.S., *Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen*, „Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft” 1906, Vol. 24, s. 316–332.
- [7] Adamska K., Bielicka-Daszkiewicz K., Milczewska K., Rogalewicz R., Strzemińska B., Voelket A., *Zastosowanie metod chromatograficznych*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 2005.
- [8] Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [9] Matisová E., Dömötörövá M., *Fast gas chromatography and its use in trace analysis*, „Journal of Chromatography A” 2003, Vol. 1000, s. 199–221.
- [10] Cardenia V., Rodriguez-Estrada M.T., Baldacci E., Savioli S., Lercker G., *Analysis of cholesterol oxidation products by fast gas chromatography/mass spectrometry*, „Journal of Separation Science” 2012, Vol. 35, s. 424–430.
- [11] Jiang Y., Ni Y., Zhu H., Zhu C., *Using fast gas chromatography-mass spectrometry with auto-headspace solid-phase microextraction to determine ultra trace residues of organophosphorus pesticides in fruits*, „Journal of Chromatographic Science” 2011, Vol. 49, s. 353–360.
- [12] Muñoz-Guerra J.A., Prado P., García-Tenorio S.V., *Use of hydrogen as a carrier gas for the analysis of steroids with anabolic activity by gas chromatography-mass spectrometry*, „Journal of Chromatography A” 2011, Vol. 1218, s. 7365–7370.
- [13] Kirchner M., Matisová E., Dömötörövá M., De Zeeuw J., *Practical aspects of splitless injection of semivolatiles in fast gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2004, Vol. 1055, s. 159–168.
- [14] Adahchour M., Beens J., Brinkman U.A.Th., *Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2008, Vol. 1186, s. 67–108.
- [15] Zakaria M., Gonnord M.-F., Guiochon G., *Applications of two-dimensional thin-layer chromatography*, „Journal of Chromatography” 1983, Vol. 271, s. 127.
- [16] Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J., Brinkman U.A.Th., *Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). 1: Introduction and instrumental set-up*, „Trends in Analytical Chemistry” 2006, Vol. 25, s. 438–454.
- [17] http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka_polska/Rozdzialy/rozdzial_012.pdf (4.05.2013).
- [18] Seeley J.V., *Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2012, Vol. 1255, s. 24–37.
- [19] Gómara B., Bordajandi L.R., González M.J., *Feasibility of two multidimensional techniques, heart-cut MDGC and GCxGC, for the separation of PCBs and PBDEs*, „Journal of Separation Science” 2007, Vol. 30, s. 1920.
- [20] Marriott P.J., Haglund P., Ong R.C.Y., *A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC*, „Clinica Chimica Acta” 2003, Vol. 328, s. 1–19.

- [21] Biedermann M., Grob K., *On-line coupled high performance liquid chromatography – gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: Method of analysis*, „Journal of Chromatography A” 2012, Vol. 1255, s. 56–75.
- [22] Bertsch W., *Two-dimensional gas chromatography. Concepts, instrumentation, and applications. Part 2: Comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of High Resolution Chromatography” 2000, Vol. 23, s. 167–181.
- [23] Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L., *Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis*, „Journal of Chromatography A” 2004, Vol. 1054, s. 3–16.
- [24] Khummeng W., Morrison P., Marriott P.J., *Dual NPD/ECD detection in comprehensive two-dimensional gas chromatography for multiclass pesticide analysis*, „Journal of Separation Science” 2008, Vol. 31, s. 3404–3415.
- [25] Marriott P.J., Shellie R., *Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Trends in Analytical Chemistry” 2002, Vol. 21, s. 573–583.
- [26] Górecki T., Harynuk J., Panić O., *The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC)*, „Journal of Separation Science” 2004, Vol. 27, s. 359–379.
- [27] Dallüge J., Beens J., Brinkman U.A.Th., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool*, „Journal of Chromatography A” 2003, Vol. 1000, s. 69–108.
- [28] Phillips J.B., Liu Z., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface*, „Journal of Chromatographic Science” 1991, Vol. 29, s. 227–231.
- [29] Phillips J.B., Gaines R.B., Blomberg J., Van Der Wielen F.W.M., Dimandja J.-M., Green V., Granger J., Patterson D., Racovalis L., de Geus H.-J., de Boer J., Haglund P., Lipsky J., Sinha V., Ledford E.B. Jr., *A robust thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of High Resolution Chromatography” 1999, Vol. 22, s. 3–10.
- [30] Kinghorn R.M., Marriott P.J., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a modulating cryogenic trap*, „Journal of High Resolution Chromatography” 1998, Vol. 21, s. 620–622.
- [31] Kinghorn R.M., Marriott P.J., Dawes P.A., *Longitudinal modulation studies for augmentation of injection and detection in capillary gas chromatography*, „Journal of Microcolumn Separations” 1998, Vol. 10, s. 611–616.
- [32] Marriott P.J., Kinghorn R.M., *Modulation and manipulation of gas chromatographic bands by using novel thermal means*, „Analytical Sciences” 1998, Vol. 14, s. 651–659.
- [33] Beens J., Adahchour M., Vreuls R.J.J., van Altena K., Brinkman U.A.Th., *Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2001, Vol. 919, s. 127–132.
- [34] Harynuk J., Górecki T., *New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2003, Vol. 1019, s. 53–63.
- [35] Harynuk J., Górecki T., *Design considerations for a GCxGC system*, „Journal of Separation Science” 2002, Vol. 25, s. 304–310.

- [36] Bruckner C.A., Prazen B.J., Synovec R.E., *Comprehensive two-dimensional high-speed gas chromatography with chemometric analysis*, „Analytical Chemistry” 1998, Vol. 70, s. 2796–2804.
- [37] Seeley J.V., Kramp F., Hicks C.J., *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography via Differential Flow Modulation*, „Analytical Chemistry” 2000, Vol. 72, s. 4346–4352.
- [38] Kristensona E.M., Korytára P., Danielsson C., Kalliod M., Brandta M., Mäkeläa J., Vreulsa R.J.J., Beens J., Brinkman U.A.Th., *Evaluation of modulators and electron-capture detectors for comprehensive two-dimensional GC of halogenated organic compounds for comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2003, Vol. 1019, s. 65–77.
- [39] Begnaud F., Debonneville C., Probst J.-P., Chaintreau A., Morrison P.D., Adcock J.L., Marriott P.J., *Effects of variation in modulator temperature during cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Separation Science” 2009, Vol. 32, s. 3144–3151.
- [40] Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J., Brinkman U.A.Th., *Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). 2: Modulation and detection*, „Trends in Analytical Chemistry” 2006, Vol. 25, s. 540–553.
- [41] Gaines R., Frysiner G.S., *Oil spill source identification by comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Environmental Science and Technology” 1999, Vol. 33, s. 2106–2112.
- [42] Frysiner G.S., Gaines R.B., Xu L., Reddy C.M., *Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments*, „Environmental Science and Technology” 2003, Vol. 37, s. 1653–1662.
- [43] Frysiner G.S., Gaines R.B., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection (GCxGC/MS) Applied to the Analysis of Petroleum*, „Journal of High Resolution Chromatography” 1999, Vol. 22, s. 251–255.
- [44] Schoenmakers P.J., Oomena J.L.M.M., Blomberg J., Genuit W., van Velzen G., *Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures*, „Journal of Chromatography A” 2000, Vol. 892, s. 29–46.
- [45] Frysiner G.S., Gaines R.B., *Quantitative determination of BTEX and total aromatic compounds in gasoline by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC)*, „Journal of High Resolution Chromatography” 1999, Vol. 22, s. 195–200.
- [46] Beens J., Blomberg J., Schoenmakers P.J., *Proper tuning of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC6xGC) to optimize the separation of complex oil fractions*, „Journal of High Resolution Chromatography” 2000, Vol. 23, s. 182–188.
- [47] Frysiner G.S., Gaines R.B., *Separation and identification of petroleum biomarkers by comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Separation Science” 2001, Vol. 24, s. 87–96.
- [48] Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J., Brinkman U.A.Th., *Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). 3: Applications for petrochemicals and organohalogenes*, „Trends in Analytical Chemistry” 2006, Vol. 25, s. 726–741.

- [49] Marriott P.J., Chin S.-T., Maikhunthod B., Schmarr H.-G., Bieri S., *Multidimensional gas chromatography*, „Trends in Analytical Chemistry” 2012, Vol. 34, s. 1–21.
- [50] Dutriez T., Borrás J., Courtiade M., Thiébaud D., Dulot H., Bertoncini F., Hennion M.-C., *Challenge in the speciation of nitrogen-containing compounds in heavy petroleum fractions by high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Chromatography A” 2011, Vol. 1218, s. 3190–3199.
- [51] Cordero C., Bicchi C., Rubiolo P., *Group-type and fingerprint analysis of roasted food matrices (coffee and hazelnut samples) by comprehensive two-dimensional gas chromatography*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 2008, Vol. 56, s. 7655–7666.
- [52] Adahchour M., Beens J., Vreuls R.J.J., Batenburg A.M., Brinkman U.A.Th., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography of complex samples by using a ‘reversed-type’ column combination: application to food analysis*, „Journal of Chromatography A” 2004, Vol. 1054, s. 47–55.
- [53] Adahchour M., van Stee L.L.P., Beens J., Vreuls R.J.J., Batenburg A.M., Brinkman U.A.Th., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the trace analysis of flavour compounds in food*, „Journal of Chromatography A” 2003, Vol. 1019, s. 157–172.
- [54] Heim J., Libardoni M., Ochiai N., Sasamoto K., *Organophosphorus pesticides analysis by SBSE-GC-TOFMS and SBSE-GCxGC-TOFMS*, LECO Application Notes No. 203-821-343, 4/08-REV0, 2008, <http://www.leco.com/component/edocman/?task=document.viewdoc&id=883&Itemid=0> (30.04.2013).

DARIA GAŚSIOR

TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY
– TECHNIQUE DEVELOPMENT OVER THE YEARS

Keywords: two-dimensional gas chromatography, chromatographic methods, modulation, high resolution, heart-cutting.

Two-dimensional gas chromatography is rapidly developing analytical technique, which is characterized by an increased resolving ability and higher sensitivity compared to standard technique of one-dimensional gas chromatography, which allows for a significant reduction in the limit of detection of analytes. This technique is ideally suited for the analysis of complicated samples with complex composition. The paper characterizes the principle of functioning of the two-dimensional gas chromatography, with particular emphasis on the construction of modulators, which are the essence of the system. Presentation of the results and the step of visualization were explained. Two-dimensional gas chromatography technique is increasingly popular, inter alia, in the petroleum products analysis, environmental analysis for the determination toxic compounds to the organisms, in the food products analysis and in the criminology. The article presents some examples of application of the technique.