

ROZDZIAŁ 12

KOMPLETNA DWUWYMIAROWA CHROMATOGRAFIA GAZOWA (GC X GC)

Tadeusz Górecki, James Harynuk i Ognjen Panić
Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, N2L 3G1 Kanada

STRESZCZENIE

Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GC x GC) jest jedną z najbardziej wszechstronnych technik oznaczania związków organicznych w próbkach o złożonym składzie. W przypadku tej techniki, anality zawarte w fazie ruchomej opuszczającej kolumnę chromatograficzną są w sposób ciągły zbierane i okresowo dozowane do drugiej kolumny, której faza stacjonarna charakteryzuje się inną selektywnością. Proces ten powtarzany jest z częstotliwością wystarczającą do tego, aby każdy pik chromatograficzny był próbkowany przynajmniej trzy razy. Pozwala to na zachowanie separacji pików osiągniętej w pierwszej kolumnie, zapewniając jednocześnie dodatkowe rozdzielanie analitów w drugiej kolumnie. Sercem każdego systemu do GC x GC jest modulator, który fizycznie łączy obie kolumny i umożliwia okresowe zbieranie/dozowanie analitów do drugiej kolumny. Surowe dane otrzymane w wyniku zastosowania techniki GC x GC muszą być przetworzone z postaci liniowej na dwuwymiarową przy pomocy odpowiedniego oprogramowania. Dwuwymiarowa chromatografia gazowa znajduje zastosowania w wielu dziedzinach, np. w analizie produktów ropopochodnych, analizie środowiskowej, kryminalistyce, w badaniach z zakresu chemii atmosfery, itp.

1. WSTĘP

Chromatografia jest techniką używaną do rozdzielania złożonych mieszanin związków chemicznych celem identyfikacji i/lub ilościowej analizy poszczególnych składników próbki. Chromatografia gazowa (GC) zajmuje szczególne miejsce wśród technik chromatograficznych dzięki dużej zdolności rozdzielczej, elastyczności, różnorodnym zastosowaniom i względnej prostocie. Pomimo tych zalet, GC często zawodzi przy analizie bardzo skomplikowanych próbek. Powodem tego jest ograniczona pojemność pików (ilość pików chromatograficznych, które mogą być całkowicie rozdzielone przy użyciu danej kolumny chromatograficznej). W czasie migracji w kolumnie, pasma chromatograficzne ulegają poszerzeniu i ich szerokość na wylocie z kolumny nie jest równa zero, nawet jeśli pasmo dozowania jest nieskończenie wąskie. Skutkiem tego ilość pasm, które mogą być całkowicie rozdzielone na wylocie kolumny, jest ograniczona. Ograniczenia tego nie da się uniknąć poprzez modyfikację parametrów chromatograficznych. Jedynym skutecznym rozwiązaniem jest poddanie składników częściowo rozdzielonych w kolumnie chromatograficznej dodatkowemu rozdzielaniu na bazie innego mechanizmu, czego wynikiem jest rozdzielanie dwuwymiarowe.

Idea poddawania składników próbki rozdzielaniu przy pomocy różnych mechanizmów celem zwiększenia zdolności rozdzielczej była po raz pierwszy dyskutowana w roku 1984 [1]. W opublikowanej wtedy pracy przedstawiono podstawowe kryteria pozwalające na zdefiniowanie wymiarów rozdzielania i wyjaśniono, jak najlepiej połączyć dwa wymiary rozdzielania w celu uzyskania techniki wielowymiarowej. W przypadku analiz nieciągłych, gdzie cała próbka może być najpierw poddana rozdzielaniu w jednym wymiarze, a następnie w drugim wymiarze, najlepsze wyniki uzyskuje się, kiedy mechanizmy rozdzielania w obu

wymiarach są całkowicie od siebie niezależne. Należy jednak wziąć pod uwagę, że mechanizmy rozdzielania w obu wymiarach mogą być skorelowane ze sobą dla związków należących do tej samej klasy chemicznej, czego wynikiem jest układanie się pasm tych związków wzdłuż ukośnych linii na dwuwymiarowym chromatogramie [1]. Większość czytelników tej książki zapewne zna przykłady technik dwuwymiarowych, takich jak dwuwymiarowa chromatografia cienkowsarstwowa (2D-TLC) czy elektroforeza na żelu poliakryloamidowym (polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE).

Jeszcze do niedawna rozdzielanie w dwóch wymiarach w chromatografii gazowej możliwe było tylko dla określonych frakcji próbki. Mała porcja próbki opuszczającej pierwszą (I) kolumnę chromatograficzną była zbierana w pętli dozującej i dozowana do drugiej (II) kolumny chromatograficznej z inną fazą stacjonarną. Podczas gdy technika ta umożliwiała rozwiązanie wielu problemów (np. oznaczanie związków tlenowych w benzynie), nie spełniała ona jednak wymagań kompletnej analizy dwuwymiarowej, warunkiem której jest rozdzielanie wszystkich składników próbki w obu wymiarach. Konieczne jest przy tym, aby związki rozdzielone w jednym wymiarze pozostawały rozdzielone po przejściu przez następny wymiar (lub wymiary).

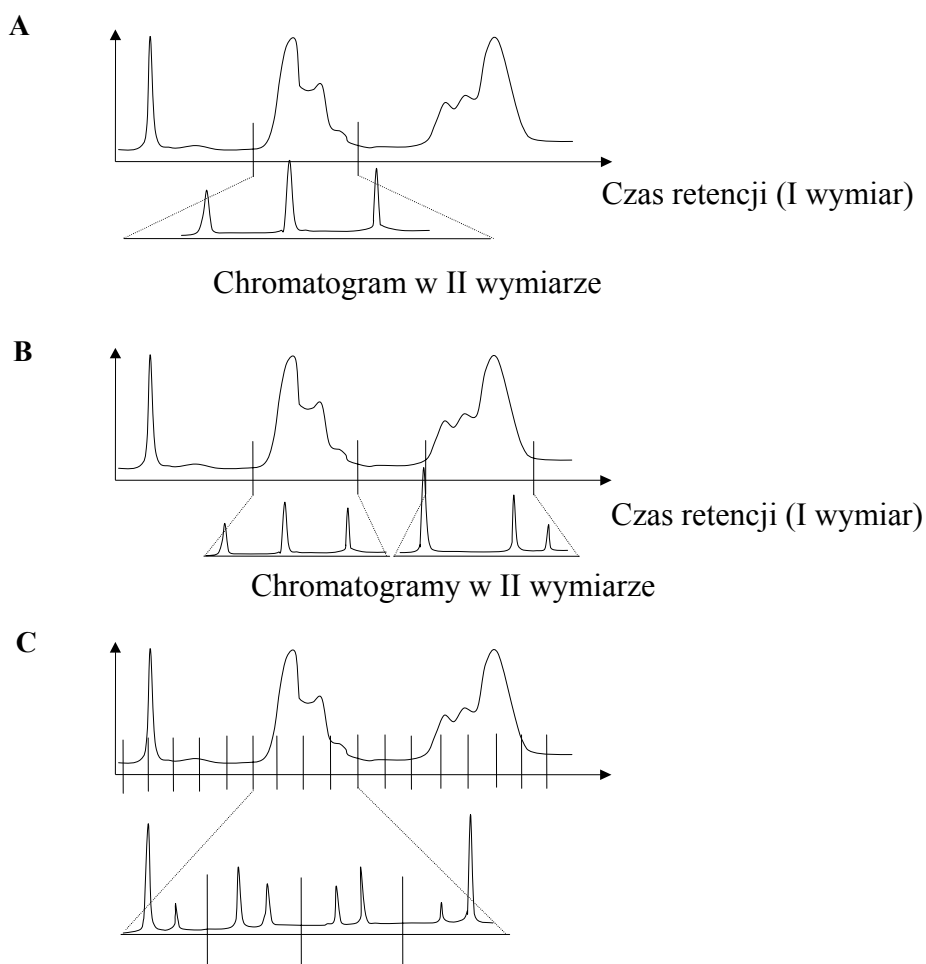
Kompletna analiza dwuwymiarowa analogiczna do 2D-TLC byłaby idealnym rozwiązaniem problemu ograniczonej pojemności pików i zdolności rozdzielczej w chromatografii gazowej. Wcielenie tej idei w życie było jednak początkowo bardzo trudne. W przypadku 2D-TLC, analiza dwuwymiarowa jest bardzo prosta do praktycznej realizacji. Chromatogram na płytce rozwijany jest w jednym kierunku, po czym płytka jest suszona, obracana o 90° i rozwijana w drugim kierunku przy użyciu fazy ruchomej o innej selektywności. Takie podejście jest z oczywistych względów niepraktyczne w przypadku GC. Konieczne jest w tym przypadku znalezienie sposobu na to, aby cała próbka mogła być poddana rozdzielaniu w jednej kolumnie, a następnie przeniesiona do drugiej kolumny o innej selektywności z zachowaniem rozdzielania uzyskanego w kolumnie I. Nie da się tego osiągnąć poprzez szeregowe połączenie dwóch różnych kolumn, gdyż taka konfiguracja nie gwarantuje zachowania rozdzielania z wymiaru I. Pierwsze praktyczne rozwiązanie problemu kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej zostało zaproponowane w 1991 [2]. Data ta jest uznawana za narodziny techniki GC x GC. Postęp prac w tej dziedzinie podsumowywany był w szeregu prac przeglądowych opublikowanych w literaturze (np. [3], [4], [5], [6]). Ostatnio ukazała się też praca poświęcona nomenklaturze z zakresu techniki wielowymiarowej chromatografii [7]. Niniejszy rozdział został opracowany w oparciu o jedną z najświeższych prac przeglądowych [8].

2. PODSTAWY TECHNIKI GC X GC

W prawdziwie wielowymiarowej metodzie mechanizmy rozdzielania w obu wymiarach powinny być od siebie całkowicie niezależne, czyli ortogonalne [5]. W przypadku techniki GC x GC oznacza to, że kolumny chromatograficzne używane w obu wymiarach powinny charakteryzować się różnymi mechanizmami retencji. Technika GC x GC jest w istocie rozwinięciem klasycznej idei dwuwymiarowej analizy frakcji w GC. W przypadku tej techniki (rys. 1a) spełniony jest warunek ortogonalności, gdyż do analizy używa się dwóch kolumn o innej selektywności, jednak rozdzielaniu w dwóch wymiarach poddawana jest jedynie bardzo niewielka porcja próbki opuszczającej I kolumnę. Schemat na rysunku 1b ilustruje, że możliwości tej metody można zwiększyć poprzez poddanie rozdzielaniu w II kolumnie większej ilości frakcji z I kolumny. Oczywiście w takim przypadku odpowiedniemu skróceniu ulec musi czas

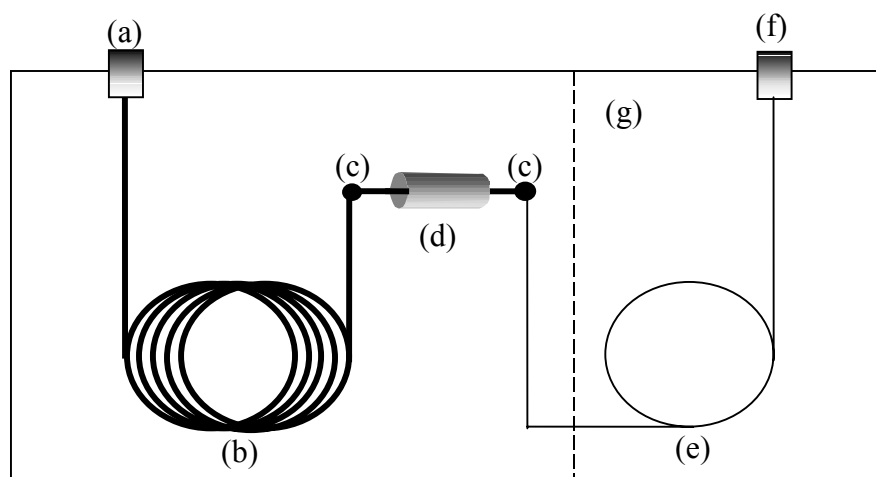
rozdzielania w II kolumnie, aby nie doszło do koelucji analitów pochodzących z różnych frakcji. Poprzez zwiększanie częstotliwości nasykiwania frakcji i odpowiednie skracanie czasu przeznaczanego na analizę w drugim wymiarze dochodzi się do krańcowego przypadku, w którym ilość frakcji jest wystarczająco duża, aby analizie dwuwymiarowej poddać całą próbkę (rys. 1C). Częstotliwość pobierania frakcji z I kolumny powinna być przy tym na tyle duża, aby nie doszło do ponownego połączenia pasm chromatograficznych opuszczających tę kolumnę. Po spełnieniu tego warunku technika ta jest zgodna z wymaganiami kompletnej metody wielowymiarowej. W podsumowaniu stwierdzić można więc, że technika GC x GC jest prostym rozwinięciem idei dwuwymiarowej analizy frakcji w GC, w której ilość frakcji jest na tyle duża, aby objąć cały chromatogram.

Układy rozdzielcze w przypadku techniki GC x GC muszą spełniać szereg podstawowych wymagań. Każdy taki system musi używać dwóch kolumn o własnościach ortogonalnych (różne mechanizmy retencji). Kolumny te muszą być połączone poprzez specjalny łącznik (modulator), który pozwala na zbieranie lub pobieranie frakcji z I kolumny i okresowe dozowanie tych frakcji do II kolumny z częstotliwością wystarczającą do tego, aby pasma rozdzielone w I kolumnie nie połączyły się ponownie w modulatorze. Na rysunku 2 przedstawiono schemat ideowy systemu do GC x GC.



Rys. 1. Zasada wielowymiarowej chromatografii gazowej. (A) pojedyncza frakcja zawierająca częściowo rozdzielone składniki z I kolumny jest dozowana do II kolumny, gdzie ulega dodatkowemu rozdzielaniu; (B) dwie frakcje materiału opuszczającego I kolumnę kierowane są po kolei do II kolumny; rozdzielanie składników jednej frakcji

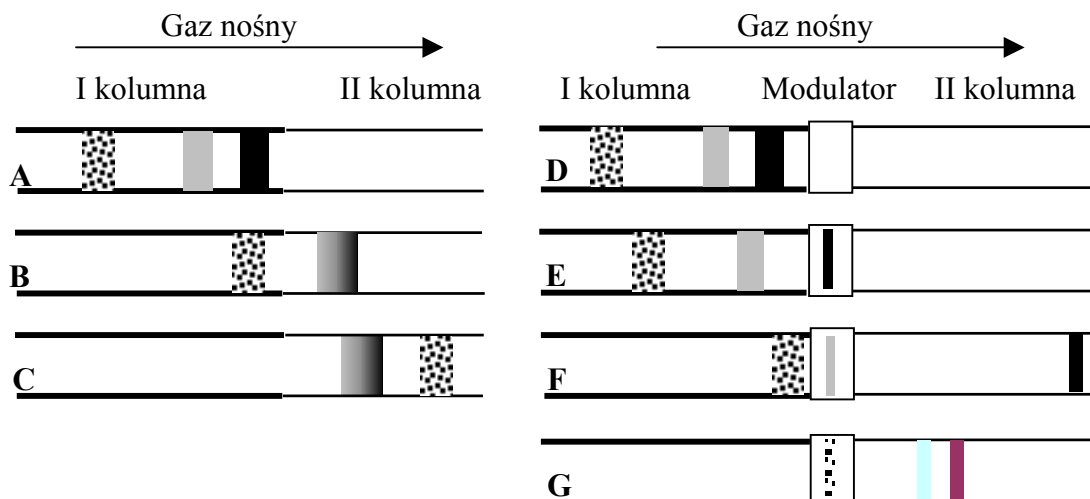
musi się zakończyć, zanim składniki następnej frakcji dotrą do detektora, tak więc czas analizy w II wymiarze musi być odpowiednio krótszy; (C) kompletna analiza dwuwymiarowa; frakcje są bardzo małe, a czas dostępny na ich rozdzielanie jest bardzo krótki [8].



Rys. 2. Schemat ideowy zestawu do GC x GC. (a) dozownik; (b) I kolumna; (c) łącznik; (d) modulator; (e) II kolumna; (f) detektor; (g) piec do II kolumny (opcjonalnie) [8].

Próbka wprowadzona do systemu jest najpierw rozdzielana w I kolumnie (pierwszy wymiar), tak samo jak w klasycznej chromatografii gazowej. Po opuszczeniu I kolumny składniki próbki nie są jednak kierowane do detektora, lecz do modulatora, który zbiera materiał opuszczający tę kolumnę poprzez określony, zawsze taki sam krótki czas, a następnie nastrzykuje cały zebrany materiał w postaci bardzo wąskiego pasma do II kolumny (drugi wymiar). Po nastrzyknięciu próbki proces zbierania kolejnej frakcji w modulatorze rozpoczyna się na nowo. W tym samym czasie składniki poprzedniej frakcji ulegają rozdzielaniu w II kolumnie. Mechanizm tego rozdzielania jest niezależny od mechanizmu w I kolumnie, tak więc możliwe staje się rozdzielanie składników, które koeluowały na wylocie I kolumny [9]. Składniki opuszczające II kolumnę kierowane są do odpowiedniego detektora chromatograficznego, który w efekcie rejestruje szereg bardzo krótkich, sekwencyjnych chromatogramów z drugiego wymiaru. Proces zbierania frakcji i dozowania próbki do II kolumny powtarzany jest aż do końca analizy [5].

Powody, dla których konieczne jest stosowanie modulatora pomiędzy I i II kolumną, są zilustrowane na rys. 3. Wynik chromatograficznego rozdzielania składników próbki w układzie, w którym dwie kolumny z różnymi fazami stacjonarnymi są ze sobą połączone bezpośrednio, jest taki sam jak wynik rozdzielania w pojedynczej kolumnie z fazą stacjonarną będącą mieszaniną faz z tych dwóch kolumn w odpowiednich proporcjach. Przy bezpośrednim połączeniu kolumn zawsze istnieje szansa, że pasma analitów, które zostały rozdzielone w I kolumnie, mogą się ponownie połączyć w drugiej kolumnie na skutek różnej szybkości migracji i w rezultacie dojdzie do ich koelucji na wylocie układu (rys. 3B). Istnieje też możliwość, że kolejność elucji składników opuszczających układ będzie różna niż ich kolejność na wylocie I kolumny (rys. 3C). Tak więc taki sposób połączenia dwóch kolumn nie gwarantuje zachowania rozdzielania osiągniętego w I kolumnie, co jest warunkiem kompletności w przypadku techniki GC x GC.



Rys. 3. Modulator jako niezbędny element układu do GC x GC [8]. Schematy na rysunkach 3 A-C stanowią graficzną ilustrację tezy, że pasma rozdzielone na wylocie I kolumny mogą się ponownie połączyć lub nawet zmienić kolejność elucji na wylocie II kolumny, jeśli przedostają się one z jednej kolumny do drugiej w sposób ciągły. Na rysunkach 3 D-G przedstawiono zasady działania modulatora, który zatrzymuje materiał opuszczający I kolumnę i okresowo nastrzykuje jego porcje do II kolumny, nie pozwalając następnym pasmom opuszczającym I kolumnę dostać się do II kolumny zanim pasmo z poprzedniego nastrzyku jej nie opuści. Bardziej szczegółowy opis tych zjawisk jest umieszczony w tekście.

Modulator umieszczony pomiędzy I i II kolumną zapobiega tym niekorzystnym zjawiskom. Rozdzielenie pasm chromatograficznych osiągnięte w I kolumnie zostaje zachowane dzięki temu, że związki opuszczające tę kolumnę nie są w sposób ciągły przenoszone do II kolumny. Na rysunku 3D przedstawiono rozdzielanie chromatograficzne analogiczne do tego przedstawionego na rysunku 3 A, ale tym razem w obecności modulatora. Na rysunku 3E modulator zatrzymuje i zawęża pasmo oznaczone kolorem czarnym. Pasma to następnie zostaje wprowadzone do II kolumny. W tym czasie pasmo oznaczone kolorem szarym, które bez modulatora łączyło się ponownie z pasmem oznaczonym kolorem czarnym w II kolumnie (rys. 3 B), jest zatrzymywane w modulatorze (rys. 3F). Pasma to jest dozowane do II kolumny dopiero po jej opuszczeniu przez pasmo oznaczone kolorem czarnym, co eliminuje możliwość wystąpienia koelucji. Co więcej, dzięki silnemu zawężeniu pasma w modulatorze, a więc bardzo małej szerokości pasma nastrzyku oraz dzięki innej selektywności fazy stacjonarnej w II kolumnie, możliwe staje się rozdzielanie składników koelujących na wylocie I kolumny (rys. 3 G). Niebezpieczeństwo zmiany kolejności elucji pasm oznaczonych kolorami szarym i białoczarnym (rys. 3 C) jest wyeliminowane, gdyż pasmo oznaczone kolorem białoczarnym zostaje wprowadzone do II kolumny dopiero po jej opuszczeniu przez pasmo oznaczone kolorem szarym (rys. 3 G). Tak więc zastosowanie modulatora pomiędzy kolumnami pozwala zachować rozdzielanie pasm na wylocie I kolumny i umożliwia uzyskanie dodatkowego rozdzielania w II kolumnie.

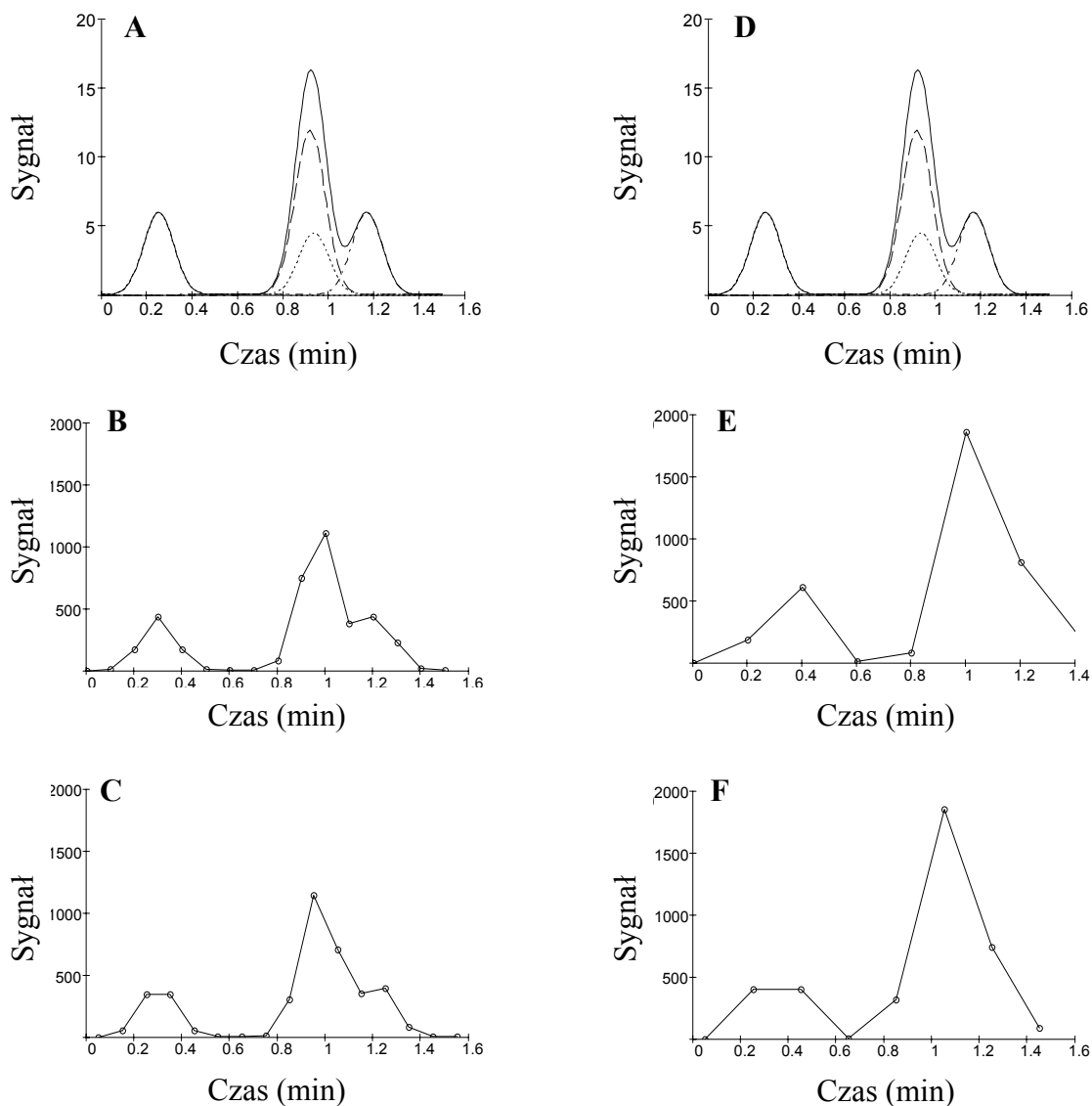
Na rysunkach 3 D-G przedstawiono zasadę działania modulatora, w którym następuje zatrzymywanie materiału opuszczającego I kolumnę i z którego okresowo dozowane są jego porcje do II kolumny w taki sposób, że kolejne pasma opuszczające I kolumnę nie mogą dotrzeć do II kolumny, zanim opuści ją pasmo z poprzedniego dozowania. Warunek zachowania rozdzielania pasm na wylocie I kolumny jest

spełniony poprzez zastosowanie odpowiednio wysokiej częstotliwości próbkowania. Jak wykazały badania teoretyczne [10], rozdzielenie pasm uzyskane w pierwszym wymiarze jest zachowane, gdy każde pasmo opuszczające I kolumnę jest próbkowane co najmniej 3 razy. Na rysunku 4 przedstawiono wpływ częstotliwości próbkowania na zachowanie rozdzielenia pasm uzyskanego w I kolumnie. Dla celów modelowania przyjęto, że modulator zbiera cały materiał opuszczający I kolumnę bez strat i wprowadza go okresowo w postaci bardzo wąskich pasm do II kolumny. Celem uproszczenia modelu przyjęto też, że w II kolumnie nie dochodzi do dalszego rozdzielenia pasm analitów.

W górnym rzędzie wykresów na rys. 4 przedstawiono pasma chromatograficzne na wylocie z I kolumny. Piki mają szerokość 24 s u podstawy (wartość typowa dla techniki GCxGC) oraz czasy retencji odpowiednio 15, 55, 56, i 70 s. Dla celów modelowania przyjęto dwie częstotliwości próbkowania: 6 s (piki próbkowane 4 razy; rys. 4B-C) oraz 12 s (piki próbkowane 2 razy; rys. 4E-F). Modulacja przedstawiona na rys. 4B i 4E została zainicjowana jednocześnie z wprowadzeniem próbki (w fazie z analizą; przesunięcie w fazie 0 s). Na rysunkach 4C i 4F modulacja została zapoczątkowana po upływie 3 s od wprowadzenia próbki (przesunięcie w fazie 3 s). Dla pasma analitu faza jest definiowana jako czas wystąpienia nastrzyku do II kolumny w stosunku do czasu retencji pasma w I kolumnie [11]. Przesunięcie w fazie jest istotne w przypadku techniki GCxGC, gdyż chromatogram wygląda nieco inaczej, gdy czas zapoczątkowania modulacji się zmienia.

Dane zamieszczone na rysunkach 4B i C pokazują, że przy okresie modulacji wynoszącym 6 s zrekonstruowany chromatogram zachowuje najważniejsze cechy oryginalnego chromatogramu z wylotu I kolumny. Częściowe rozdzielenie drugiego i trzeciego pasma jest zachowane bez względu na fazę modulacji. Faza ta wpływa jedynie na kształt zrekonstruowanych pasm. Z drugiej strony, przy okresie modulacji równym 12 s, kiedy każdy pik może być próbkowany jedynie dwa razy, pasma analitów rozdzielone na wylocie I kolumny mogą się ponownie połączyć w modulatorze. Częściowo rozdzielone drugie i trzecie pasmo (rysunek 4D) opuszczają II kolumnę jako jedno zniekształcone pasmo bez względu na fazę modulacji (rys. 4E i F).

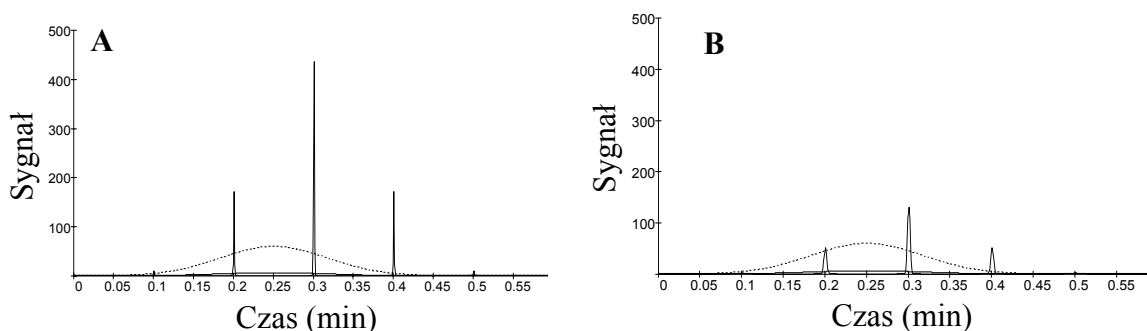
Inną, bardzo istotną cechą, jest szerokość pików uzyskiwana w drugim wymiarze. Im są one węższe, tym więcej można ich zmieścić w ograniczonej przestrzeni chromatogramu, co zwiększa pojemność pików. Dodatkowo widać należy pod uwagę fakt, że z dwóch pików o jednakowej powierzchni, węższy pik musi być z natury rzeczy wyższy, co powoduje przyrost stosunku sygnału do szumu, a więc czułości metody. Wielkość tego przyrostu zależy głównie od typu modulatora i okresu modulacji. Przyrost wielkości sygnału występuje jedynie wtedy, gdy w modulatorze zbiera się cały materiał opuszczający I kolumnę i okresowo wprowadza się go do II kolumny w postaci wąskiego pasma. Przyrostu takiego z reguły nie obserwuje się, gdy modulator jedynie okresowo pobiera próbki materiału z I kolumny (sposób działania typowy dla modulatorów na bazie zaworów wielodrożnych).



Rys. 4. Wpływ długości okresu modulacji na zachowanie rozdzielania uzyskanego w I kolumnie. (A) i (D) – hipotetyczny chromatogram czterech składników (linie przerywane) na wylocie kolumny; szerokość pików u podstawy wynosi 24 s. (B) chromatogram z I kolumny zrekonstruowany dla okresu modulacji 6 s i przesunięcia w fazie 0 s (patrz tekst); (C) chromatogram z I kolumny zrekonstruowany dla okresu modulacji 6 s i przesunięcia w fazie 3 s; (E) chromatogram z I kolumny zrekonstruowany dla okresu modulacji 12 s i przesunięcia w fazie 0; (F) chromatogram z I kolumny zrekonstruowany dla okresu modulacji 12 s i przesunięcia w fazie 3 s [8].

Okres modulacji jest równie ważny. Przy dłuższym okresie (mniejszej częstotliwości) próbkowania rozdzielanie pasm z I kolumny może być częściowo utracone, ale za to pasma zbierane są w postaci mniej licznych, ale większych frakcji, co powoduje przyrost czułości metody przy jednoczesnym spadku zdolności rozdzielczej. Efekt ten przedstawiono na rysunku 5. Piki chromatograficzne na rysunku 5A mają szerokość u podstawy wynoszącą 180 ms. Piki przestawione na rysunku 5B mają tę samą powierzchnię, ale ich szerokość u podstawy wynosi 300 ms., w wyniku czego ich wysokość jest znacznie mniejsza. Wzrost szerokości pików wpływa jednocześnie na spadek pojemności pików w drugim wymiarze i ogranicza czułość metody.

Czytelnikom zainteresowanym bardziej szczegółowym opisem tych zjawisk warto polecić obszerne prace [9,12].



Rys. 5. Wpływ szerokości pików opuszczających II kolumnę na wielkość sygnału i pojemność pików w drugim wymiarze. (A) szerokość pików w II wymiarze 180 ms u podstawy; (B) szerokość pików w drugim wymiarze 300 ms u podstawy. Powierzchnie pików na obu rysunkach są jednakowe. Profil oryginalnego pików na wylocie z I kolumny jest zaznaczony linią ciągłą; linia przerywana pokazuje ten sam profil pomnożony przez 10 celem ułatwienia porównań [8].

3. INTERPRETACJA DANYCH

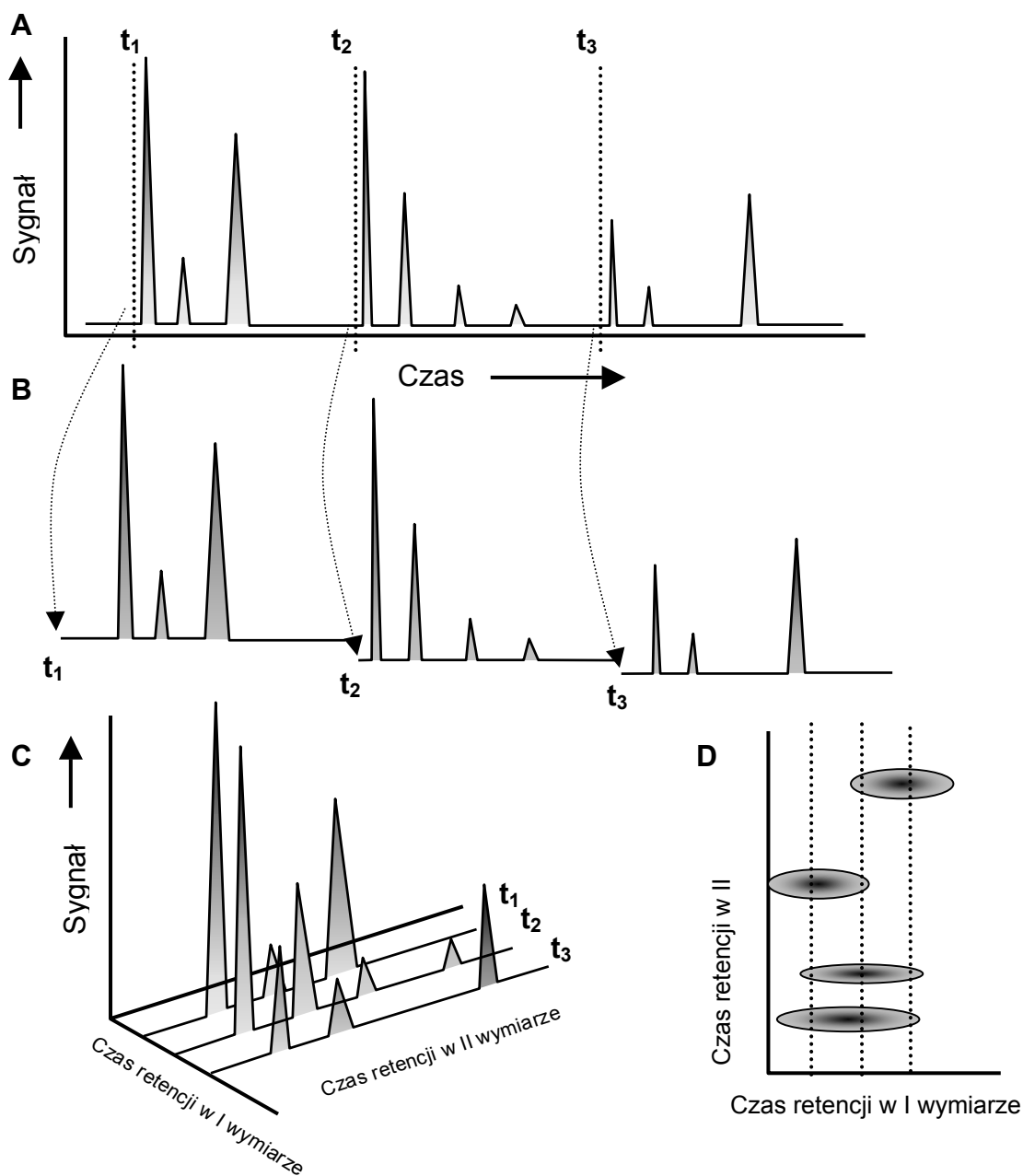
W analizie z wykorzystaniem techniki GC x GC, materiał opuszczający pierwszą kolumnę jest periodycznie próbkowany i nastrzykiwany w formie bardzo wąskich pasm do drugiej kolumny. Detektor na wylocie tej kolumny rejestruje liniowy sygnał, który jest w istocie ciągiem chromatogramów z drugiego wymiaru następujących po sobie w ciągłej sukcesji (patrz rysunek 6A). Jeśli analiza jest prowadzona w prawidłowy sposób, każdy pik chromatograficzny na wylocie I kolumny jest próbkowany przynajmniej 3 razy, w związku z czym jego składnik(i) muszą się pojawić w co najmniej w trzech kolejnych chromatogramach z drugiego wymiaru. W wyniku tego chromatogram rejestrowany na wylocie II kolumny jest bardzo skomplikowany i trudny do interpretacji w nieprzetworzonej postaci. Bardzo trudno jest na przykład powiedzieć, które piki w serii chromatogramów z drugiego wymiaru pochodzą od tego samego związku, a które reprezentują inne związki. Niemniej istotne jest to, że w praktyce niemożliwe jest przedstawienie „surowego”, liniowego chromatogramu w taki sposób, aby można było z niego odczytać jakiegokolwiek detale. W związku z tym, wyniki analizy z wykorzystaniem techniki GC x GC są zazwyczaj przetwarzane do postaci trójwymiarowej (3-D) i przedstawiane w widoku z góry (podobnie jak mapa). Czas retencji w pierwszym wymiarze jest zaznaczony na osi X, a czas retencji w drugim wymiarze na osi Y. Wielkość pików (trzeci wymiar chromatogramu) jest zazwyczaj kodowana odpowiednim kolorem. Piki na trójwymiarowym chromatogramie występują jako plamy o różnym kolorze lub jako seria zamkniętych linii opasujących kontury trójwymiarowych pików (podobnie jak kolory i poziomicę na mapie wyznaczają profile wzniesień w terenie).

Sposób tworzenia trójwymiarowego chromatogramu w technice GC x GC jest przedstawiony schematycznie na rys. 6. Odpowiednie oprogramowanie umożliwia podział liniowego chromatogramu zarejestrowanego przez detektor na odcinki odpowiadające pojedynczym chromatogramom z drugiego wymiaru. Podstawą podziału jest okres modulacji i zarejestrowane przez system rejestracji danych czasy

wprowadzania pasm do II kolumny (t_1 , t_2 i t_3 na rysunkach 6A i B). Tak podzielone chromatogramy z II wymiaru są następnie ustawiane jeden koło drugiego w przestrzeni trójwymiarowej (rysunek 6C). Przestrzeń ta jest następnie rysowana w widoku z góry (rysunek 6D). Czas wprowadzenia pasma do II kolumny jest czasem retencji w pierwszym wymiarze dla wszystkich pików opuszczających II kolumnę pomiędzy dwoma kolejnymi operacjami wprowadzania próbki. Czas retencji w drugim wymiarze odpowiada absolutnemu czasowi retencji pomniejszonemu o czas nastrzyku. Czas wystąpienia nastrzyku do II kolumny jest często powiększany o czas martwy w II kolumnie. Chromatogramy uzyskane w ten sposób są nieco łatwiejsze do interpretacji niż chromatogramy uwzględniające absolutny czas nastrzyku do II kolumny. Czytelnikom pragnącym zapoznać się lepiej z interpretacją dwuwymiarowych chromatogramów uzyskiwanych z wykorzystaniem techniki GC x GC warto polecić pracę [13].

Analiza ilościowa w przypadku techniki GC x GC jest zazwyczaj prowadzona w oparciu o nieprzetworzony, oryginalny chromatogram zarejestrowany na wylocie II kolumny. Chromatogram ten jest integrowany w normalny sposób, po czym na podstawie chromatogramu dwuwymiarowego wybiera się piki odpowiadające analitowi w poszczególnych chromatogramach z drugiego wymiaru. Powierzchnie tych pików są następnie sumowane. Cała procedura jest zazwyczaj wbudowana w oprogramowanie przetwarzające surowe dane. Użytkownik musi jedynie na chromatogramie dwuwymiarowym zaznaczyć, które piki go interesują, a oprogramowanie umożliwia wybór odpowiednich pików z nieprzetworzonego chromatogramu i sumuje ich powierzchnie. Techniki analizy ilościowej w technice GC x GC zostały po raz pierwszy opisane w roku 1998 [14]. Od tego czasu notuje się ich ciągły rozwój. Należy podkreślić, że choć integracja pików w przypadku techniki GC x GC jest nieco trudniejsza, niż w tradycyjnej chromatografii jednowymiarowej, jednak technika ta daje w pełni ilościowe wyniki, których dokładność i precyzja nie ustępują chromatografii jednowymiarowej. W istocie często zdarza się, że analiza z wykorzystaniem techniki GC x GC umożliwia otrzymanie bardziej dokładnych i precyzyjnych wyników, niż tradycyjna chromatografia gazowa. Jest to związane z dużo lepszą zdolnością rozdzielczą tej techniki (ryzyko koelucji jest znacznie mniejsze), jak również z kompresją pasm chromatograficznych, która znacznie poprawia stosunek sygnału do szumu.

Interpretacja danych staje się nieco trudniejsza, jeśli czas retencji pików w drugim wymiarze jest dłuższy niż okres modulacji. Pik taki opuszcza II kolumnę razem z pasmami wprowadzonymi w następnym cyklu modulacji, co często prowadzi do problemów związanych z koelucją. Co więcej, czas retencji tego pików w drugim wymiarze jest pozornie krótszy o długość jednego okresu modulacji. Piki takie określane są potocznie jako piki „zawinięte” (ang. „wraparound peaks”). „Zawinięte” piki są oczywiście szersze, niż piki opuszczające II kolumnę w czasie pojedynczego cyklu modulacji (ze względu na dłuższy czas spędzony w II kolumnie). Pozwala to na dość łatwe zidentyfikowanie ich na chromatogramie dwuwymiarowym. Niemniej jednak zawinięte piki zaburzają strukturę chromatogramu dwuwymiarowego i mogą powodować problemy w analizie ilościowej, szczególnie jeśli koeluuują z analitami.



Rys. 6. Interpretacja danych w technice GC x GC i sposób generowania chromatogramów dwuwymiarowych. (A) Liniowy chromatogram zarejestrowany na wylocie II kolumny, będący w istocie serią szybko po sobie następujących chromatogramów z drugiego wymiaru; t_1 , t_2 , i t_3 są czasami nastrzyku frakcji do II kolumny. (B) Na podstawie tych czasów oprogramowanie dzieli cały chromatogram na odcinki odpowiadające pojedynczym chromatogramom w drugim wymiarze. (C) Pojedyncze chromatogramy z drugiego wymiaru są umieszczane jeden koło drugiego w przestrzeni trójwymiarowej; czas retencji w I kolumnie jest zaznaczany na osi X, czas retencji w II kolumnie na osi Y, a intensywność sygnału na osi Z. (D) Chromatogram jest wykreślany na płaszczyźnie X-Y w widoku z góry; wielkość pików jest oznaczana za pomocą odpowiednich kolorów [8].

Jedną z największych zalet techniki GC x GC jest fakt, że każdy składnik próbki ma przypisane dwa czasy retencji, które mogą być użyte do jego identyfikacji. Jest to niemal odpowiednik dwóch oddzielnych analiz jednowymiarowych przeprowadzanych z użyciem dwóch kolumn z różnymi fazami stacjonarnymi, jak wymagają tego niektóre metody analityczne. Niektórzy autorzy wręcz uważają, że identyfikacja na podstawie dwóch czasów retencji w przypadku techniki GC x GC jest porównywalna pod względem trafności z analizą z wykorzystaniem techniki GC-MS [4].

Inną- bardzo interesującą- cechą techniki GC x GC jest uporządkowana natura dwuwymiarowych chromatogramów. Piki związków należących do serii homologicznych zazwyczaj układają się wzdłuż linii prostych na dwuwymiarowej płaszczyźnie retencji. Często można dzięki temu przyporządkować nieznany pik do określonej klasy chemicznej tylko na podstawie jego położenia na płaszczyźnie retencji. Wielu badaczy parających się na co dzień analizą frakcji ropopochodnych z wykorzystaniem techniki kompletnej chromatografii dwuwymiarowej od razu rozpoznaje grupy pików reprezentujące różne klasy związków, n.p. alkany, alkeny, podstawione benzeny, dwupierścieniowe związki aromatyczne, trójpierścieniowe związki aromatyczne, itp. Cecha ta nie ma odpowiednika w chromatografii jednowymiarowej. Więcej informacji na temat uporządkowanej natury chromatogramów dwuwymiarowych i ich przydatności w szybkiej identyfikacji związków w złożonych mieszaninach znaleźć można w odnośniku [15].

Uporządkowana natura chromatogramów i bardzo dobrze odtwarzalne parametry retencji składników na dwuwymiarowej płaszczyźnie sprawiają, że technika GC x GC może też być bardzo przydatna w kryminalistyce. Identyfikacja nieznanych substancji w tej dziedzinie często prowadzona jest poprzez porównanie układu pików na chromatogramie nieznanej próbki z układem na chromatogramie próbki porównawczej. Chromatogramy uzyskane z wykorzystaniem techniki GC x GC zawierają dużo więcej informacji, a układ pików na płaszczyźnie jest dużo bardziej unikalny niż układ w jednym wymiarze, co pozwala na łatwiejszą i bardziej pewną identyfikację nieznanych substancji. Jedno z pierwszych zastosowań techniki GC x GC w kryminalistyce zostało opisane w pracy [16].

4. APARATURA

Aparatura, którą wykorzystuje się w technice GC x GC, nie różni się w zasadniczy sposób od aparatury do konwencjonalnej chromatografii gazowej. Dozowniki i sposoby nastrzyku próbki stosowane powszechnie w GC są również stosowane w przypadku techniki GC x GC. Kolumny stosowane w pierwszym wymiarze mają zazwyczaj długość od 15 do 30 m, wewnętrzną średnicę 0.25 mm i zawierają film fazy stacjonarnej o grubości od 0.25 do 1 μ m. Kolumny takie pozwalają w odpowiednich warunkach generować piki o szerokości u podstawy rzędu 10 – 20 s, co jest wielkością wymaganą przy typowych okresach modulacji (3 do 6 s). Kolumny stosowane w pierwszym wymiarze zawierają najczęściej niepolarną fazę stacjonarną (100% polidimetylosiloksan lub 95/5% metylo/fenylosiloksan). Rozdzielanie chromatograficzne w drugim wymiarze musi być prowadzone w kolumnie zawierającej inną fazę stacjonarną i w bardzo krótkim czasie. Pożądane jest przy tym, aby związki nastrzyknięte do II kolumny opuszczały ją w czasie nie dłuższym niż okres modulacji (w przeciwnym przypadku wystąpi zjawisko „zawijania” pików). Wymagania te powodują, że wybór parametrów kolumn stosowanych w drugim wymiarze jest bardzo ograniczony. Kolumny te mają najczęściej długość od 0,5 do 1,5 m i średnicę wewnętrzną 0,1 mm, choć niektórzy badacze (łącznie z autorem tego rozdziału) preferują kolumny o średnicy wewnętrznej

0,25 mm. Grubość filmu fazy stacjonarnej w tych kolumnach jest zazwyczaj mała (0,1 do 0,25 μm) ze względu na większą sprawność i mniejszą zdolność retencyjną w porównaniu do filmów fazy stacjonarnej o większej grubości. Mechanizm rozdzielania chromatograficznego w II kolumnie musi być inny niż mechanizm w I kolumnie, co dyktuje wybór faz stacjonarnych. Najczęściej stosowane są polarne fazy typu *Carbowax* lub fazy o składzie 50/50 metylo/fenylosiloksan. Obie kolumny są zazwyczaj umieszczane w tym samym piecu chromatograficznym. W niektórych rozwiązaniach aparaturowych kolumna stosowana w II wymiarze umieszczana jest w osobnym piecu (patrz rys. 2). Takie rozwiązanie zapewnia większą elastyczność w doborze parametrów metody, ale jednocześnie komplikuje konstrukcję systemu i wprowadza dodatkową zmienną przy opracowywaniu odpowiedniej metodyki.

Najważniejszym wymogiem w przypadku detektorów stosowanych w technice GC x GC jest bardzo duża szybkość działania. Piki wymywane z II kolumny mają bardzo małą szerokość (najczęściej 150 do 400 ms u podstawy). Aby wiernie oddać kształt piku konieczne jest, aby był on próbkowany co najmniej 10 razy. Oznacza to, że detektor musi być w stanie zbierać dane z częstotliwością co najmniej 50 Hz. Wybór detektorów chromatograficznych, które spełniają to kryterium, jest bardzo ograniczony. Zdecydowana większość prac jest prowadzona z użyciem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID). Czasami stosowane są też zminiaturyzowane detektory wychwyty elektronów (μ -ECD) [17], detektory emisji atomowej (AED) [18] czy też detektory chemiluminescencji siarki (SCD) [19], choć ich własności dynamiczne nie są tak dobre jak w przypadku FID. Szybkość skanowania większości spektrometrów mas stosowanych w połączeniu z chromatografią gazową jest zdecydowanie za niska, żeby można je było stosować w przypadku techniki GC x GC. Wyjątkiem jest tu spektrometr czasu przelotu (ang. time-of-flight; *TOF-MS*) [5]. Układy GC x GC-TOF-MS są komercyjnie dostępne, ale ich koszt jest wciąż poza zasięgiem większości laboratoriów. Warto też wspomnieć, że obróbka danych uzyskanych z takiego systemu jest dużym wyzwaniem ze względu na rozmiar zbiorów danych generowanych w pojedynczej analizie oraz ich stopień skomplikowania. Zagadnienia te zostały szeroko przedyskutowane w pracy [20].

Sercem każdego systemu do techniki GC x GC jest modulator. Większość rozwiązań w tej dziedzinie podzielić można z grubsza na dwie kategorie: modulatory termiczne i modulatory zaworowe. Modulacja termiczna jest zdecydowanie bardziej popularna. Modulatory należące do tej kategorii można dalej podzielić na dwie grupy: modulatory z ogrzewaniem (wykorzystujące podwyższoną temperaturę) i modulatory kriogeniczne (wykorzystujące obniżoną temperaturę). Reprezentatywne przykłady modulatorów należących do tych kategorii są przedstawione poniżej.

4.1. Modulatory termiczne

Modulatory z ogrzewaniem

Pierwszy modulator do techniki GC x GC opracowany w 1991 roku zbudowany był na bazie odcinka kolumny kapilarnej z grubym filmem fazy stacjonarnej. Kapilara pomalowana była farbą zawierającą złoto, co zapewniało przewodzenie prądu [2]. Pasma chromatograficzne opuszczające I kolumnę napotykało gruby film fazy stacjonarnej w modulatorze, co znacznie spowalniało jego migrację i powodowało jego zawężenie. Modulator był szybko ogrzewany w regularnych odstępach czasu poprzez przepuszczenie prądu elektrycznego przez warstwę złota na powierzchni kapilary. Powodowało to szybką desorpcję analitów uwieczonych w fazie stacjonarnej, które

przechodziły w postaci wąskiego pasma do II kolumny. Po ostygnięciu kapilara ponownie była gotowa na zatrzymywanie pasm z I kolumny.

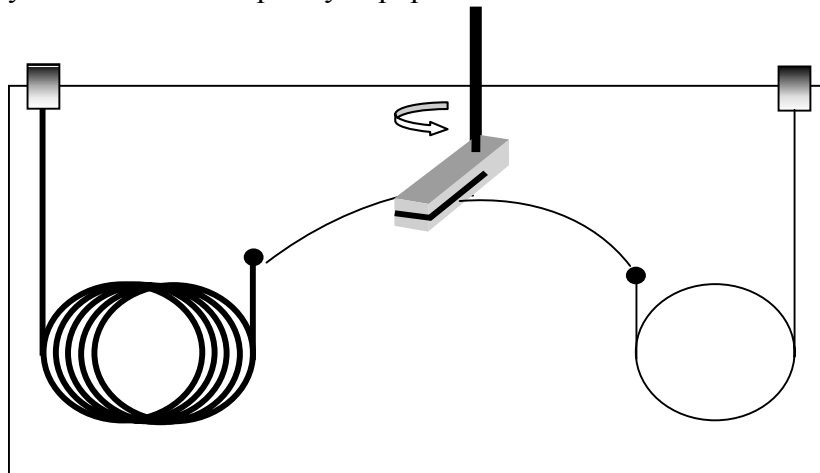
Rozwiązanie to miało zasadniczą wadę – anality opuszczające I kolumnę w czasie, gdy modulator był gorący, nie były zatrzymywane – czyli dochodziło do przebicia. W rezultacie powodowało to znaczne poszerzenie pasm nastrzyku do II kolumny i spadek sprawności tejże. Problem ten został rozwiązany poprzez wprowadzenie dwóch modulatorów połączonych szeregowo. Oba modulatory działały naprzemiennie. Kiedy pierwszy modulator zbierał frakcje analitów z I kolumny w temperaturze pieca, drugi w tym czasie był podgrzewany, co powodowało desorpcję pasma do II kolumny. Zanim pierwszy modulator został podgrzany, drugi wracał do temperatury pieca. Tak więc anality uwolnione z pierwszego modulatora były ponownie zatrzymywane w drugim modulatorze, co zapobiegało zjawisku przebicia. Większość współcześnie stosowanych modulatorów wykorzystuje dwustopniową modulację opartą na podobnej zasadzie.

Opisany powyżej modulator miał wiele wad. Najważniejszą było to, że warstwa farby zawierającej złoto bardzo łatwo ulegała uszkodzeniu. Poza tym modulator ten był bardzo delikatny i trudno było zrobić go w powtarzalny sposób. Pierwszy modulator, który znalazł szersze zastosowanie dzięki w miarę niezawodnemu działaniu, opracowany został przez tą samą grupę [21]. Był to tak zwany obrotowy modulator termiczny (rys. 7). W modulatorze tym pasma analitów były również zatrzymywane przez gruby film fazy stacjonarnej w kapilarze. Zatrzymane pasma były okresowo wprowadzane do II kolumny na skutek desorpcji termicznej spowodowanej przejściem obrotowego grzejnika szczelinowego wzdłuż kapilary. Grzejnik utrzymywany był w temperaturze wyższej o około 100°C od temperatury pieca chromatograficznego. Grzejnik poruszał się zgodnie z kierunkiem przepływu strumienia gazu nośnego, w związku z czym anality zdesorbowane termicznie poprzez lokalne podgrzanie kapilary poruszały się w kierunku II kolumny w postaci wąskiego pasma. Jednocześnie odcinek kapilary za grzejnikiem szybko wracał do temperatury pieca i ponownie zatrzymywał anality, co zapobiegało przebicciu. Modulator tego typu był pierwszym modulatorem dostępnym komercyjnie. Działał on bardzo dobrze w wielu zastosowaniach, ale miał też słabe strony związane ze stosowaniem ruchomych części, które czasami powodowały problemy.

Oba typy modulatorów opisane powyżej miały istotne ograniczenia. Ze względu na mechanizm zatrzymywania analitów (sorpcja w filmie fazy stacjonarnej utrzymywanej w temperaturze pieca), skuteczna modulacja związków lotnych była praktycznie niemożliwa. Jedynym rozwiązaniem tego problemu było utrzymywanie pieca chromatograficznego w temperaturze niższej od temperatury otoczenia, co jest mało praktyczne. Drugim ograniczeniem była konieczność stosowania temperatury wyższej o około 100°C od temperatury pieca w celu zdesorbowania uprzednio zatrzymanych analitów. Aby uniknąć termicznego rozkładu fazy stacjonarnej, maksymalna temperatura pieca musiała być niższa o 100°C od górnej dopuszczalnej temperatury pracy kolumny. Prowadziło to do znacznego ograniczenia zakresu związków, które mogły być oznaczane techniką GC x GC przy użyciu modulatorów tego typu.

W laboratorium autorów tego opracowania opracowany został inny typ modulatora termicznego, w którym brak jest części ruchomych. W skład modulatora wchodziły dwie szeregowo połączone mikropułapki wypełnione porowatym sorbentem. Pułapki wykonane były z dezaktywowanej stali nierdzewnej *Silcosteel* (Restek, Bellefonte, PA). Były one podgrzewane na przemian poprzez przepuszczenie przez nie impulsów prądu elektrycznego z rozładowania baterii kondensatorów, co powodowało desorpcję zatrzymanych analitów [22]. Porowaty sorbent zastosowany w tym

rozwiązaniu miał dużo większą pojemność sorpcyjną niż film fazy stacjonarnej stosowany w poprzednich rozwiązaniach, skutkiem czego lotne anality były zatrzymywane dużo skuteczniej. Z drugiej strony odporność termiczna zastosowanego sorbentu (*Tenax TA*) ograniczała możliwości stosowania tego modulatora do związków o niskiej lotności, podobnie jak to miało miejsce w przypadku rozwiązań konstrukcyjnych modulatorów opisanych poprzednio.



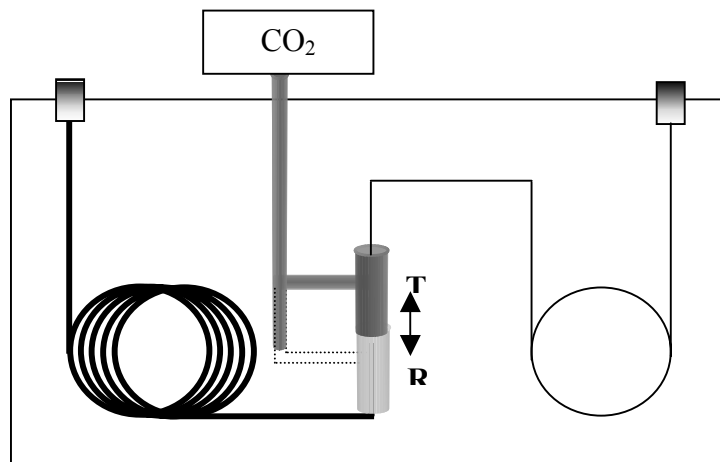
Rys. 7. Schemat budowy obrotowego modulatora termicznego [8] (opis w tekście).

W laboratorium autorów tego opracowania opracowany został inny typ modulatora termicznego, w którym brak jest części ruchomych. W skład modulatora wchodziły dwie szeregowo połączone mikropułapki wypełnione porowatym sorbentem. Półki wykonane były z dezaktywowanej stali nierdzewnej *Silcosteel* (Restek, Bellefonte, PA). Były one podgrzewane na przemian poprzez przepuszczenie przez nie impulsów prądu elektrycznego z rozładowania baterii kondensatorów, co powodowało desorpcję zatrzymanych analitów [23]. Porowaty sorbent zastosowany w tym rozwiązaniu miał dużo większą pojemność sorpcyjną niż film fazy stacjonarnej stosowany w poprzednich rozwiązaniach, skutkiem czego lotne anality były zatrzymywane dużo skuteczniej. Z drugiej strony odporność termiczna zastosowanego sorbentu (*Tenax TA*) ograniczała możliwości stosowania tego modulatora do związków o niskiej lotności, podobnie jak to miało miejsce w przypadku rozwiązań konstrukcyjnych modulatorów opisanych poprzednio.

Modulatory kriogeniczne

Pierwszy kriogeniczny modulator do techniki GC x GC opracowany został przez zespół Mariott'a z Australii. Otrzymał on nazwę „wzdłużnie modulowany system kriogeniczny” (ang. ‘longitudinally modulated cryogenic system’, *LMCS*) [24]. Schemat budowy tego modulatora jest zaprezentowany na rysunku 8. Odcinek II kolumny jest umieszczony wewnątrz ruchomej chłodnicy chłodzonej za pomocą ciekłego CO₂ do temperatury około -50°C. W temperaturze tej anality są skutecznie zatrzymywane na cienkim filmie fazy stacjonarnej pułapki. Chłodnica początkowo znajduje się w pozycji „T”. Przesunięcie jej do pozycji „R” powoduje, że pierwotnie chłodzony odcinek kolumny wraz z zatrzymanymi analitami jest bardzo szybko doprowadzany do temperatury pieca chromatograficznego, co powoduje desorpcję analitów do II kolumny. Jednocześnie anality wymywane z I kolumny w tym samym czasie są zatrzymywane w pozycji „R”. Chłodnica wraca następnie do pozycji „T”. Anality zatrzymane w filmie fazy stacjonarnej w pozycji „R” są uwalniane, ale zaraz

potem są zatrzymywane w pozycji „T” wraz ze świeżymi porcjami analitu. W ten sposób wyeliminowane zostaje zjawisko przebiccia. Cały cykl jest następnie powtarzany zgodnie z powyższym opisem.



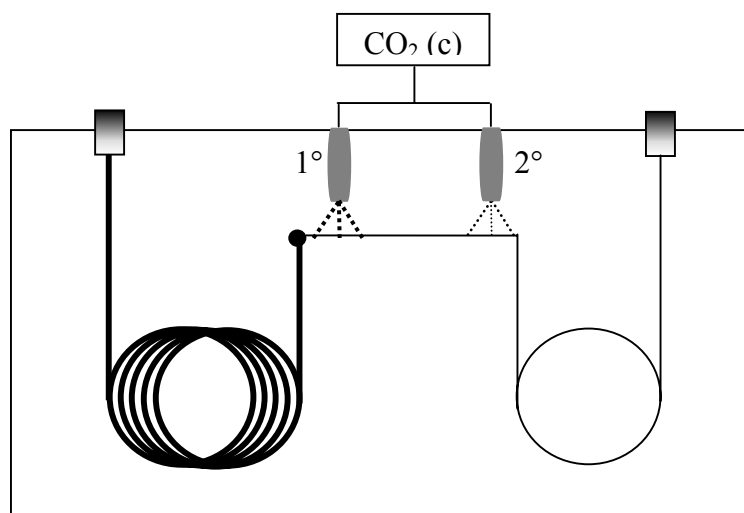
Rys. 8. Schemat budowy wzdluznie modulowanego systemu kriogenicznego (LMCS). „T” i „R” oznaczają pozycje pułapki w których pasmo jest odpowiednio zatrzymywane i uwalniane do II kolumny. Pasma analitu opuszczające I kolumnę napotyka chłodną strefę w pozycji T i zostaje zatrzymane i zawężone. Kiedy ruchoma chłodnica przesuwa się do pozycji R, pasmo jest uwalniane do II kolumny. Jednocześnie chłodnica w pozycji R zapobiega zjawisku przebiccia dalszych pasm. Chłodnica wraca następnie do pozycji T i cykl się powtarza. [8].

Modulator typu LMCS był pierwszym modulatorem, który był na tyle niezawodny, że można go było używać rutynowo bez specjalnego przeszkolenia. Dzięki temu stał się on dość popularny pomimo tego, że nie był on osiągalny komercyjnie. Jedną z głównych zalet tego modulatora (jak i innych modulatorów kriogenicznych) jest fakt, że desorpcja zatrzymanych pasm następuje w temperaturze pieca, a nie powyżej tej temperatury. Dzięki temu możliwe jest stosowanie wyższych temperatur końcowych w analizie, co poszerza zakres stosowalności techniki. Główna słabość jest związana ze stosowaniem ciekłego CO₂ do chłodzenia. Temperatura około -50°C nie jest wystarczająca do zatrzymania bardzo lotnych analitów, co powoduje rozmycie ich pasm na chromatogramie. Poza tym w modulatorze tym stosowane są części ruchome, co potencjalnie może powodować problemy natury technicznej.

Generalnie uważa się, że modulatory kriogeniczne mają mniej wad niż modulatory z ogrzewaniem, dlatego po wprowadzeniu modulatora typu LMCS podjęto prace mające na celu opracowanie modulatora kriogenicznego bez części ruchomych. Dwa modulatory tego typu zostały opracowane w podobnym czasie. W laboratorium Autorów rozdziału opracowany został modulator kriogeniczny oparty na wykorzystaniu dwóch połączonych szeregowo pułapek chłodzonych za pomocą ciekłego azotu. Pułapki wykonane były na bazie kapilar z dezaktywowanej stali nierdzewnej typu *Silcosteel*. Kapilary te umieszczone były w komorze kriogenicznej chłodzonej za pomocą ciekłego azotu. Pasma zatrzymywane były w pułapkach na drodze wymrażania, a nie sorpcji w filmie fazy stacjonarnej, jak to ma miejsce w modulatorach chłodzonych za pomocą ciekłego CO₂. Zatrzymane pasma były uwalniane poprzez chwilowe podgrzanie kapilary za pomocą impulsu prądu elektrycznego z rozładowania baterii kondensatorów [23]. Modulator ten bez problemu zatrzymywał nawet najbardziej lotne związki, a czas dozowania mógł być kontrolowany bardzo precyzyjnie. Wadą tego modulatora były wycieki czynnika kriogenicznego z komory, pojawiające się po pewnym czasie

użytkowania. Wycieki te związane były z wyrabianiem się ceramicznych uszczelnień komory. Prowadziły one do powstawania zimnych miejsc poza komorą, co zaburzało proces modulacji.

Drugi typ modulatora kriogenicznego bez części ruchomych, opracowany w tym samym czasie, oparty jest na wykorzystaniu dwóch dysz rozpylających ciekły CO_2 do naprzemiennego chłodzenia dwóch odcinków II kolumny oraz dwóch dysz dostarczających strumień gorącego powietrza do takiegoż ogrzewania tych odcinków [25]. Materiał opuszczający I kolumnę był zatrzymywany w pierwszym chłodnym odcinku. Po określonym czasie był on desorbowany poprzez jednoczesne zatrzymanie dopływu ciekłego CO_2 i włączenie nadmuchu gorącego powietrza. Uwolniony materiał był ponownie zatrzymywany w drugim chłodnym odcinku wraz ze składnikami, które w tym czasie opuszczały I kolumnę. W następnym etapie dopływ ciekłego CO_2 do pierwszej dyszy był ponownie uruchamiany w celu wyeliminowania możliwości przebiecia analitu, po czym pasmo zatrzymane w drugim chłodnym odcinku było wprowadzane do II kolumny poprzez zatrzymanie dopływu strumienia ciekłego CO_2 do drugiej dyszy i włączenie nadmuchu strumienia gorącego powietrza na drugi chłodny odcinek. Modulator ten generalnie działał bardzo dobrze, ale jego konstrukcja była nadmiernie skomplikowana ze względu na konieczność niezależnego kontrolowania czterech dysz. Niemniej jednak, był to pierwszy komercyjnie dostępny modulator kriogeniczny bez ruchomych części wewnątrz pieca. Poza tym zasada działania tego modulatora stała się podstawą większości modulatorów opracowanych w późniejszym czasie. Opracowano uproszczoną wersję tego modulatora, w której wykorzystuje się jedynie dwie dysze dostarczające strumień ciekłego CO_2 . Desorpcja analitów następuje poprzez zatrzymanie dopływu czynnika kriogenicznego, co pozwala na szybkie doprowadzenie chłodzonego odcinka kolumny do temperatury pieca [26]. Konstrukcja tego modulatora jest przedstawiona na rysunku 9. W roku 2003 przedstawiono jeszcze bardziej uproszczoną wersję tego modulatora opartą na wykorzystaniu pojedynczej dyszy z ciekłym CO_2 . Przebiecie analitów zostało w tym wypadku zminimalizowane poprzez wyłączenie dopływu czynnika kriogenicznego do dyszy na bardzo krótki okres czasu (~ 500 ms). Wadą tego rozwiązania jest fakt, że po zmianie parametrów metody chromatograficznej, czas desorpcji musi być ponownie optymalizowany celem zminimalizowania zjawiska przebiecia pułapki przez anality.



Rys. 9. Schemat budowy modulatora z dwoma dyszami kriogenicznymi. Kiedy pierwsza (1°) dysza jest otwarta, druga (2°) dysza jest zamknięta. W pozycji tej materiał

opuszczający I kolumnę jest zatrzymywany w odcinku II kolumny chłodzonym przez 1° dyszę. W następnym etapie dopływ ciekłego CO₂ do 1° dyszy zostaje odcięty, a aktywowana jest 2° dysza. Materiał zatrzymany w odcinku chłodzonym 1° dyszą zostaje uwolniony i przetransportowany do odcinka chłodzonego za pomocą 2° dyszy, gdzie jest ponownie zatrzymany. W ostatniej fazie cyklu dysza 1° zostaje ponownie uruchomiona, aby wyeliminować przebiecie pułapki przez anality, po czym dopływ ciekłego CO₂ do 2° dyszy zostaje odcięty. Powoduje to desorpcję zatrzymanego pasma do II kolumny chromatograficznej [8].

Ostatnio twórcy modulatora z czterema dyszami również uprościli jego konstrukcję poprzez wyeliminowanie jednej pary dysz. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu pętli opóźniającej, która umożliwiła zastosowanie modulatora z pojedynczą dyszą do dwustopniowej modulacji [27]. W modulatorze tym pojedyncza dysza umożliwia chłodzenie jednocześnie dwóch odcinków tej samej kapilary (stanowiącej pętlę opóźniającą). Kiedy dysza kriogeniczna jest otwarta, anality z I kolumny są zatrzymywane w I chłodzonym odcinku pętli. Po wyłączeniu dyszy i uruchomieniu nadmuchu strumienia gorącego powietrza, materiał zatrzymany w tym odcinku wraz z materiałem wypływającym w tym czasie z I kolumny są uwalniane do pętli. Dysza kriogeniczna jest następnie ponownie uruchamiana, co powoduje, że materiał opuszczający I kolumnę zaczyna ponownie być zatrzymywany w I odcinku chłodzonym, natomiast materiał z pętli zostaje zatrzymany w drugim chłodzonym odcinku. W kolejnym cyklu materiał z pierwszego odcinka chłodzonego jest przenoszony do drugiego chłodzonego odcinka, natomiast materiał z II odcinka chłodzonego zostaje wprowadzony do II kolumny. Modulator ten jest niewątpliwie najprostszym typem kriogenicznego modulatora dwustopniowego, jaki został jak dotąd opracowany. Wymaga on jednak uwagi przy ustalaniu parametrów metody. Prędkość liniowa przepływu strumienia gazu nośnego musi być dobrana odpowiednio do długości pętli opóźniającej i okresu modulacji. Jakakolwiek zmiana jednego z tych parametrów zazwyczaj pociąga za sobą konieczność zmiany pozostałych parametrów.

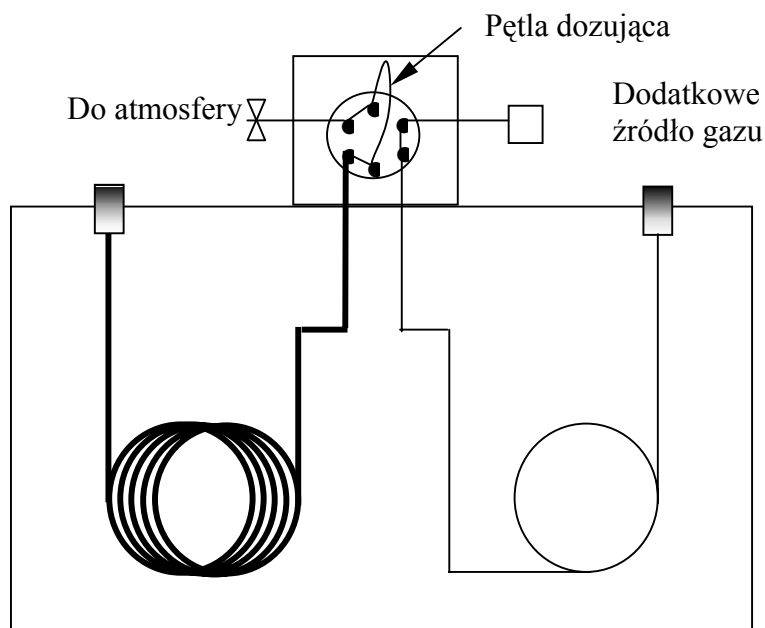
Modulacja bardzo lotnych analitów wymaga stosowania ciekłego azotu do chłodzenia. Powoduje to istotne podniesienie kosztów analizy, jak również komplikuje konstrukcję modulatora. Ze względu na koszty analizy ważne jest, aby zużycie ciekłego azotu przez modulator było jak najmniejsze. W zespole Autorów materiału opracowano ostatnio modulator kriogeniczny, który zużywa jedynie około 2 l ciekłego azotu na godzinę pracy dzięki odzyskowi ciepła i czynnika chłodzącego [28]. Jest to od dwóch do pięciu razy mniej niż dla modulatorów dostępnych komercyjnie lub opisanych w literaturze. Zmniejszenie zużycia ciekłego azotu powinno przyczynić się do szerszej akceptacji modulatorów na bazie ciekłego azotu w laboratoriach chromatograficznych.

4.2. Modulatory zaworowe

Modulatory zaworowe są mniej rozpowszechnione w technice GC x GC. Pierwszy modulator tego typu został opracowany w roku 1998 [29]. Modulator ten oparty jest na wykorzystaniu zaworu membranowego. Strumień gazu nośnego opuszczający I kolumnę przez większość czasu jest kierowany do atmosfery. W tym samym czasie strumień gazu nośnego z dodatkowego źródła był kierowany do II kolumny. Przełączenie zaworu na bardzo krótki czas powodowało skierowanie niewielkiej próbki strumienia z I kolumny do II kolumny. Zawór ponownie przełączano, co pozwalało na zarejestrowanie bez zakłóceń chromatogramu na wylocie II kolumny. Cały cykl powtarzany był w regularnych odstępach czasu aż do końca analizy. Metoda ta z natury rzeczy charakteryzowała się gorszą czułością, niż metody oparte na modulacji

termicznej. Przyczyną jest fakt, że podczas gdy w modulatorach termicznych cały materiał opuszczający I kolumnę jest poddawany analizie, w modulatorach zaworowych większość materiału jest wypuszczana do atmosfery, a analizie poddawane jest jedynie część próbki (10 do 20%) [9].

Znana jest interesująca odmiana modulatora zaworowego z pętlą dozującą [30] (rysunek 10). W przypadku tego modulatora natężenie przepływu strumienia gazu nośnego w II kolumnie jest dużo większe niż w I kolumnie (co najmniej 20x). Strumień gazu nośnego z I kolumny wraz z analitami przechodzi przez pętlę dozującą o objętości 20 μl , po czym jest wypuszczany do atmosfery. Co pewien czas zawór jest przełączany tak, że pętla dozująca jest dołączana do wlotu II kolumny. Ponieważ ciśnienie na wlocie II kolumny jest dużo większe, niż ciśnienie w pętli dozującej, próbka gazu w pętli zostaje fizycznie ściśnięta i wprowadzona do II kolumny w postaci wąskiego pasma. Metoda ta charakteryzuje się lepszą czułością niż metoda opisana w poprzednim paragrafie, ponieważ dzięki małemu natężeniu przepływu strumienia gazu w I kolumnie możliwe jest poddanie analizie znacznie większej części (ok. 80%) materiału opuszczającego I kolumnę (ilość materiału wypuszczana do atmosfery w czasie wprowadzenia materiału z pętli dozującej do II kolumny jest niewielka). Dodatkowo na wzrost czułości wpływa fizyczne zawężenie pasma nastrzyku w II kolumnie, nie występujące w przypadku stosowania klasycznego modulatora zaworowego [30]. Efekt ten jest jednak w każdym przypadku mniej istotny niż w przypadku modulatorów termicznych.



Rys. 10. Schemat budowy modulatora zaworowego z pętlą dozującą. Przepływ strumienia gazu nośnego w pierwszej kolumnie jest wolny. Przed ujściem do atmosfery, gaz ten (wraz z analitami) przechodzi przez pętlę dozującą. Przez drugą kolumnę płynie strumień gazu nośnego z dodatkowego źródła. Jego natężenie przepływu jest dużo większe, niż w pierwszej kolumnie. Po przestawieniu zaworu do pozycji dozowania zawartość pętli dozującej jest fizycznie ściśnięta pod dużo wyższym ciśnieniem panującym na wlocie drugiej kolumny i wprowadzona do tejże kolumny w postaci wąskiego pasma [8].

Fakt, że w modulatorach zaworowych duża część materiału z I kolumny jest wypuszczana do atmosfery i nie podlega analizie w obu wymiarach spowodował wiele dyskusji na temat tego, czy taki sposób prowadzenia analizy spełnia warunek kompletności. Sprawa została ostatecznie rozstrzygnięta podczas pierwszej międzynarodowej konferencji poświęconej GC x GC (First International Symposium on Comprehensive Multidimensional Chromatography), która miała miejsce w dniach 6-7 marca 2003 w Volendam (Holandia). Uczestnicy konferencji uzgodnili, że dopóty, dopóki modulatory zaworowe zapewniają pobieranie próbki materiału z I kolumny z częstotliwością wystarczającą do prawidłowego odtworzenia chromatogramu na wylocie tejże kolumny, technika ta może być uznana za kompletną. Czułość metod zaworowych jest mniejsza w porównaniu z metodami termicznymi ze względów opisanych powyżej, za to techniki te są generalnie tańsze i prostsze w realizacji, gdyż nie wymagają stosowania czynników chłodzących. Inną zaletą jest wyeliminowanie możliwości przebicia pułapki przez nawet najbardziej lotne anality (zawór fizycznie odcina dopływ analitów do II kolumny pomiędzy etapami dozowania). Modulatory zaworowe pozwalają też na stosowanie bardzo szybkiej analizy w II wymiarze (rzędu 1 s) ze względu na bardzo małą szerokość pasma dozowania uzyskiwanego w wyniku zastosowania modulatora zaworowego. Zaleta ta jest obecnie mniej istotna niż w przeszłości, gdyż współczesne modulatory kriogeniczne również zapewniają możliwość uzyskania wąskiego pasma na etapie wprowadzania próbki do kolumny. Główną wadą modulatorów zaworowych jest obecność zaworu membranowego w linii strumienia gazu nośnego. Jak dotąd nie opracowano zaworu membranowego, który mógłby pracować w temperaturach wystarczająco wysokich, aby wyeliminować sorpcję substancji trudnolotnych. Substancje takie w niższych temperaturach mogą się łatwo sorbować na elementach zaworu. Ogranicza to zakres zastosowań modulatorów zaworowych do oznaczania związków lotnych. Oznaczanie substancji takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne lub polichlorowane bifenyle nie jest jak dotąd możliwe z wykorzystaniem tej techniki.

Biorąc pod uwagę różnorodność modulatorów opisanych w literaturze i ilość możliwych kombinacji kolumn stosowanych w obu wymiarach, rodzi się w sposób naturalny pytanie, jak najlepiej prowadzić analizę z wykorzystaniem techniki GC x GC. Odpowiedź na to pytanie jest stosunkowo prosta – nie istnieje jedno najlepsze podejście. Wybór modulatora i kolumn chromatograficznych uzależnione są od rodzaju problemu. Dla przykładu, w analizie mieszanin zawierających składniki o wysokich temperaturach wrzenia (np. cięższe frakcje ropy naftowej) najlepszym wyjściem jest zastosowanie modulatora kriogenicznego chłodzonego za pomocą ciekłego CO₂ (ze względu na niższy koszt modulatora i czynnika chłodniczego w porównaniu z modulatorem chłodzonym za pomocą ciekłego azotu) oraz zestaw kolumn odpornych na wysokie temperatury. W analizie próbek zawierających substancje o dużej lotności (np. lotne związki organiczne obecne w powietrzu atmosferycznym) dużo lepsze wyniki można osiągnąć stosując modulatory kriogeniczne chłodzone za pomocą ciekłego azotu czy modulatory zaworowe.

5. ZASTOSOWANIA

Technika GC x GC ma wiele zalet, np. podwyższona zdolność rozdzielcza, większa czułość czy uporządkowana natura chromatogramów. Cechy te spowodowały, że technika GC x GC znajduje zastosowanie w wielu różnych dziedzinach. Początkowo technika ta była stosowana głównie w analizie próbek produktów ropopochodnych. Później zakres zastosowań znacznie się powiększył i obejmuje dziś na przykład analizę

środowiskową, analizę żywności, analizę kliniczną czy kryminalistykę. W tabeli 1 zestawiono przykłady zastosowań techniki GC x GC w różnych dziedzinach. Poniżej zamieszczono krótkie podsumowanie ciekawszych przykładów.

Próbki materiałów ropopochodnych są mieszaninami setek (a nawet tysięcy substancji). W niektórych przypadkach ważne jest scharakteryzowanie wszystkich składników takich próbek. Opisano szczegółowo [31] zastosowanie techniki GC x GC do analizy próbek takich, jak rozpuszczalniki na bazie węglowodorów alifatycznych, nafta, ropa naftowa czy frakcje olefinowe ropy. Uporządkowana natura chromatogramów pozwoliła na szybkie i łatwe jakościowe określenie składników próbki. Jednym z większych osiągnięć było całkowite rozdzielanie składników nafty. Możliwość GC x GC widać jeszcze lepiej w przypadku analizy próbek ropy naftowej, która jest niezwykle skomplikowaną mieszaniną tysięcy związków. Dzięki uporządkowanym chromatogramom możliwa jest łatwa identyfikacja różnych klas związków obecnych w ropie naftowej. Wielka zdolność rozdzielcza techniki GC x GC powoduje, że możliwe staje się oznaczanie wybranych śladowych składników ropy bez konieczności ich izolacji z matrycy, co nie jest możliwe w przypadku innych technik analitycznych.

W analizie środowiskowej najważniejsze zalety techniki GC x GC to znacznie lepsza zdolność rozdzielcza i wyższa czułość w porównaniu do klasycznej chromatografii gazowej. Dzięki dużej zdolności rozdzielczej często możliwe jest znaczne uproszczenie lub nawet całkowita eliminacja procedur wstępnego przygotowania próbki po etapie wzbogacania analitów. Składniki matrycy, które muszą być usunięte z próbki przed analizą z wykorzystaniem techniki konwencjonalnej chromatografii gazowej, są oddzielane od analitów chromatograficznie w technice GC x GC.

Jednym z większych osiągnięć techniki GC x GC w analizie środowiskowej było odkrycie licznych lotnych związków polarnych w powietrzu atmosferycznym z terenów zurbanizowanych [32]. Związki te nie były odkryte wcześniej ze względu na ich niskie stężenia i złożoną matrycę powietrza atmosferycznego w miastach. Główne składniki koeluowały ze śladowymi związkami polarnymi w przypadku konwencjonalnej analizy przeprowadzanej z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej. W analizie takiej wykrywano zazwyczaj jedynie 10-20 związków; w analizie z wykorzystaniem techniki GC x GC ilość wykrytych substancji wynosiła 100 do 200. Niektóre z tych substancji są potencjalnie szkodliwe dla człowieka nawet w bardzo niskich stężeniach [32].

Kompletne rozdzielanie i oznaczenie składników złożonych mieszanin, takich jak polichlorowane bifenyle (PCB) czy też polichlorowane dibenzodioksyny (PCDD) i dibenzofurany (PCDF) w próbkach środowiskowych jest od lat jednym z większych wyzwań w analizie środowiska. Choć często jedynie wybrane składniki tych mieszanin są szkodliwe, muszą one być oznaczane w złożonych mieszaninach zawierających związki o bardzo podobnych właściwościach (np. 209 pochodnych z grupy PCB). W analizie „konwencjonalnej” próbka musi być poddana wielu etapom przygotowania przed analizą, a prawidłowość identyfikacji musi być potwierdzona albo poprzez analizę na innej kolumnie chromatograficznej, albo poprzez zastosowanie wysokorozdzielczego spektrometru mas. Technika GC x GC pozwala na znacznie prostsze rozwiązanie tego problemu. Toksyczne związki, nawet należące do różnych klas, mogą być oznaczane w pojedynczej analizie i przy użyciu znacznie prostszego (i tańszego) detektora ECD. Przykłady takich oznaczeń znaleźć można w pracach [17] i [33].

W pracy [34] zademonstrowane zostało, jak zastosowanie techniki GC x GC może prowadzić do uproszczenia procesu przygotowania próbki w analizie próbek

żywności na obecność pestycydów. W pracy tej próbki seleru, w którym oznaczano pestycydy, zostały poszatkowane i wymieszane z octanem etylu i siarczanem sodu. Mieszanina ta została następnie rozdrobniona i odwirowana. Warstwa octanu etylu została usunięta i wysuszona nad siarczanem sodu przed wprowadzeniem do systemu GC x GC sprzęgniętego ze spektrometrem mas czasu przelotu (TOF-MS). Piki wszystkich 58 analitów zostały chromatograficznie oddzielone od składników matrycy i prawidłowo zidentyfikowane z dużym prawdopodobieństwem. Wszystkie składniki mogły też być prawidłowo oznaczone ilościowo pomimo tego, że nawet przy użyciu techniki GC x GC niektóre anality częściowo koeluowały ze składnikami matrycy. W tym przypadku pomocna była dekonwolucja pików na podstawie ich widm masowych, możliwa dzięki zastosowaniu TOF-MS na etapie detekcji. Dekonwolucja dała znacznie lepsze wyniki niż w „konwencjonalnej” analizie z wykorzystaniem techniki GC-TOF-MS ze względu na dużo lepsze chromatograficzne oddzielenie analitów od składników matrycy.

Technika GC x GC znalazła też zastosowanie w badaniach własności termodynamicznych związków chemicznych w całkowicie unikalny sposób. Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwe było scharakteryzowanie interkonwersji izomerów E/Z oksymów [35]. Kiedy mieszanina tych izomerów jest rozdzielana metodą chromatografii gazowej, wynik analizy zależy od temperatury. Jeśli temperatura jest zbyt niska, żeby pokonać wewnętrzną barierę aktywacji procesu interkonwersji, na chromatogramie występują dwa dobrze rozdzielone piki obu izomerów. Ze wzrostem temperatury pomiędzy pikami stopniowo pojawia się podwyższone *plateau*, które odpowiada cząsteczkom ulegającym interkonwersji pomiędzy jednym i drugim izomerem. Wielu badaczy było w stanie wyznaczyć teoretycznie stosunek ilości obu izomerów w dowolnym punkcie *plateau*, ale eksperymentalne potwierdzenie tych przewidywań nie było jak dotąd możliwe. Dzięki zastosowaniu techniki GC x GC możliwe stało się rozdzielenie mieszanin izomerów z rejonu *plateau* w II kolumnie chromatograficznej. Interkonwersja izomerów w II kolumnie nie występowała ze względu na bardzo krótki czas rozdzielania w drugim wymiarze. W rezultacie na wylocie II kolumny obserwowano dwa dobrze rozdzielone piki obu izomerów. Stosunek ilości tych izomerów w dowolnym punkcie pokrywał się z przewidywaniami teoretycznymi. Była to pierwsza bezpośrednia obserwacja tego typu zjawisk w chromatografii gazowej.

Tabela 1. Przegląd wybranych zastosowań i zalet techniki GC x GC .

Dziedzina zastosowań	Zalety w stosunku do 1-D GC	Odnosińki
Produkty ropopochodne / / Chemia organiczna	Wyższa zdolność rozdzielcza Uporządkowana natura chromatogramów znacznie ułatwia analizę grupową.	[15], [16], [31], [36], [37], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45]
Chemia żywności i substancji zapachowych	Wyższa zdolność rozdzielcza Możliwość oznaczenia śladowych analitów niewykrywalnych w przypadku zastosowania techniki 1-D GC Uproszczone przygotowanie próbki jeśli anality mogą być oddzielone chromatograficznie od składników matrycy.	[46], [47], [48], [49], [50], [51], [52], [53], [54], [55], [56]

Środowisko naturalne i ochrona zdrowia	Wyższa zdolność rozdzielcza Wyższa czułość Możliwość uproszczenia etapów przygotowania próbki Pojedyncza analiza z wykorzystaniem techniki GC x GC często jest w stanie zastąpić wiele analiz metodą konwencjonalnej chromatografii gazowej (np. analiza analitów z grupy PCB) .	[17], [20], [32], [33], [34], [57], [58], [59], [60], [61], [62], [63], [64], [65], [66], [67], [68], [69]
Kryminalistyka	Wyższa zdolność rozdzielcza Dzięki uporządkowanej naturze chromatogramów rozpoznawanie obrazów i porównywanie ich ze wzorcem jest łatwiejsze i bardziej wiarygodne.	[16], [70], [71]

LITERATURA

- [1.] J. C. Giddings, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1258A-1270A
- [2.] J.B. Phillips, Z. Liu, *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 227-231
- [3.] W. Bertsch, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 647-665.
- [4.] J.B. Phillips, J. Xu, *J. Chromatogr. A.* **1995**, 703, 327-334.
- [5.] P. Marriott, R. Shellie, *Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, 573-583.
- [6.] J. Dallüge, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1000, 69-108.
- [7.] P. Schoenmakers, Ph. Marriot, J. Beens, Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography. LC-GC Europe, June 2003
- [8.] T. Górecki, J. Harynuk, O. Panić, "The Evolution of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC x GC)", submitted to *J. Sep. Sci.*
- [9.] M. Pursch, K. Sun, B. Winniford, H. Cortes, A. Weber, T. McCabe, J. Loung, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 356-367.
- [10.] R. Murphy, M. Schure, J. Foley, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1585-1594.
- [11.] R.C.Y. Ong, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, 40, 276-291.
- [12.] A.L. Lee, K.D. Bartle, A.C. Lewis, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1330-1335.
- [13.] J. Harynuk, T. Górecki, C. Campbell. *LC-GC North America*, **2002**, 20, 876-892.
- [14.] J. Beens, H. Boelens, R. Tijssen, J. Blomberg, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 47-54.
- [15.] P. J. Schoenmakers, J. L. M. M. Oomen, J. Blomberg, W. Genuit, G. van Velzen, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 29-46
- [16.] R. B. Gaines, G. S. Frysinger, M. S. Hendrick-Smith, J. D. Stuart. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 2106-2112.
- [17.] M. Harju, P. Haglund, *J. Microcol. Sep.* **2001**, 13, 300-305.
- [18.] L. L. P. van Stee, J. Beens, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman, Presented at the First International Symposium on Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography, Vollandam, the Netherlands, March 6-7, 2003.
- [19.] F. C.-Y. Wang, F. P. DiSanzo, F. C. McElroy, Presented at the First International Symposium on Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography, Vollandam, the Netherlands, March 6-7, 2003.
- [20.] J. Dallüge, L. L. P. van Stee, X. Xu, J. Williams, J. Beens, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A.* **2002**, 974, 169-184.
- [21.] J.B. Phillips, R. B. Gaines, J. Blomberg, F. W. M. van der Wielen, J.-M. Dimandja, V. Green, J. Granger, D. Patterson, L. Racovalis, H.-J. de Geus, J. de Boer, P. Haglund, J. Lipsky, V. Sinha, E.B. Ledford, Jr. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 3-10.
- [22.] J. Harynuk, T. Górecki, *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 304-310.
- [23.] J. Harynuk, T. Górecki, *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 304-310.
- [24.] R. M. Kinghorn, P. J. Marriott, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 620-622.
- [25.] E.B. Ledford, C. Billesbach, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 202-204
- [26.] J. Beens, M. Adahchour, R. J. J. Vreuls, K. van Altena, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 919, 127-132
- [27.] E.B. Ledford, C. Billesbach, J. Termaat, Presented at Pittcon 2002, March 17-22 2002, New Orleans, LA. Contribution #2262P.
- [28.] J. Harynuk, T. Górecki, *J. Chrom. A*, **2003**, 1019 (1-2), 53-63.
- [29.] C. A. Bruckner, B. J. Prazen, R. E. Synovec. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2796-2804.
- [30.] J.V. Seeley, F. Kramp, C.J. Hicks, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4346-4352.
- [31.] J. Beens, J. Blomberg, P.J. Schoenmakers, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23(3), 182-188.

- [32.] A.C. Lewis, N. Carslaw, P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, P. Morrison, A.L. Lee, K.D. Bartle, M.J. Pilling, *Nature*. **2002**, 404, 15 June, 778-781.
- [33.] P. Korytar, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*. **2002**, 958, 203-218.
- [34.] J. Dallüge, M. van Rijn, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*. **2002**, 965, 207-211.
- [35.] P. Marriott, O. Trapp, R. Shellie, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*. **2001**, 919, 115-126.
- [36.] C.J. Venkatramani, J. B. Phillips, *J. Microcol. Sep.* **1993**, 5, 511-516
- [37.] G. S. Frysinger, R. B. Gaines, L., Xu, C. M. Reddy, *Environ. Sci. Technol.*, **2003**, 37, 1653-1662
- [38.] J. Blomberg, P.J. Schoenmakers, *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, 20, 539-544.
- [39.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, E.B. Ledford, Jr., *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22(4) 195-200.
- [40.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22(5), 251-255.
- [41.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 87-96.
- [42.] J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 2000, 19(4), 260-274.
- [43.] B.J. Prazen, K.J. Johnson, A. Weber, R.E. Synovec, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5677-5682.
- [44.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23(3), 197-201.
- [45.] M. van Deursen, J. Beens, J. Reijenga, P. Lipman, C. Cramers, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23(7/8), 507-510.
- [46.] P. Marriott, R. Shellie, J. Fergus, R. Ong, P. Morrison, *Flavour Frag. J.* **2000**, 15, 225-239.
- [47.] R. Shellie, L. Mondello, P. Marriott, G. Dugo, *J. Chromatogr. A*. **2002**, 225-234.
- [48.] Y. Shao, P. Marriott, R. Shellie, H. Hügel, *Flavour Frag. J.* **2003**, 18, 5-12.
- [49.] J-M.D. Dimandja, S.B. Stanfill, J. Grainger, D. G. Patterson, Jr. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23(3), 208-214.
- [50.] R. Shellie, P. Marriott, C. Cornwell, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23(9), 554-560.
- [51.] R. Shellie, P. Marriott, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5426-5430.
- [52.] R.J. Western, S. S. G. Lau, P. J. Marriott, P. D. Nichols, *Lipids*, **2002**, 37, 721-730.
- [53.] H-J. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J.B. Luten, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*. **2001**, 910, 95-103.
- [54.] Y. Shao, P. Marriott, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 635-642
- [55.] M. Adahchour, J. Beens, R. J. J. Vreuls, A. M. Batenburg, E. A. E. Rosing, U. A. Th. Brinkman, *Chromatographia*, **2002**, 55, 361-367
- [56.] P.J. Marriott, R. Shellie, C. Cornwell, *J. Chromatogr. A*. **2001**, 936, 1-22.
- [57.] R.M.M. Perera, P.J. Marriott, I.E. Galbally, *Analyst*. **2002**, 127, 1601-1607.
- [58.] J-M.D. Dimandja, J. Grainger, D.G. Patterson, Jr., W.E. Turner, L.L. Needham, *J. Exposure Analysis Environ. Epidemiol.* **2000**, 10, 761-768.
- [59.] P. Haglund, M. Harju, R. Ong, P. Marriott, *J. Microcolumn Sep.* **2001**, 13(7), 306-311.
- [60.] T. Hyötyläinen, M. Kallio, K. Hartonen, M. Jussila, S. Palonen, M-J. Riekkola, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4441-4446.
- [61.] R.B. Gaines, E.B. Ledford, Jr., J.D. Stuart, *J. Microcol. Sep.* **1998**, 10(7), 597-604.
- [62.] J.B. Phillips, J. Xu, *Organohalogen Compounds*. **1997**, 31, 199-202.
- [63.] D.G. Patterson, Jr., J.R. Barr, E.S. DiPietro, J. Granger, V.E. Green, C.R. Lapeza, Jr., V.L. Maggio, P.C. McClure, S. Sirimanne, W.E. Turner, *Organohalogen Compounds*. **1996**, 27, 309-314.
- [64.] Z. Liu, S.R. Sirimanne, D.G. Patterson, Jr., L.L. Needham, *Anal. Chem.* **1994**, 66(19), 3086-3092.
- [65.] H.-J. de Geus, J. de Boer, U. A. Th. Brinkman, *Chromatographia*, **2002**, 55, 339-344.
- [66.] J. V. Seeley, F. J. Kramp, K. S. Sharpe, *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 444-450
- [67.] J. Beens, J. Dallüge, M. Adahchour, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman, *J. Microcol. Sep.*, **2001**, 13, 134-140
- [68.] J. V. Seeley, F. J. Kramp, K. S. Sharpe, S. K. Seeley. *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 53-59.
- [69.] C. M. Reddy, T. I. Eglinton, A. Hounshell, J. K. White, L. Xu, R. B. Gaines, G. S. Frysinger, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 4754-4760
- [70.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, *J. Forensic Sci.* **2002**, 47(3), 471-482.
- [71.] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, C.M. Reddy, *Environ., Forensics*. **2002**, 3, 27-34.