

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

XXXVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

26. - 28. 5.2003

Skalský Dvůr

**Odborná skupina pro potravinářskou a agrikulturní chemii České
společnosti chemické**

Odbor potravinářské techniky a technologie ČAZV

Odbor výživy obyvatelstva a jakosti potravin ČAZV

Výzkumný ústav potravinářský Praha

Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha

**Ed. Holasová M., Fiedlerová V., Špicner J.
VÚPP, Praha 2003**

ISBN 80-902671-6-5

NOVÁ DIMENZE V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII: GC×GC

Čajka T.¹, Hajšlová J.¹, Zrostlíková J.²

1-Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

2-LECO Instrumente Pilsen, Application Laboratory Prague, Sokolovská 219, 190 00 Praha 9

1. ÚVOD

V posledních letech se stává stále významnější analýza komplexních směsí, např. vzorků pocházejících z petrochemického průmyslu, potravin (obsahujících mimo jiné řadu chuťových a vonných látek), a dále vzorků sedimentů a biot, ve kterých je možno identifikovat řadu prioritních polutantů. Konvenční plynová chromatografie (1D-GC), která využívá pro separaci kapilárních kolon, nabízí značnou kapacitu píků. V případě, že analytik usiluje o separaci většiny (popř. všech) komponent z již zmíněných komplexních směsí dochází obvykle k jejímu selhání. Z toho důvodu je nutno provádět komplikovanou úpravu vzorku za použití např. vícestupňové extrakce na pevnou fázi (SPE), gelové permeační chromatografie (GPC), kapalinové chromatografie (LC), případně multidimensionálních technik, jako „heart-cut“ GC, které však často charakterizují pouze část vzorku.

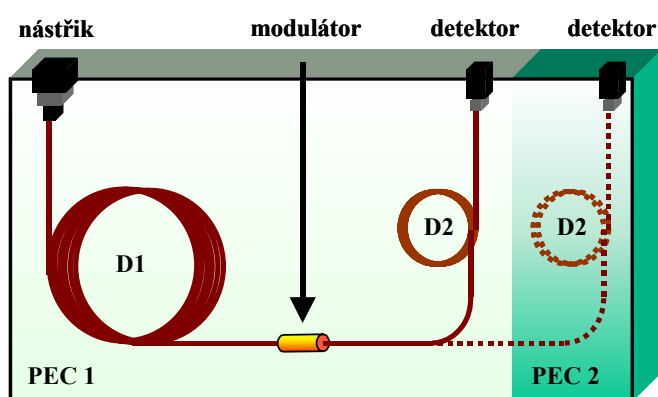
V současnosti se jako velmi vhodná pro analýzu komplexních vzorku jeví technika orthogonální dvourozměrné plynové chromatografie (*comprehensive two-dimensional gas chromatography*, GC×GC) z důvodu značného zvýšení separačního potenciálu, který je pro úspěšnou separaci sloučenin v takto komplikovaných směsích nutný.

2. PRINCIP A VÝHODY GC×GC

Principem techniky GC×GC je separace vzorku na dvou kapilárních kolonách, které mají zcela odlišný separační mechanismus (orthogonální separační podmínky). Separace v GC je v podstatě řízena dvěma faktory:

- těkavostí analytů;
- interakcí analytů se stacionární fází.

Jelikož je při použití nepolární kolony hlavním parametrem separace těkavost, důsledkem je separace podle bodu varu. Využitím polární kolony je separace řízena především interakcí analytů se stacionární fází (vodíkové vazby, π - π interakce, sterický efekt, apod.)



Vlastní instrumentace se skládá ze dvou chromatografických kolon, mezi kterými je modulátor, který přenáší část efluentu z první kolony na druhou kolonu v rychlých intervalech (1–10 s). **Obr. 1** ilustruje obecnou sestavu GC×GC se dvěma kolonami (D1 a D2) a s možností umístění druhé kolony ve společné nebo oddělené peci.

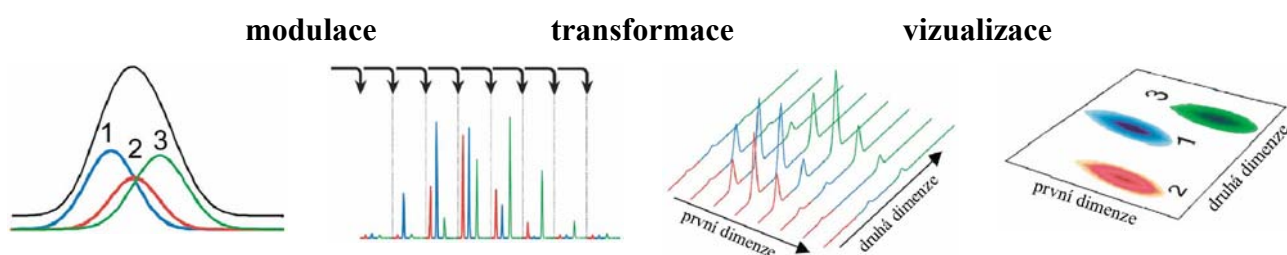
Obr. 1. Schéma GC×GC systému

Mezi hlavní výhody této techniky, oproti konvenčním systémům, patří:

- **zvýšení kapacity píků**, tj. maximálního počtu chromatografických píků, které mohou být umístěny vedle sebe v chromatogramu;

- **zlepšení detekce** analytů v důsledku redukce šířky píků ve srovnání s „klasickou“ plynovou chromatografií a zlepšení poměru signálu k šumu (S/N);
- **tvorba uspořádaných chromatogramů**, tzn. že ve dvourozměrných vrstevnicových diagramech jsou přítomny charakteristické řady, ve kterých jsou rozděleny jednotlivé sloučeniny z homologické série podle těkavosti a podle polarity.

Primární GC×GC chromatogram se skládá ze značného počtu chromatogramů druhé dimenze, které jsou jeden vedle druhého skládány (transformovány) za vzniku dvourozměrných (2D) chromatogramů. Osy tohoto 2D chromatogramu představují retenční časy na první a druhé koloně. Vhodný způsob vizualizace daných chromatogramů usnadňující interpretaci je prostřednictvím vrstevnicových diagramů, ve kterých vyjadřují barvy a stínování intenzitu signálu (**Obr. 2**).



Obr. 2. Tvorba a vizualizace GC×GC chromatogramu

3. INSTRUMENTACE GC×GC

3.1 Kolony

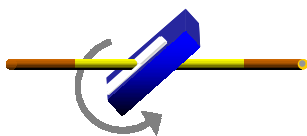
Kolony používané v první dimenzi obsahují většinou nepolární stacionární fázi (např. 100 % dimethylpolysiloxan nebo 5 % fenyl 95 % dimethylsiloxan), což znamená, že je separace založená především na rozdílné těkavosti přítomných sloučenin (separace podle bodu varu). Délka kolon bývá většinou 10–30 m s vnitřním průměrem 0,25–0,32 mm a tloušťkou filmu 0,1–1 μm.

Vzhledem k tomu, že by kolona v druhé dimenzi měla poskytovat „bleskovou“ separaci (v řádu několika sekund), používají se především krátké a úzké kolony; obvyklá délka kolon je 1 m s vnitřním průměrem 0,1 mm a tloušťkou filmu 0,1 μm. Jako stacionární fáze v druhé dimenzi slouží především polární sorbenty, např. 35–50 % fenyl 65–50 % dimethylsiloxan, polyethylenglykol (Carbowax), 14 % kyano-propylfenyl.

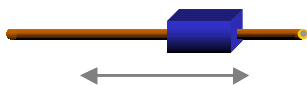
3.2 Modulace

Modulační zařízení může být v nadsázce považováno za „srdce“ GC×GC systému. Z toho důvodu byla této části systému při vývoji věnována značná pozornost, s cílem vyvinout robustní a uživatelsky přívětivý modulátor s širokým aplikačním rozsahem. Nezávisle na typu modulátoru však musí tato část plnit tři funkce:

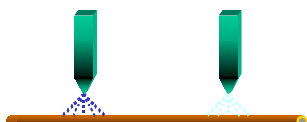
- kontinuálně hromadit nebo zachytávat malé sousedící frakce efluentu z první kolony, zatímco probíhá separace v první dimenzi;
- zaostřit zachycené frakce buď v čase nebo v prostoru;
- přenést zaostřené frakce v úzkých pulzech na kolonu druhé dimenze.



Obr. 3. „Sweeper“ modulátor



Obr. 4. Podélný kryogenní modulátor



Obr. 5. Dvoustupňový tryskový modulátor

První komerčně dostupný modulátor, tzv. „Sweeper“ (Obr. 3) obsahoval navíc kromě vlastního zařízení krátkou kapiláru uvnitř potaženou vrstvou tlustého filmu, která sloužila k zadržení a kumulaci analytů z první kolony. Přenesení analytů bylo dosaženo ohřevem kapiláry pohybujícím se štěrbinovým ohříváčem.

Další vývoj vedl ke konstrukci podélného kryogenního modulátoru (Obr. 4) využívajícího pro kryogenní zachycení a zaostření analytů v prvních centimetrech druhé kolony expandovaný kapalným oxid uhlíčitý. Přenesení frakce je dosaženo pohyblivým podélným modulátorem a ohřevem místa, které obsahuje zaostřenou frakci pomocí vzduchu GC pece.

Jinou alternativu představuje kryogenní systém složený pouze ze systému trysek (Obr. 5), který neobsahuje pohyblivé části a je tak i více robustní. Pro zadržení analytů je používán kryogenní způsob (expandovaný CO₂ nebo dusík zchlazený na -180 °C). Přenesení analytů na kolonu druhé dimenze je dosaženo buď (i) vypnutím modulátoru – přičemž vzduch pece zahřívá kapiláru, nebo (ii) za použití pulzu horkého vzduchu.

3.3 Detekce

Jelikož se šířky pík z druhé dimenze pohybují od 100 do 600 ms, je možno používat pro detekci pouze detektory s velkou akviziční rychlostí (100 Hz). Tomuto požadavku vyhovují především konvenční detektory, tj. plamenoionizační – FID a elektronového záchytu – (μ)ECD. Nevýhodou těchto detektorů je však absence spektrálních informací. Hmotnostní detektory s analyzátoři typu kvadrupól či iontová past nejsou použitelné, neboť tyto přístroje mají ve většině případů akviziční rychlost do 10 scanů.s⁻¹. Řešením je použití průletového hmotnostního spektrometru (*time-of-flight*, TOF) s vysokou akviziční rychlostí (až 500 spekter.s⁻¹), čímž dojde ke zvětšení potenciálu o další dimenzi, kterou představuje spektrální informace.

4. PŘÍKLADY APLIKACÍ TECHNIKY GC×GC V ANALÝZE POTRAVIN

Analýza pesticidů může v konvenčním systému 1D-GC–MS představovat problém, jelikož není často možné od sebe dostatečně separovat nejen cílové analyty mezi sebou, ale rovněž analyty od matrice vzorku. Při identifikaci se tak analytik musí spoléhat jen na malý počet vybraných iontů (vzhledem k citlivosti v režimu SIM), než na kompletní hmotnostní spektrum. Značného zlepšení v separaci bylo dosaženo v případě GC×GC–TOF-MS, kde mohou být u částečně koeluovaných píků získaná hmotnostní spektra matematicky separována (tj. dekonvoluována), čímž se dosáhne další kvality hmotnostního spektra a zvětšení počtu píků, které mohou být dále identifikovány. Navíc je možné díky separačnímu mechanismu techniky GC×GC, odseparovat od cílového analytu interferující složky matrice [1].

Analýza mastných kyselin představuje značný problém z důvodu jejich důležité role v lidské dietě. Mastné kyseliny jsou obvykle analyzovány po převedení na methylestry s následnou 1D-GC separací. Značné množství sloučenin, často s obdobou strukturou, komplikuje separaci v běžně používaném 1D systému. Z tohoto důvodu byl proveden pokus zvýšit celkové rozlišení použitím GC×GC jako alternativní separační techniky. Za použití techniky GC×GC dochází k separaci mastných kyselin v souladu s jejich počtem dvojitých vazeb – od žádné dvojných vazby (saturované mastné kyseliny) do šesti dvojných vazeb. Retence v druhé dimenzi se zřetelně zvyšuje s počtem dvojných vazeb. Důležitým výsledkem tak je skutečnost, že počet atomů uhlíku a počet dvojných vazeb „neznámé“ mastné kyseliny může být velmi jednoduše předpovězen z pozice ve

vrstevnicovém GC×GC chromatogramu. Díky lepší separaci došlo rovněž ke zlepšení kvantifikace, především minoritních mastných kyselin [2].

Polychlorované bifenyly jsou rutinně analyzovány v různých druzích ryb, na tuk bohatých potravinách a v environmentálních vzorcích. Během posledního desetiletí se zájem obrátil především na analýzu non-, mono- a di-*ortho* PCB, jelikož jejich toxicita je podobná jako u obávaných polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD, PCDF). Navzdory řadě pokusů není možno provést kompletní separaci všech 100–150 PCB přítomných v technických směsích PCB v 1D-GC konfiguraci. Dalším problémem je skutečnost, že především non-*ortho* PCB se nachází na hladinách o několik řádů nižších než majoritní PCB. Z tohoto důvodu je nutné provádět frakcionaci. Teprve technika GC×GC dovolila provést separaci značné části kongenerů bez předchozí frakcionace. Při vhodné konfiguraci je rovněž možno stanovit v jedné analýze i vybrané polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny a dibenzofurany [3].

5. ZÁVĚR

Technika GC×GC poskytuje velmi podrobný a rychlý obraz velmi komplexních vzorků. Hlavní výhody lze shrnout následovně:

- Dovoluje separaci komplexních vzorků na velkou řadu individuálních píků. Tyto píky mohou být snadno rozříděny do skupin.
- Poskytuje vyšší rozlišení a vzrůst citlivosti vzhledem ke klasické 1D-GC, což dovoluje přesné stanovení nízkých obsahů specifikovaných sloučenin v komplexních vzorcích.
- Může poskytnout rozdělení podle bodu varu souběžně pro řadu různých skupin sloučenin.
- Poskytuje prostředek pro confirmaci existujících a nově vyvíjených analytických metod.

6. REFERENCE

- [1] J. Dallüge, M. van Rijn, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 965 (2002) 207.
- [2] H.-J. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J.B. Luten, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 910 (2001) 95.
- [3] P. Korytár, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 958 (2002) 203.

Tato studie byla realizována v rámci výzkumného záměru 223300004 „Zlepšování kvality potravin a zajištění optimální výživy obyvatelstva“, část „Kontaminanty a další biologicky aktivní látky“.