

Πολυσταδιακή αεριοχρωματογραφία

Ε. Μπακέας
2016

Το αναλυτικό πρόβλημα.....

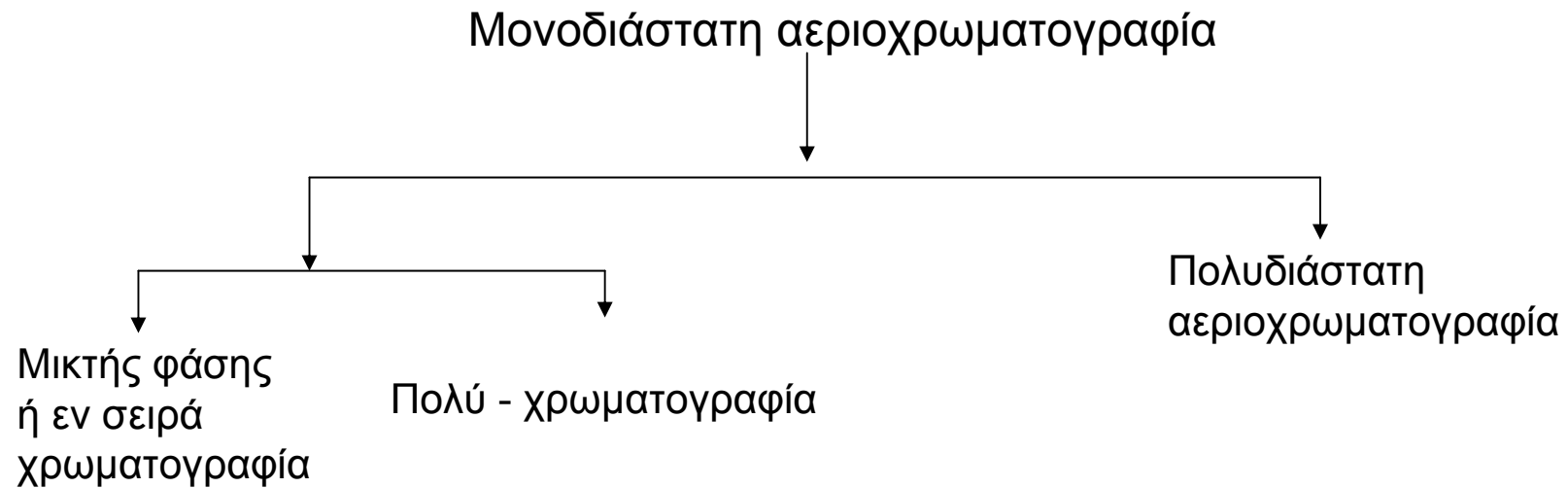
- Στην αεριοχρωματογραφία η εκλεκτικότητα της στατικής φάσης εξαρτάται από τις διαφορές στην κατανομή των ενώσεων μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης
- Η εκλεκτικότητα ποικίλει για διαφορετικές τάξεις ενώσεων
- Μέγιστη εκλεκτικότητα δεν εξασφαλίζει μέγιστη διαχωριστικότητα

Το αναλυτικό πρόβλημα.....

- Η χρήση αλγορίθμων από ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες (IR, MS) απαιτεί πλήρη διαχωρισμό της προσδιοριζόμενης κορυφής
- Κατά το διαχωρισμό μέσης πολυπλοκότητας μιγμάτων (~50 ενώσεις) με μονοδιάστατη αεριοχρωματογραφία και με τη χρήση στήλης με συντελεστή ικανότητας κορυφών 100 μόνο το 18% των ενώσεων διαχωρίζονται πλήρως και όχι περισσότερο του 37% του θεωρητικού αριθμού παρατηρείται
- Η χρήση συστημάτων υψηλής διαχωριστικότητας είναι ιδιαίτερα απαραίτητη

- Μονοδιάστατη αεριοχρωματογραφία = χρήση μίας στατικής φάσης
- Πολυσταδιακή αεριοχρωματογραφία = χρήση περισσότερων της μίας στατικής φάσης

Εξέλιξη αεριοχρωματογραφίας

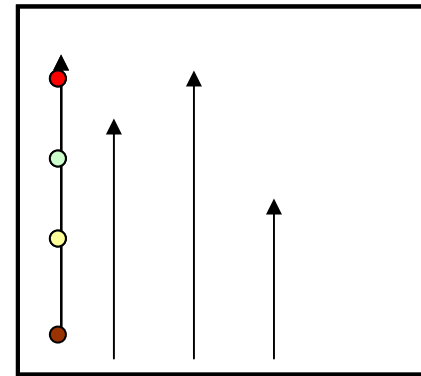


- ένα απλό παράδειγμα διαχωρισμού δύο διαστάσεων με τη χρήση TLC :

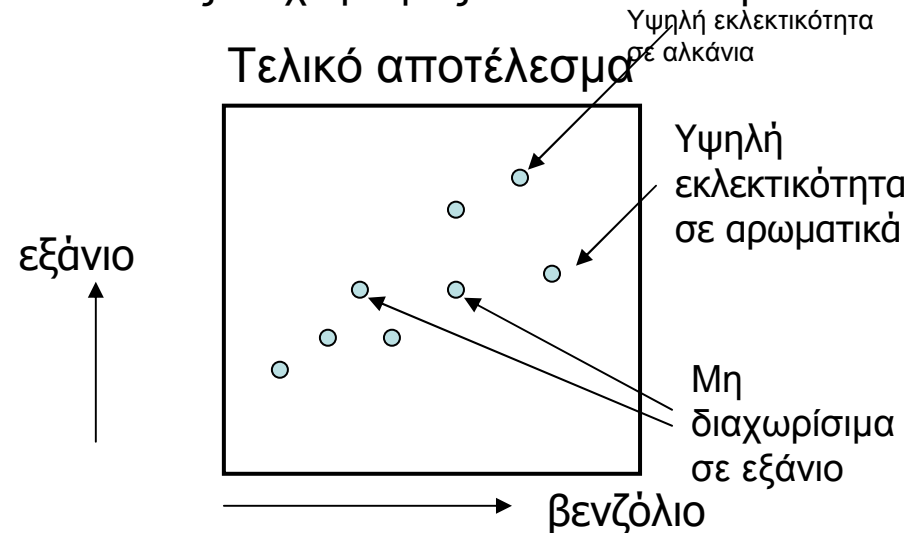
- Πρώτος διαχωρισμός σε 1 διάσταση (π.χ. εξάνιο)
- Κατόπιν διαχωρισμός σε μία 2^η διάσταση (με τη χρήση δευτέρου διαλύτη -π.χ. βενζόλιο)

– GC x GC η πιο κοινή πολυδιάστατη ενόργανη μέθοδος ανάλυσης

1ος διαχωρισμός σε 1 διάσταση

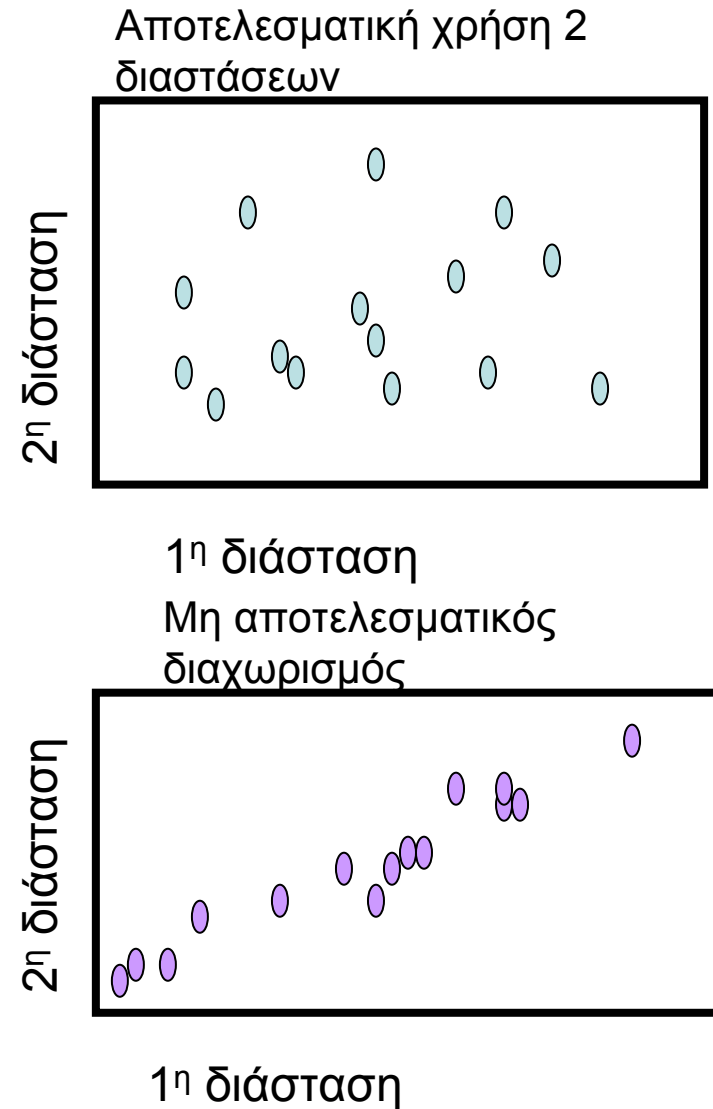


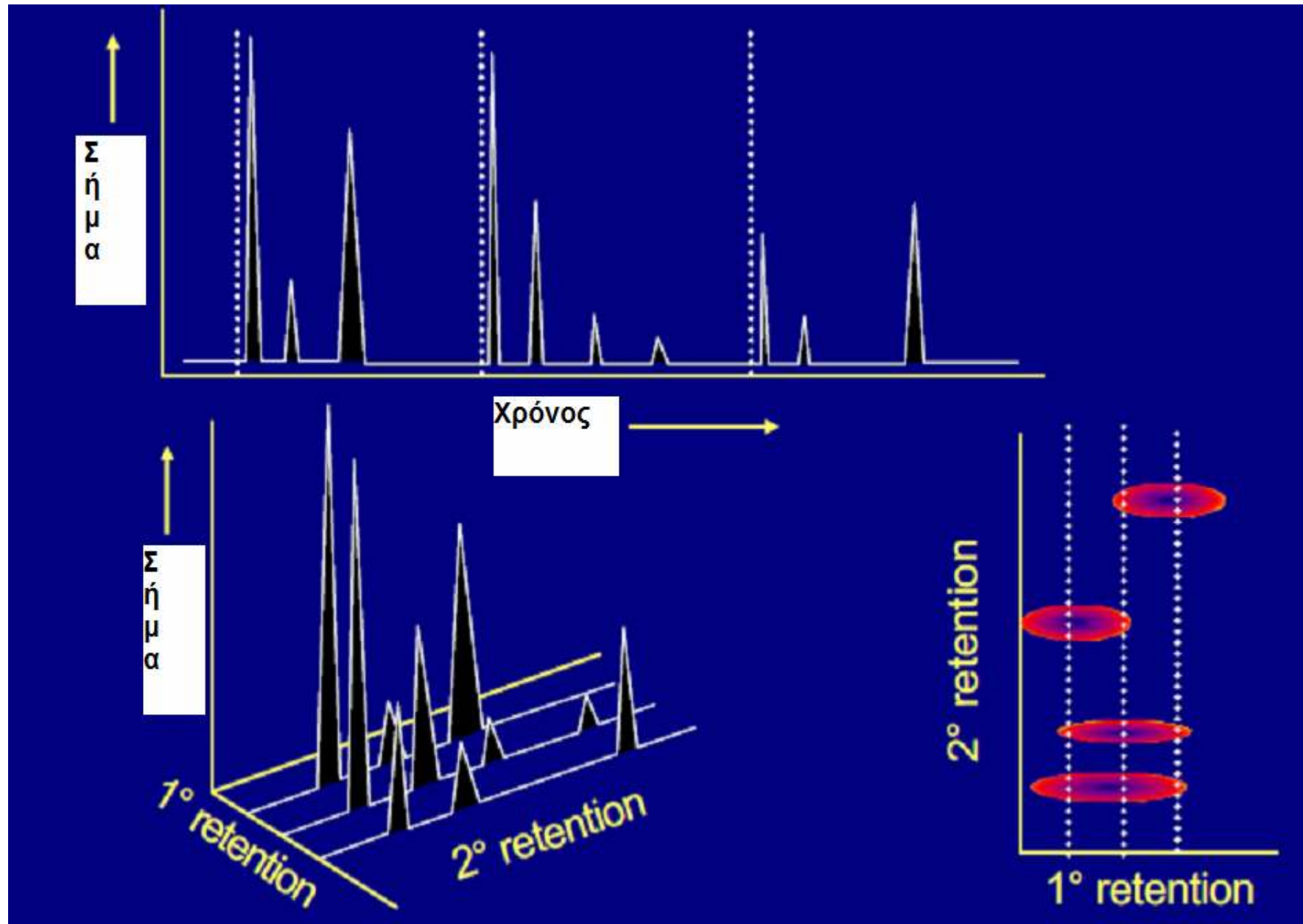
2ος διαχωρισμός σε 2 διάσταση



GCxGC

- Αποτελεσματικότητα της μεθόδου
 - Χρήσιμη όταν οι στατικές φάσεις και τα δείγματα επιλέγονται έτσι ώστε η 2^η διάσταση επιτυγχάνει επιπλέον διαχωρισμό
 - Μη χρήσιμη όταν η 2^η διάσταση δεν συνεισφέρει σημαντικά Not (π.χ. ίδια πολικότητα για όλες τις ενώσεις)
 - Οι βασικές αρχές διαχωρισμού στις δύο διαστάσεις θα πρέπει να είναι "ορθογώνιες" (διαφορετικές αρχές)





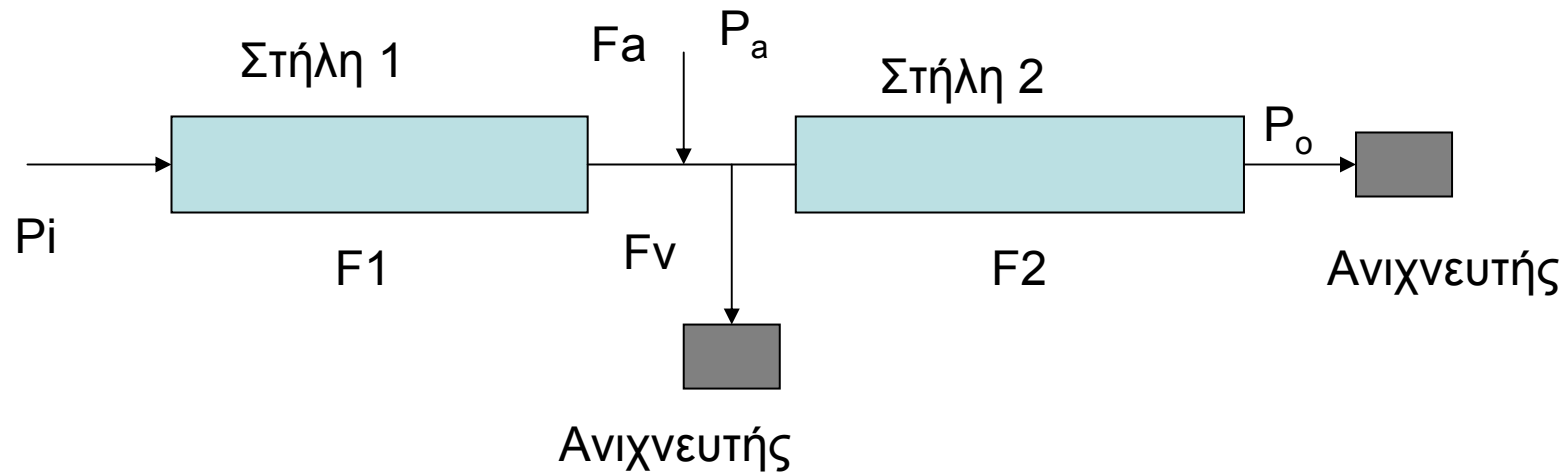
Πλεονεκτήματα

- Προσδιορισμός οργανικών ενώσεων C_5-C_{25}
- Πολύ χρήσιμη στην ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων όπου η μονοδιάστατη αεριοχρωματογραφία δεν διαθέτει την απαραίτητη διαχωριστική ικανότητα
- Υψηλή χωρητικότητα κορυφών και ευρεία επιλογή εκλεκτικότητας
- Τυπικός χρόνος ανάλυσης περίπου 30 min
- Διαθέσιμες αρκετές μέθοδοι δειγματοληψίας/εισαγωγής του δείγματος
- Υψηλή ευαισθησία (sub-ppt)
- Αυξημένη ικανότητα ανίχνευσης
- Ικανή γραμμική περιοχή (τουλάχιστον 3 τάξεις μεγέθους)

- Στην μικτής φάσης ή εν σειρά αεριοχρωματογραφία οι στατικές φάσεις τοποθετούνται είτε στην ίδια στήλη εν σειρά η σε διαφορετικές στήλες οι οποίες συνδέονται εν σειρά
- Στην μικτής φάσης ή εν σειρά αεριοχρωματογραφία η σχετική συνεισφορά των επιμέρους φάσεων είναι καθορισμένη a priori και δεν μεταβάλλονται. Ουσιαστικά έχουμε μία νέα στήλη με καθορισμένη εκλεκτικότητα

- Στην πολύ-χρωματογραφία έχουμε και πάλι σύνδεση δύο στηλών διαφορετικής στατικής φάσης στη σειρά αλλά η εκλεκτικότητα του νέου συστήματος μπορεί να ποικίλει ρυθμίζοντας κάποιες παραμέτρους.

Σύστημα πολυ-χρωματογραφίας

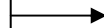


Με ρύθμιση της πίεσης του φέροντος αερίου κάθε φορά στο σημείο σύνδεσης των δύο στηλών P_a , έχουμε κάθε φορά ένα «νέο» σύστημα αεριοχρωματογραφίας με διαφορετική εκλεκτικότητα

Βασικές σχέσεις.....

Στήλη 1
 $t_{m1}, t_{R1}, t'_{R1}, k_1, L_1, r_1, F_1$

Στήλη 2
 $t_{m2}, t_{R2}, t'_{R2}, k_2, L_2, r_2, F_2$



Σύστημα πολύ-χρωματογραφίας

$$t_{ms} = t_{m1} + t_{m2}$$

$$t_{Rs} = t_{R1} + t_{R2}$$

$$F_1 + F_a = F_2 + F_v$$

Βασικές σχέσεις.....

$$k_s = k_1 \times \varphi_1 + k_2 \times \varphi_2$$

όπου:

k = συντελεστής εκλεκτικότητας

φ = σχετική ανασχεσιμότητα ($\varphi_1 = t_{m1}/t_{ms}$)

Δηλαδή:

- Ο συντελεστής εκλεκτικότητας του συστήματος είναι γραμμική συνάρτηση της σχετικής ανασχεσιμότητας κάθε στήλης
- Γραφική παράσταση του φ_i vs k_s θα αποτελεί ευθεία με όρια τα k_1 και k_2 και κλίση ίση με τη διαφορά των k_1, k_2 .

Εισαγωγέας

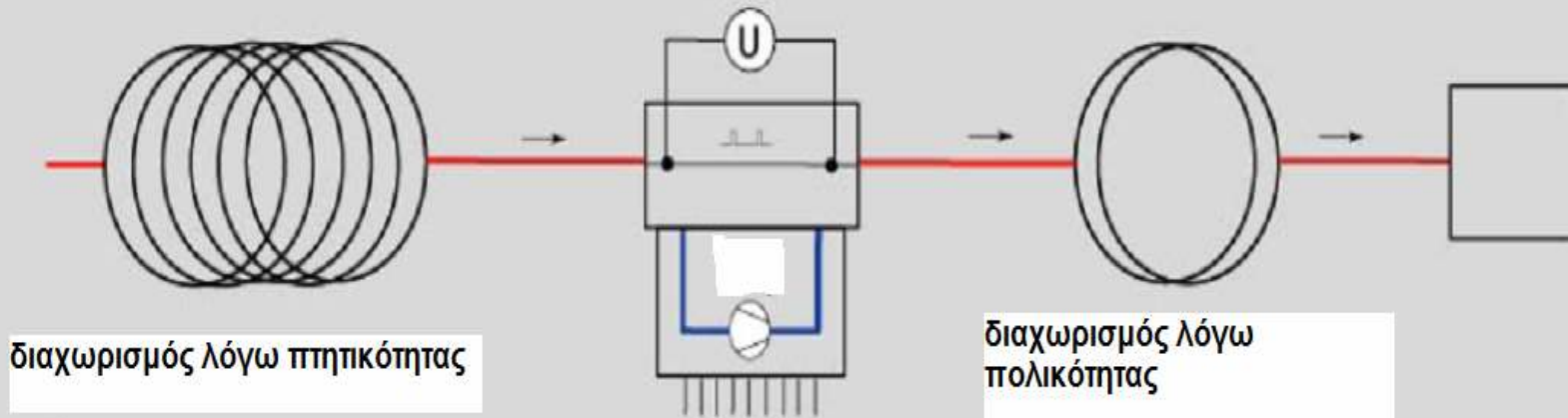
Αεριοχρωματογραφική στήλη 1

Σημείο σύνδεσης

Αεριοχρωματογραφική στήλη 2

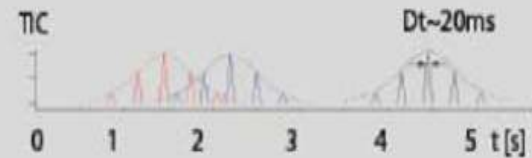
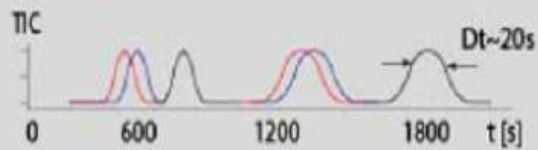
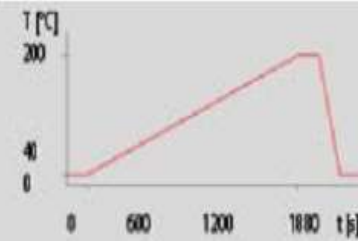
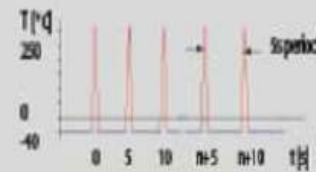
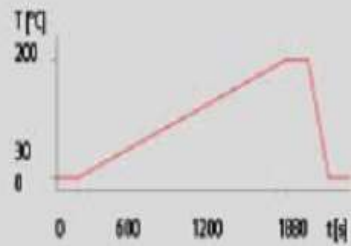
Ανιχνευτής

H_2
φέρων αέριο



διαχωρισμός λόγω πητικότητας

διαχωρισμός λόγω πολικότητας



Πολυδιάστατη αεριοχρωματογραφία

- Στην πολυδιάστατη αεριοχρωματογραφία το σύστημα αποτελείται από μία κυρίως στήλη (προστήλη) όπου τμήματα του δείγματος καθώς εξέρχονται από αυτήν οδηγούνται μέσω ειδικών διατάξεων (κρυοπαγίδες, βαλβίδες) σε άλλες στήλες (αναλυτικές στήλες) προς περαιτέρω διαχωρισμό τους.

Στην περίπτωση τέτοιων συστημάτων λόγω του ότι μόνο μερικές επιλεγμένες κορυφές μεταφέρονται στη δεύτερη στήλη σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι παρεμποδίσεις από προηγούμενες ή επόμενες κορυφές περιορίζονται σημαντικά με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός στη δεύτερη στήλη να είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητος αυτού στην πρώτη στήλη. Στα δύο σχήματα παρουσιάζεται ο διαχωρισμός του ίδιου κλάσματος σε σύστημα δύο στηλών εν σειρά και σε σύστημα πολυδιάστατης αεριοχρωματογραφίας. Στη δεύτερη περίπτωση ο διαχωρισμός είναι πληρέστερος

Figure 1: Selectivity-tuned GC system: Representative relative peak positions (a) at the column 1-column 2 juncture and (b) after transiting the second column.

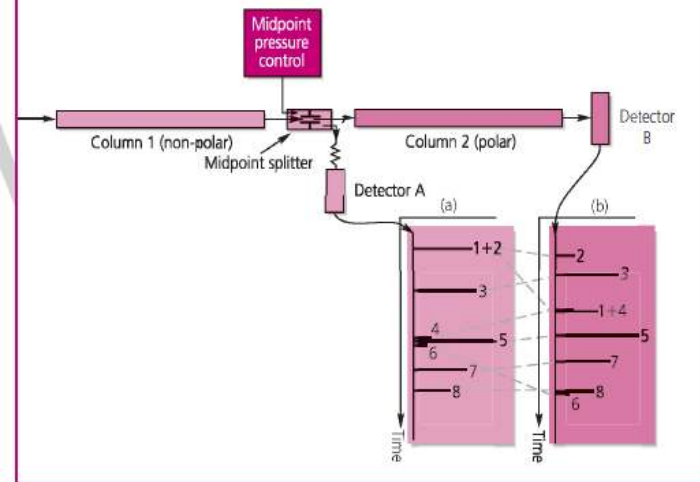
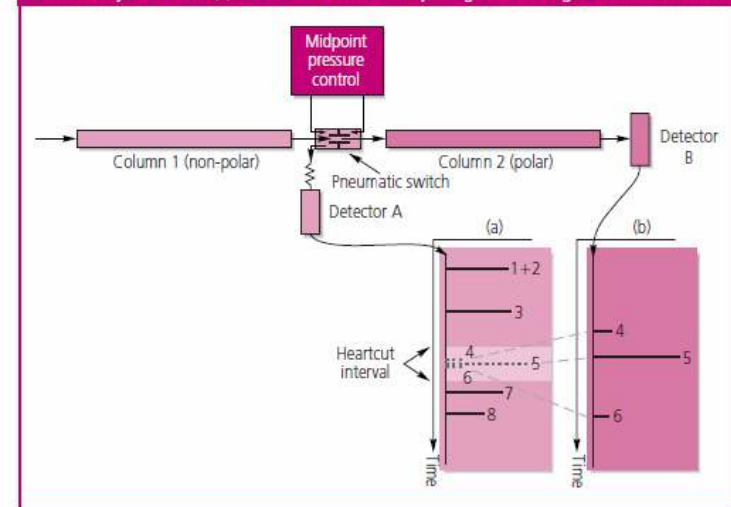


Figure 2: Heartcut GC system: Representative relative peak positions (a) at the column 1-column 2 juncture and (b) for heartcut section after passing alone through the second column.



Comprehensive Δυσδιάστατη αεριοχρωματογραφία (Comprehensive 2D GC)

- Εξέλιξη της πολυδιάστατης αεριοχρωματογραφίας αποτελεί η comprehensive δυσδιάστατη αεριοχρωματογραφία
- Στην περίπτωση κλάσμα του δείγματος μεταφέρεται από την πρώτη στήλη (πρώτη διάσταση) στη δεύτερη στήλη (δεύτερη διάσταση) για περαιτέρω διαχωρισμό υπό διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες
- Η πρώτη στήλη είναι μη πολική ενώ η δεύτερη είναι πολική και ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση την τάση ατμών και την πολικότητα αντίστοιχα

Βασική αρχή της Comprehensive αεριοχρωματογραφίας

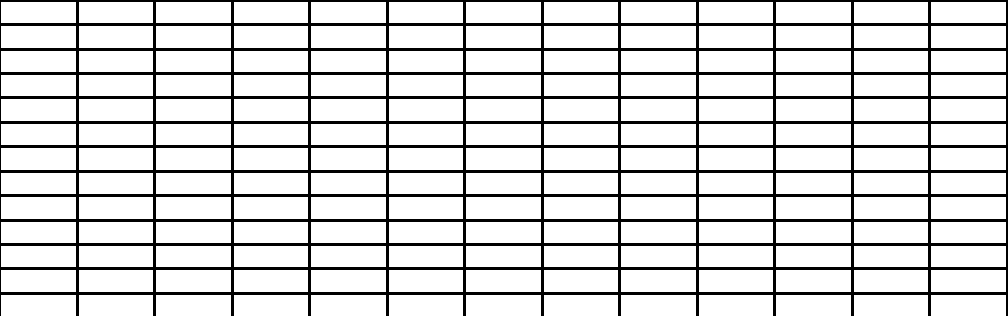
Κανονική Αεριοχρωματογραφία (μονοδιάστατη)



Πολυδιάστατη Αεριοχρωματογραφία

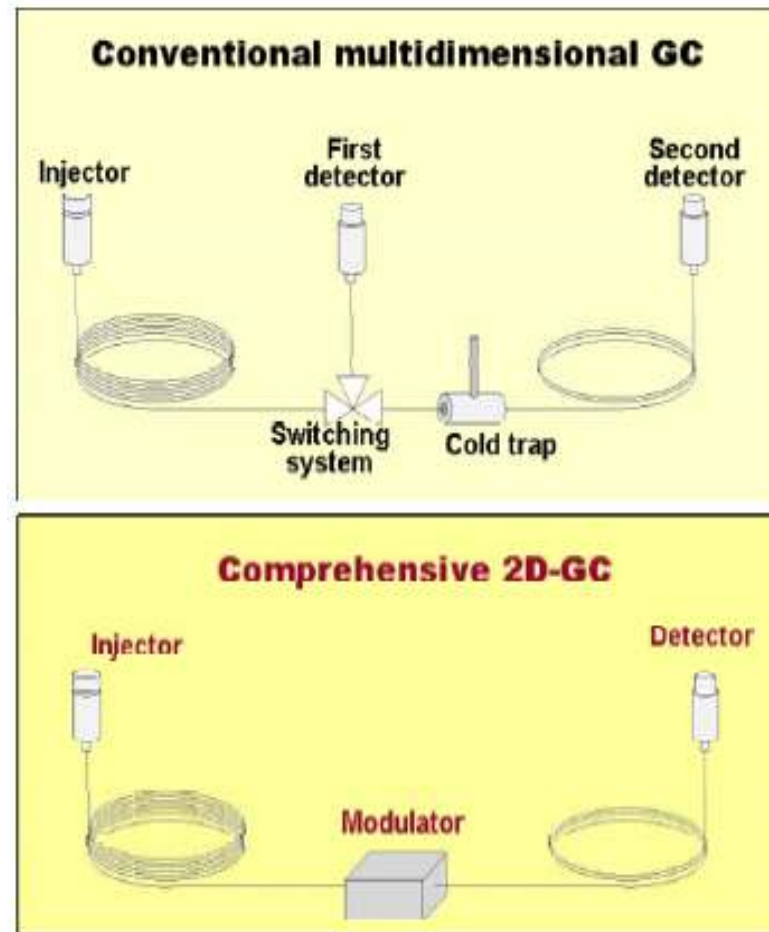


Comprehensive Αεριοχρωματογραφία



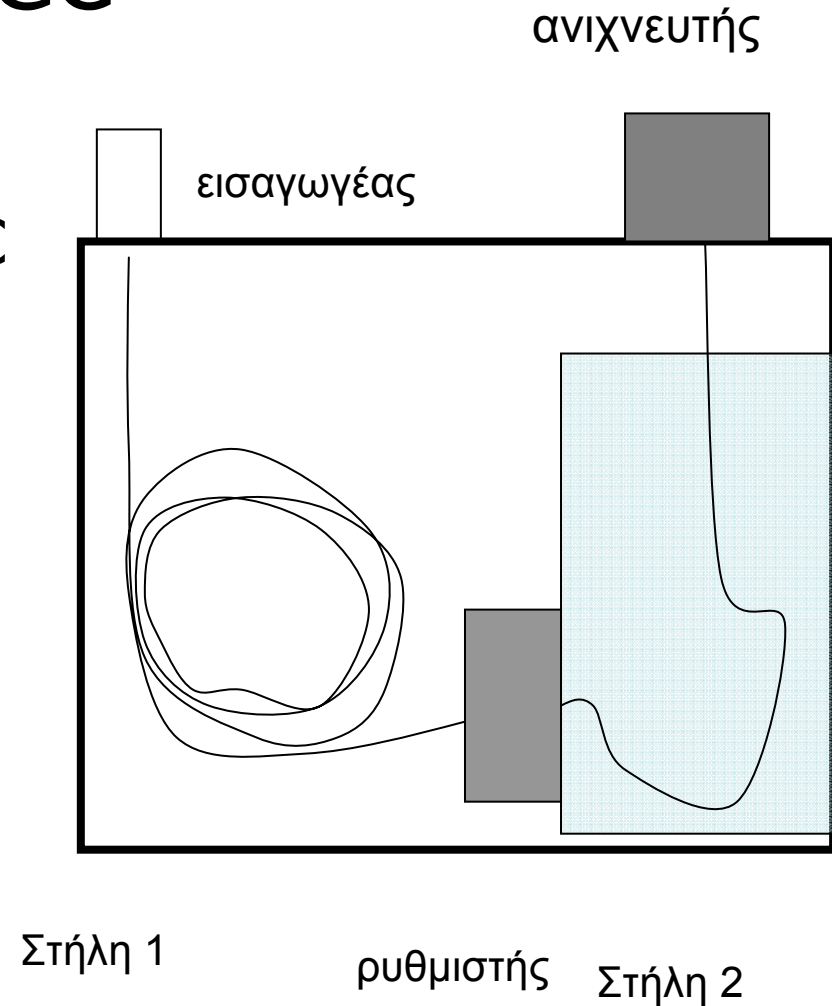
Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τεχνικών είναι ότι στην μεν πολυδιάστατη αεριοχρωματογραφία κλάσμα του δείγματος μεταφέρεται στη δεύτερη στήλη (heart-cutting) στη δε comprehensive δισδιάστατη αεριοχρωματογραφία κάθε ένωση περνά στη δεύτερη στήλη για περαιτέρω διαχωρισμό

Αποτέλεσμα: υψηλός αριθμός χωρητικότητα κορυφών
 $\sim n_1 \times n_2$

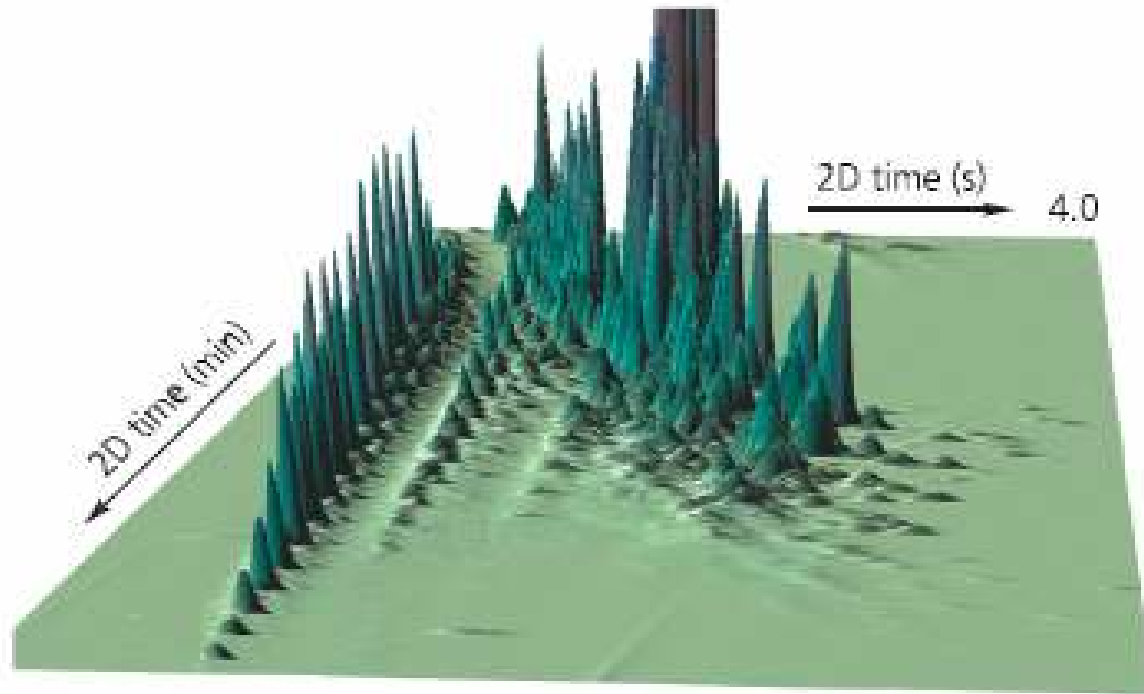


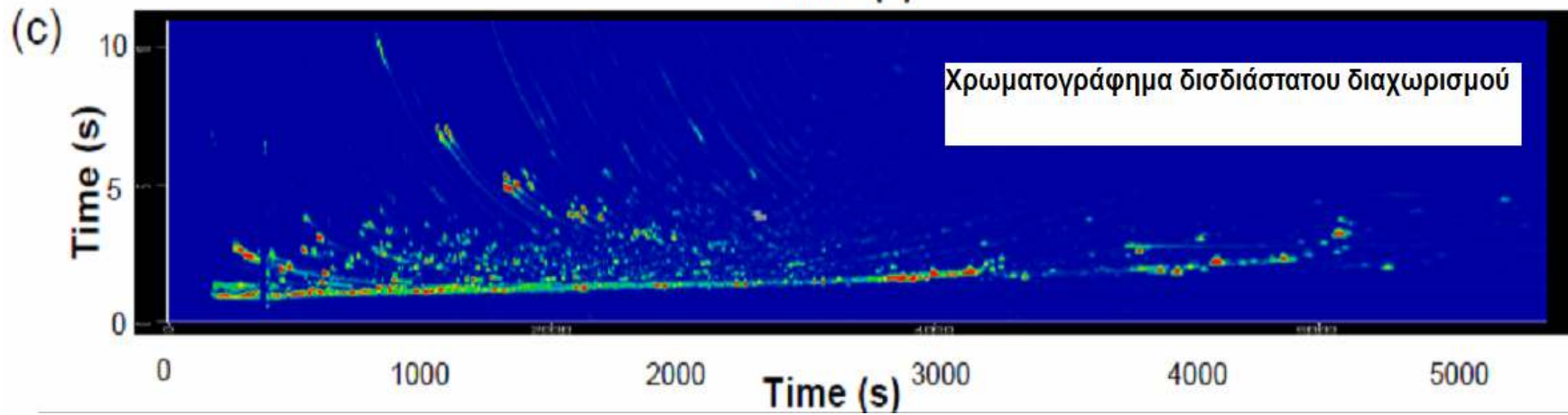
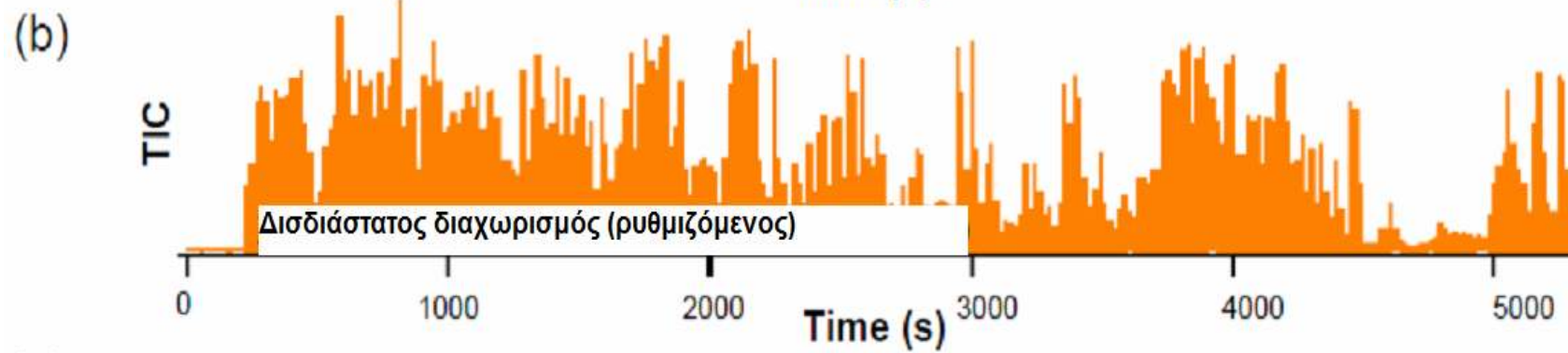
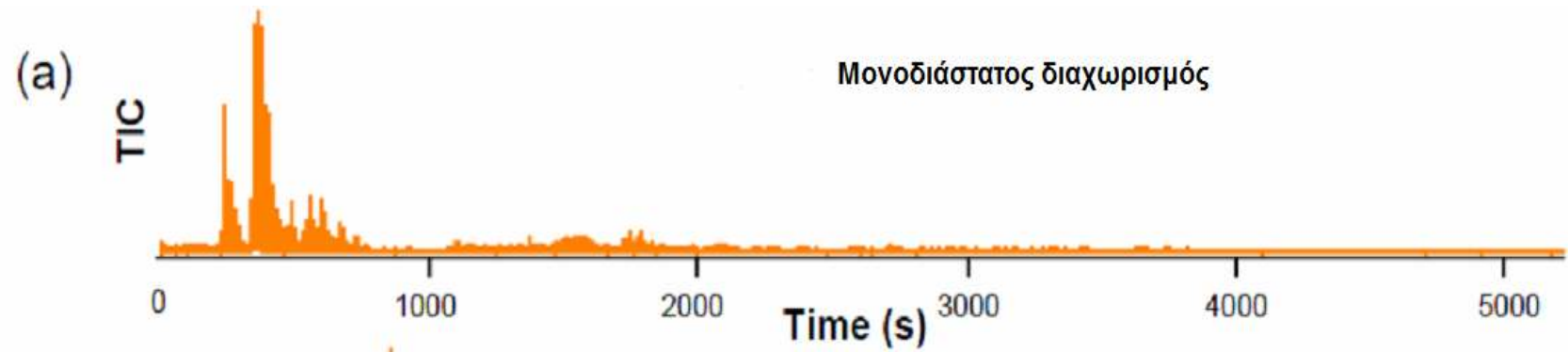
GC x GC

- Σε αντίθεση με το παράδειγμα της TLC, στην GC x GC χρωματογραφία ο δεύτερος βαθμός διαχωρισμού είναι στο χρόνο και όχι στο χώρο
- Ο απαιτούμενος εξοπλισμός αποτελείται από δύο στήλες (συνήθως σε δύο διαφορετικούς χρωματογραφικούς φούρνους), και έναν ρυθμιστή

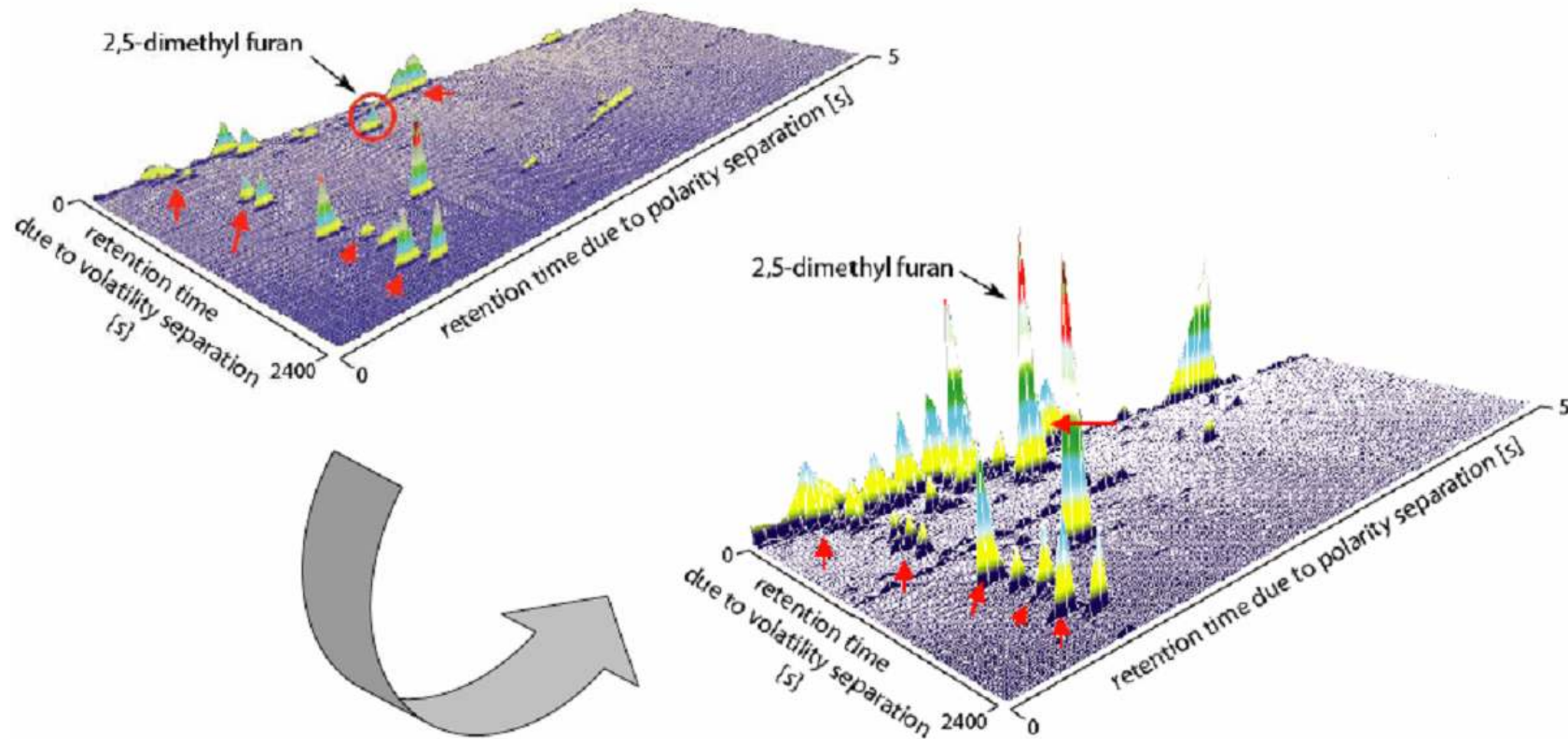


Τυπικό χρωματογράφημα

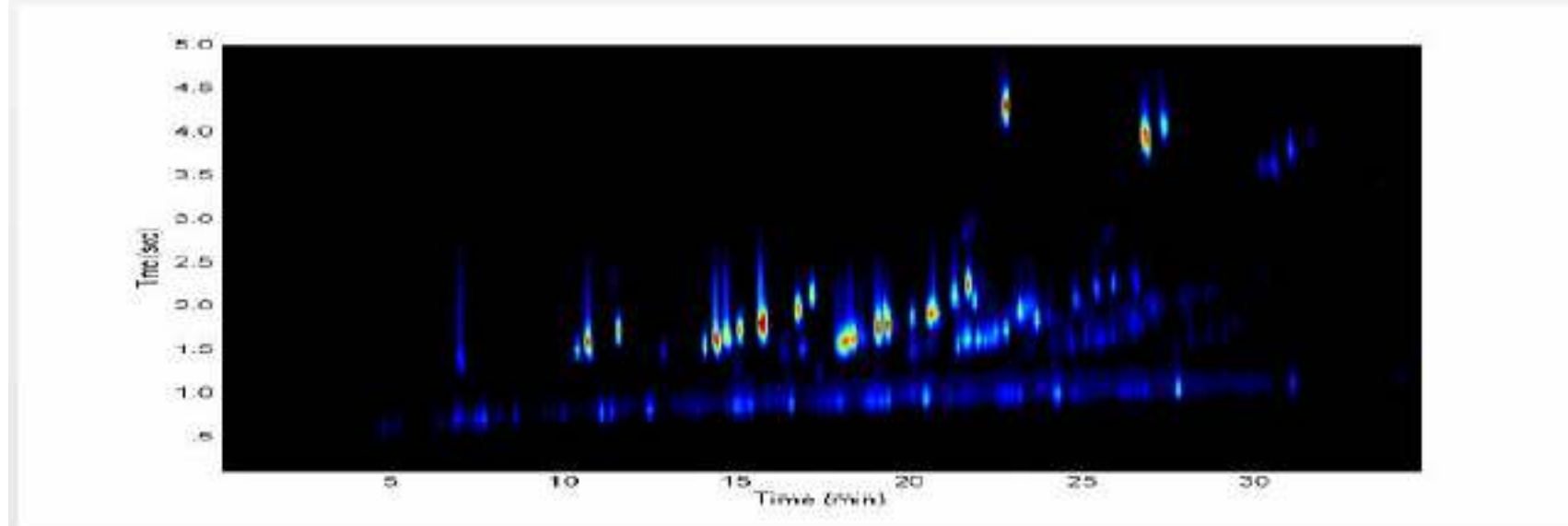
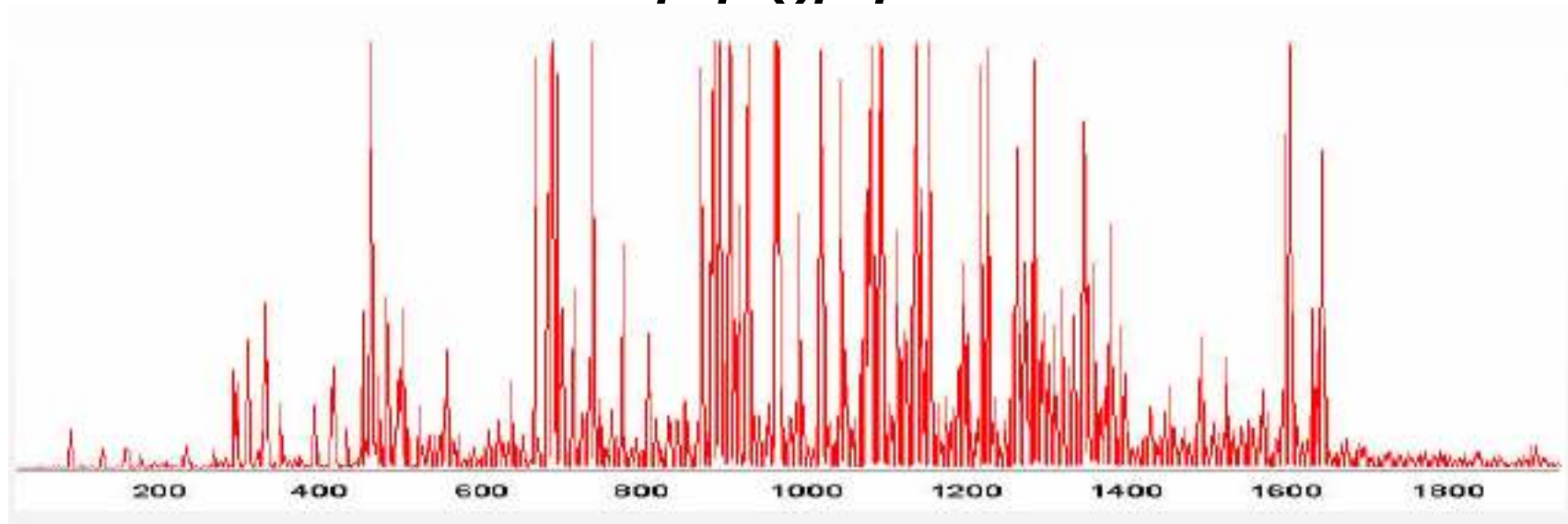




Ανάλυση ανθρώπινης αναπνοής πριν και μετά το κάπνισμα με τη χρήση GCxGC



Ανάλυση δείγματος βενζίνης με τη χρήση GC-MS



- Επιπλέον φυσικοχημικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του δείγματος
 - η διαχωριστικότητα του συστήματος και η ποιότητα του λαμβανόμενου χρωματογραφήματος αυξάνουν
 - Η ειδικότητα της μεθόδου αυξάνει
 - Επίτευξη διαχωρισμού πολύπλοκων μιγμάτων μη διαχωριζόμενων με μονοδιάστατη αεριοχρωματογραφία
- GC, 2-D [παράδειγμα]
 - σύζευξη μία δεύτερης μικρού μήκους στήλης στην πρώτη μεγάου μήκους στήλης
 - εκλούσματα σε χαμηλή θερμοκρασία σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης από την 1^η στήλη
 - Επαναθέρμανση αυτών σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης για μεταφορά στη 2^η στήλη
 - Ο χρόνος μεταφοράς μέσω της 2^{ης} στήλης πρέπει να είναι μικρότερος του κύκλου θέρμανσης και μεταφοράς του επόμενου δείγματος
- GC, 2-D [παράδειγμα]
 - Χρήση μίας στήλης για το διαχωρισμό
 - Ακολουθεί ανίχνευση με τη χρήση TOFMS ως δεύτερη διάσταση
 - Ο χρόνος ανίχνευσης με TOFMS μπορεί να είναι πολύ μικρός λόγω της περιορισμένης περιοχής m/z η οποία απαιτείται

Οργανολογία

- Δύο επιπλέον hardware
 - Μία δεύτερη στήλη
 - Μία διεπαφή μεταξύ της δεύτερης και της πρώτης στήλης (ρυθμιστής)
- Ο χρόνος ανάλυσης στη δεύτερη στήλη είναι πολύ μικρός
- Ο ρυθμιστής συνεχώς παραλαμβάνει τα εκλούσματα από την πρώτη στήλη και τα εισάγει στη δεύτερη

Οργανολογία

- Ο ρυθμιστής επιτελεί τρία διαφορετικά έργα (σε επαναλαμβανόμενο κύκλο):
 - Συσσωρεύει το δείγμα το οποίο εκλούεται από τη 1^η στήλη
 - Χρόνος ίσος με το $1/3$ έως $1/5$, της διάρκειας έκλουσης της κορυφής από την 1^η στήλη
 - Π.χ. κορυφή με εύρος βάσης 9 sec: ο ρυθμιστής θα συσσωρεύει το δείγμα κάθε 2 (ή 3) sec, δηλ. “κόβοντας” την κορυφή η οποία εκλούεται από την 1^η στήλη σε “κομμάτια(cuts)”
 - Συγκεντρώνει το δείγμα το οποίο συλλέγεται από κάθε «κομμάτι» σε μία μικρού εύρους “ζώνη”, ή “χημικό παλμό”.
 - Π.χ. με ταχεία ψύξη (με π.χ. ένα ακροφύσιο CO₂)
 - Εισάγει αυτούς τους χημικούς παλμούς με αλληλουχία στη 2^η στήλη
 - Μία σειρά από ταχείς χρωματογραφικούς προσδιορισμούς πραγματοποιείται
 - Ένας διαχωρισμός για κάθε παλμό

Ερμηνεία δεδομένων

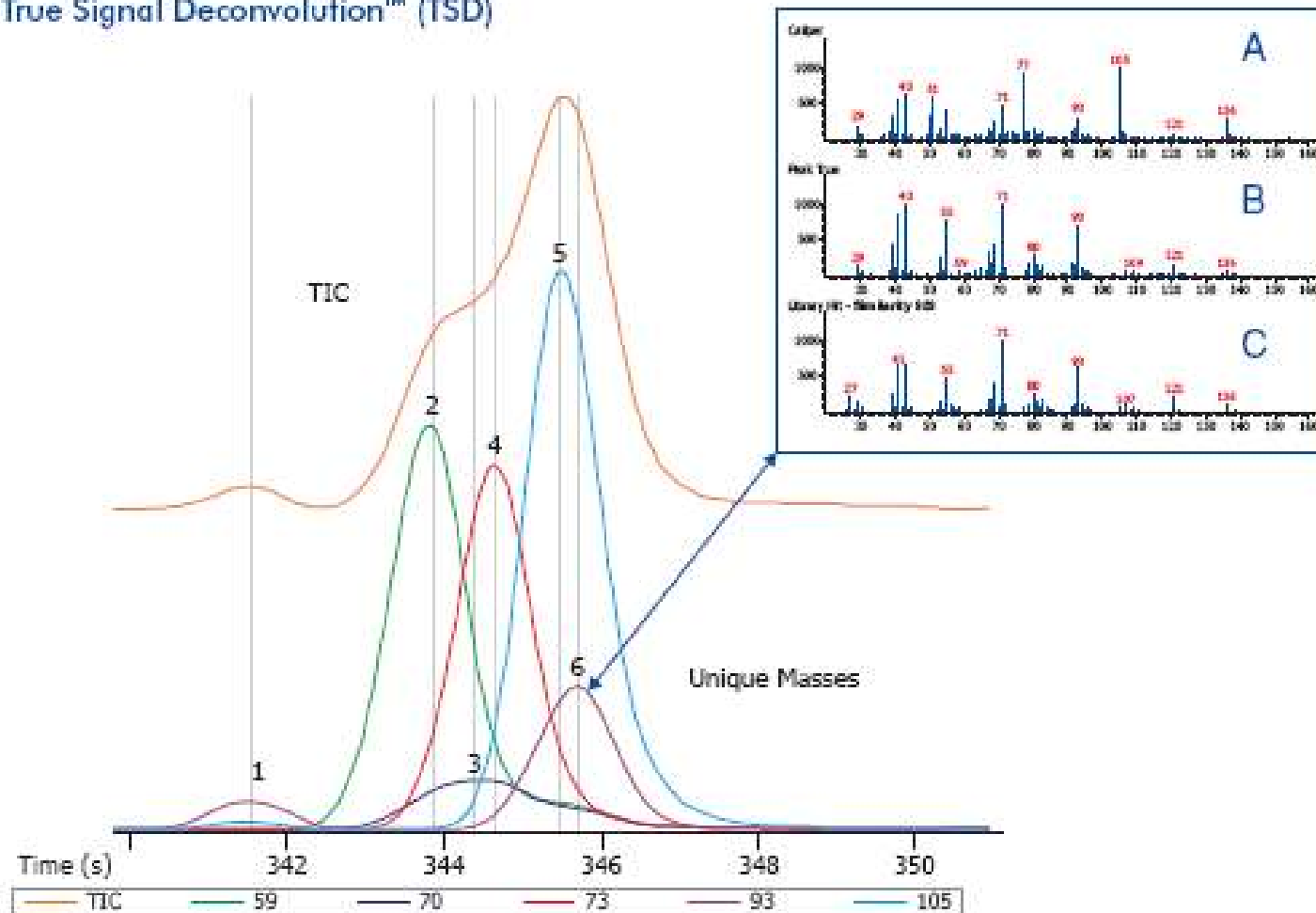
- Κάθε κάθετη στήλη μπορεί να ολοκληρωθεί και να απεικονισθεί ως συνάρτηση του χρόνου έκλουσης της 1st στήλης
 - Το συμβατικό χρωματογράφημα της μονοδιάστατης αεριοχρωματογραφίας εμφανίζεται
- Κάθετη σάρωση για κάθε κορυφή του μονοδιάστατου χρωματογραφήματος μπορεί να οδηγήσει στην καταμέτρηση των συνεκλούμενων κορυφών

Ερμηνεία δεδομένων

- Οι περισσότερες από τις έγχρωμες κηλίδες – οι χρωματογραφικές κορυφές – σε αυτές τις εικόνες αντιπροσωπεύουν ένα, ή μερικά, χημικά είδη παρόντα στο δείγμα.
- Γενικά ακόμα και με αυτόν τον αυξημένο αριθμό κορυφών παρατηρούνται συνεκλούσεις κορυφών στην περιοχή μεγάλου αριθμού ατόμων άνθρακα
- Προϊόντα έκλυσης της στατικής φάσης της 1^{ης} στήλης διαχωρίζονται σαφώς από τις ενώσεις του δείγματος με αυτήν τη μέθοδο.
- Κατά μήκος του χρωματογραφήματος εμφανίζονται κάθετες ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν σε ομάδες ισομερών, το λεγόμενο φαινόμενο “roof-tile”.

Ερμηνεία δεδομένων– η 3^η D

True Signal Deconvolution™ (TSD)



The TIC spectrum of Linalool (Peak 6) is automatically deconvoluted from five other coeluting peaks in this thermal desorption analysis of commercial liquid hand soap. The deconvoluted spectrum (B) is then matched against the NIST library (C) for improved spectral match and accurate compound identification. No other GC-MS software delivers you the power of TSD and Automated Peak Find within a seamless software package.

Ερμηνεία δεδομένων– η 3^η D

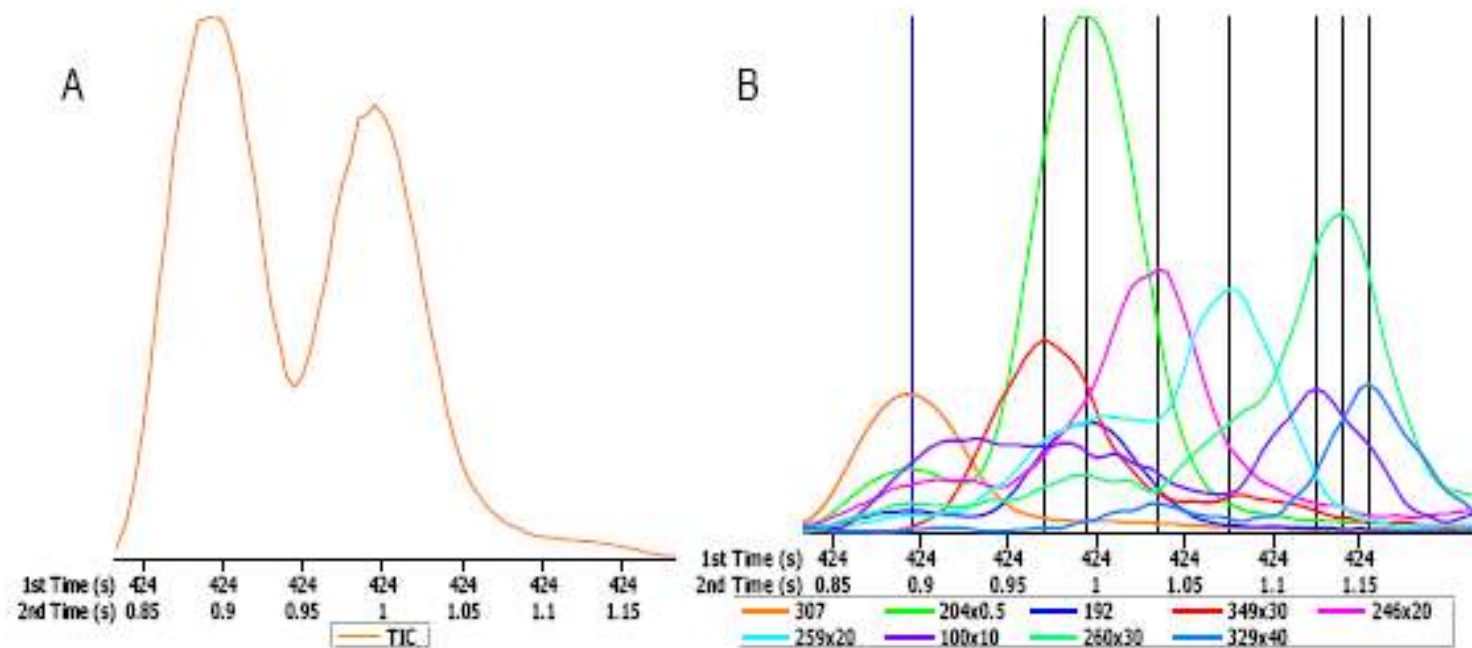


Figure 3. A 0.7 second region of the chromatogram presented as both TIC (A) and extracted ion (B) chromatograms.

Ερμηνεία δεδομένων– η 3^η D

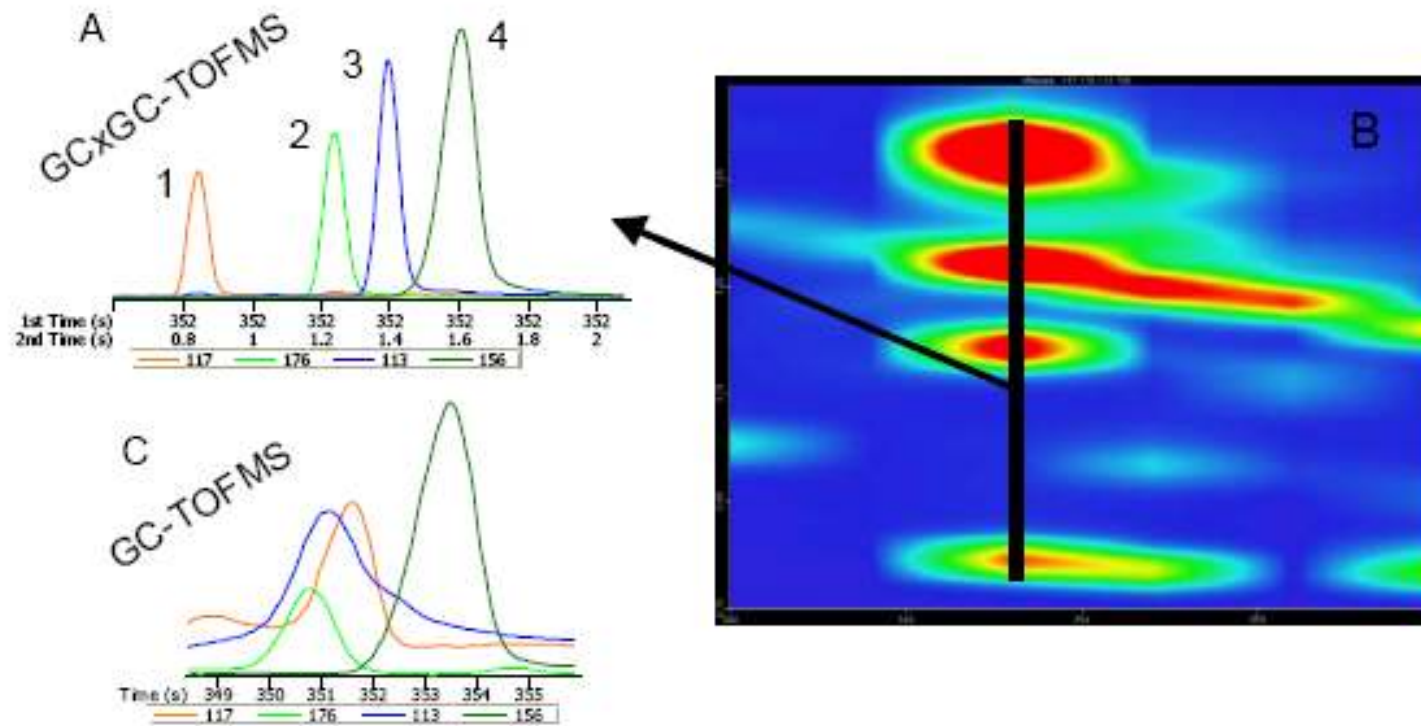
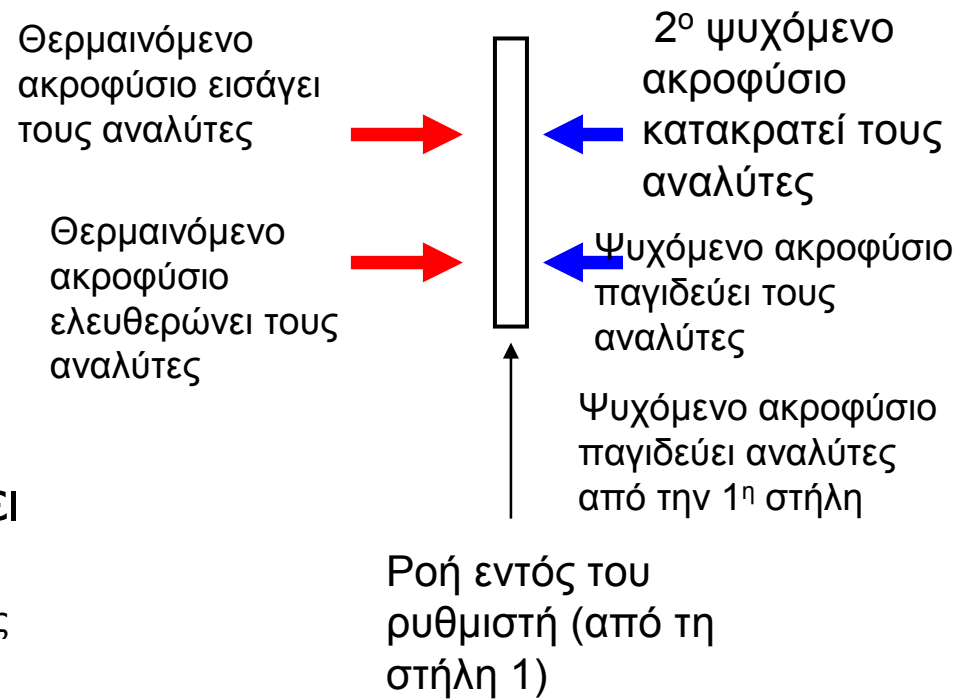


Figure 2. Extracted ion chromatograms shown for the four compounds in Table 1. Analysis was performed by either GCxGC-TOFMS (A and B), or GC-TOFMS (C).

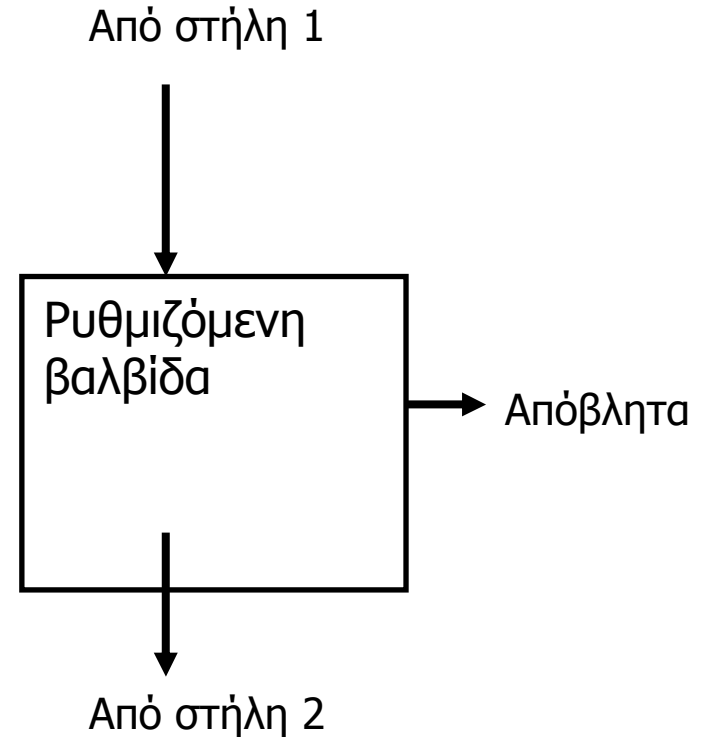
GC x GC

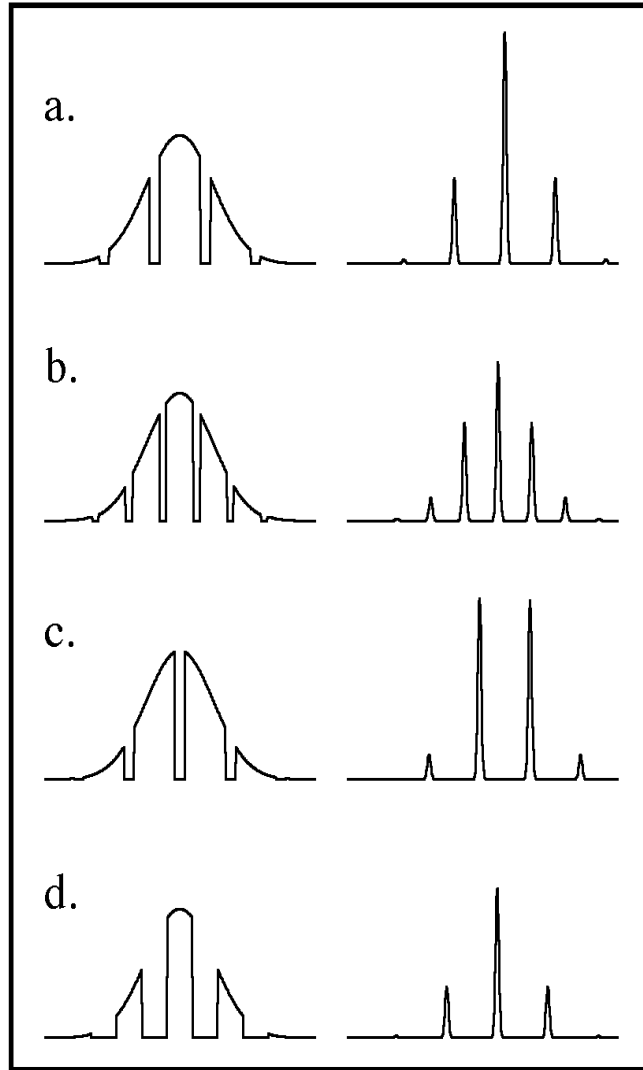
- Ρύθμιση στη GC x GC (ένα είδος ρύθμισης)
 - Η ψύξη της στήλης επιτρέπει την παγίδευση των αναλυτών οι οποίοι εκκλύονται από την 1^η στήλη
 - Ταχεία θέρμανση επιτρέπει μικρού εύρους ζώνες να κινηθούν διαμέσου της 2^{ης} στήλης, δίνοντας οξείες κορυφές



GC x GC

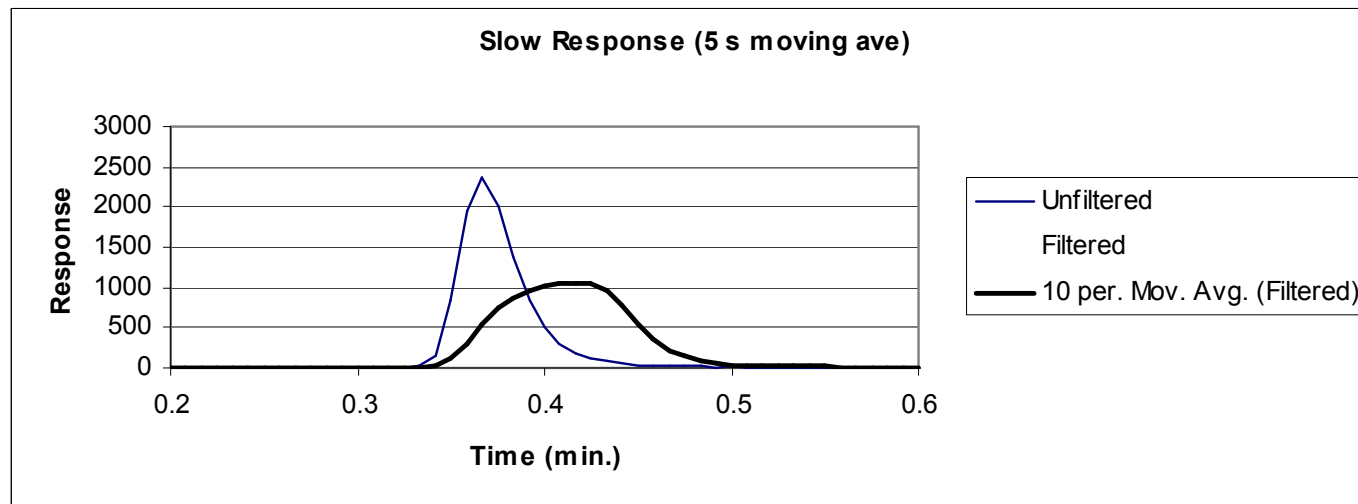
- Η ρύθμιση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση βαλβίδας
- Στο πρώτο στάδιο το έκλουσμα από τη 1^η στήλης οδηγείται στα απόβλητα
- Στο δεύτερο στάδιο η βαλβίδα ρυθμίζεται και το έκλουσμα οδηγείται στη 2^η στήλη για μικρό χρονικό διάστημα
- Στο τρίτο στάδιο η βαλβίδα ρυθμίζεται να οδηγεί πάλι στα απόβλητα
- Αυτό επιτρέπει περιοδικό διαχωρισμό του εκκλούσματος της 1^{ης} στήλης στη 2^η στήλη
- Η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο αποτελεσματική (μεγάλο μέρος του δείγματος αποβάλλεται).





GC x GC

- Ο χρόνος πραγματοποίησης του 2^{ου} διαχωρισμού, της ρύθμισης και της ανίχνευσης θα πρέπει να είναι μικρής διάρκειας (~ 50 ms ανίχνευση, ~100 ms ρύθμιση, 3 s 2^{ος} διαχωρισμός) έτσι ώστε καμία κορυφή (προερχόμενη από μόνο- και δισδιάστατο διαχωρισμό) να μην διευρύνεται
- Τα δεδομένα απεικονίζονται ως απόκριση vs. χρόνου, αλλά κάθε ~3 έως 5 s ένα νέο 2^{ης} διάστασης χρωματογράφημα εμφανίζεται.
- Η 2^η διάσταση είναι περιορισμένη (δηλ. μικρό N ακόμα και στην περίπτωση στήλης με μικρή τιμή H). Ο αριθμός χωρητικότητας κορυφών στη 2^η διάσταση είναι μικρός, ~10, αλλά αυτό οδηγεί στο ~10X αρχικό αριθμό χωρητικότητας της 1^{ης} διάστασης (π.χ. 2000 vs 200)



GC GC x GC

- Το χρωματογράφημα δεικνύει τον πλήρη διαχωρισμό 57 διαλυτών οι οποίοι ελέγχονται ως υπολείμματα σε φαρμακευτικά προϊόντα

70 LCGC NORTH AMERICA VOLUME 26 NUMBER 1 JANUARY 2008

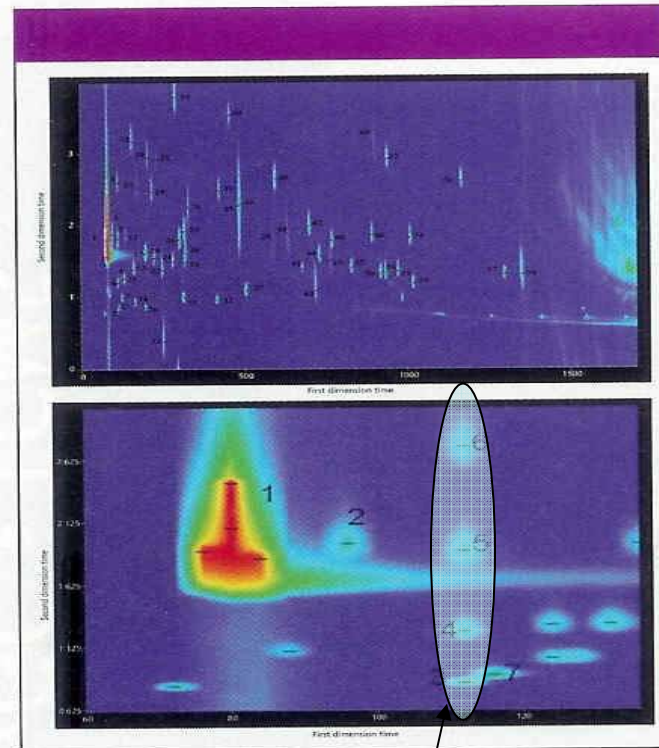


Figure 5: GC×GC chromatogram of class 1, 2, and 3 residual solvents.

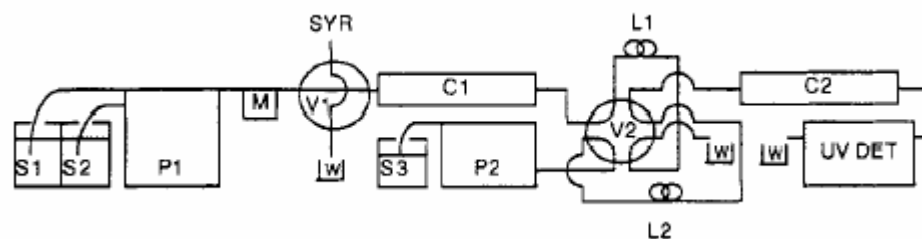
112 s pk (1st Dim.)

se
d
w
u
w
C
se
ti
c
n
g
to
a
t
T
re
n
r
t
F
f
i

Automated Instrumentation for Comprehensive Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography of Proteins

Michelle M. Bushey and James W. Jorgenson*

Department of Chemistry, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-3290



Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography via Differential Flow Modulation

John V. Seeley,* Frederick Kramp, and Christine J. Hicks

Department of Chemistry, Oakland University, Rochester, Michigan 48309-4477

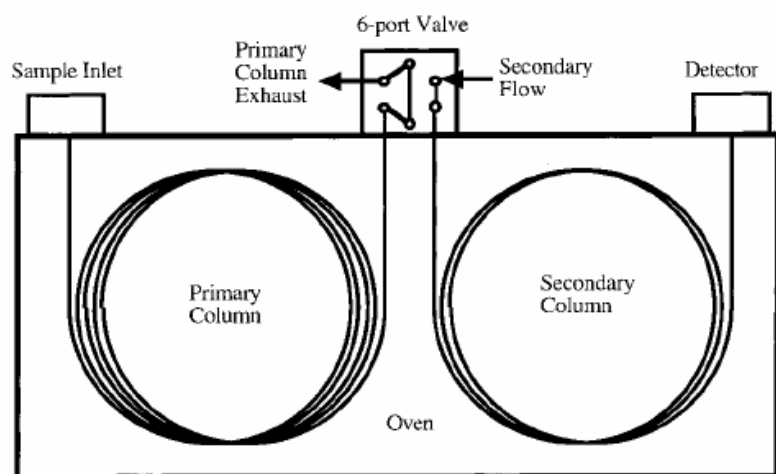
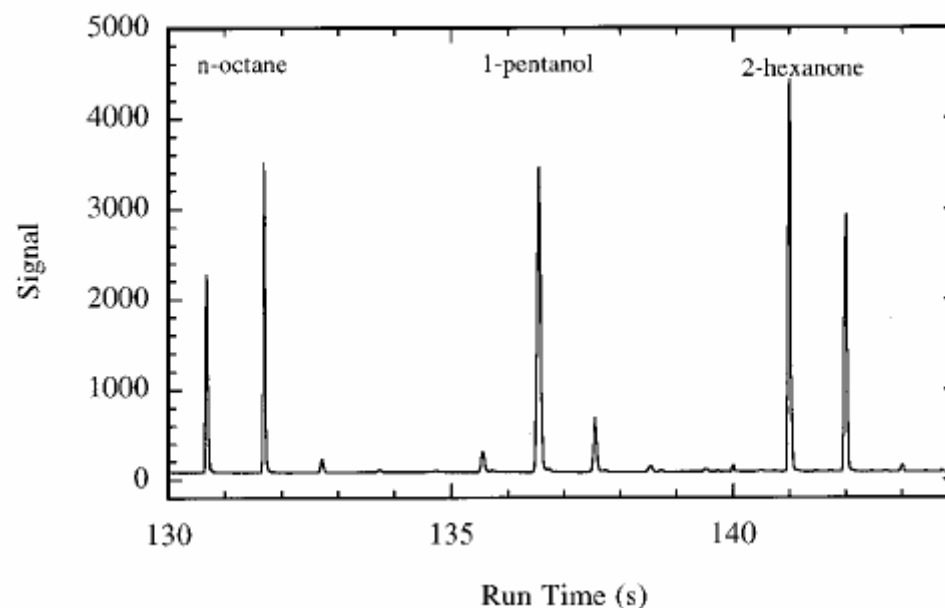
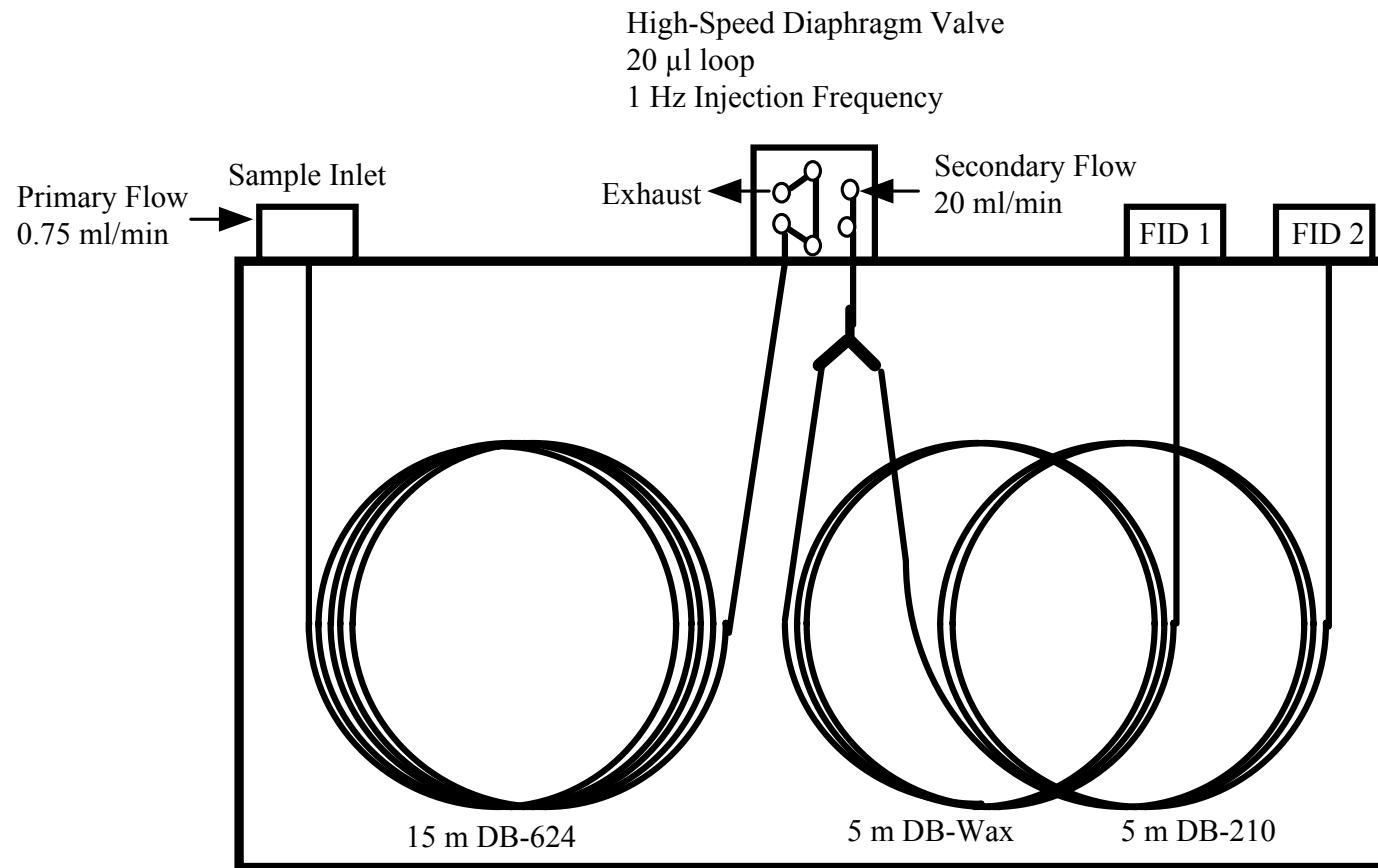


Figure 1. Schematic of a differential flow GC \times GC system.



Dual-Secondary Column Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC x 2GC)



Περιορισμοί στο χρόνο ρύθμισης

Η επίδραση της απώλειας του εκλούσματος μπορεί να περιορισθεί με τη συχνότερη δειγματοληψία του πρωταρχικού εκλούσματος από την 1^η στήλη.

Για την GC x GC, αυτό σημαίνει πρακτικά διασφάλιση ότι η χρονική περίοδος ρύθμισης, P_M , δεν είναι μεγάλη.

Γενικά όμως, η περίοδος ρύθμισης ήδη περιορίζεται από το γεγονός της διατήρησης του πρώτου διαχωρισμού, και αυτός ο περιορισμός επιβάλλεται σε όλες τις μεθόδους ρύθμισης.

Η ερώτηση είναι...

Κύκλοι < 1 θέτουν ένα νέο και σημαντικό περιορισμό στη ρύθμιση της GC x GC;

Περιορισμοί στο χρόνο ρύθμισης

Για τη βέλτιστη απόδοση της GC x GC, τίθεται ένας περιορισμός στην χρονική περίοδο ρύθμισης.

Αυτός ο περιορισμός ποσοτικοποιείται από την αναλογία του χρόνου ρύθμισης και του εύρους κορυφής της πρωταρχικής κορυφής.

$$\tau_z = P_M / 1\sigma \quad \text{Seeley (2002)}$$

$$M_R = 4 \ 1\sigma / P_M = 4 / \tau_z \quad \text{Αναλογία ρύθμισης: Marriot et al. (2006)}$$

	Περιορισμός ρύθμισης	Αποτέλεσμα του περιορισμού
GCxGC Lore (1992)	$M_R > 4$ (3 to 4 κορυφές)	Διατήρηση του 1 ^ο διαχωρισμού
Murphy et al. (1998)	$M_R > 2$	Διατήρηση της 1 ^ο διεύρυνσης μικρότερη 30%
Seeley (2002)	$M_R > 2.67$	
Marriott et al. (2006)	$M_R > 3.0$	

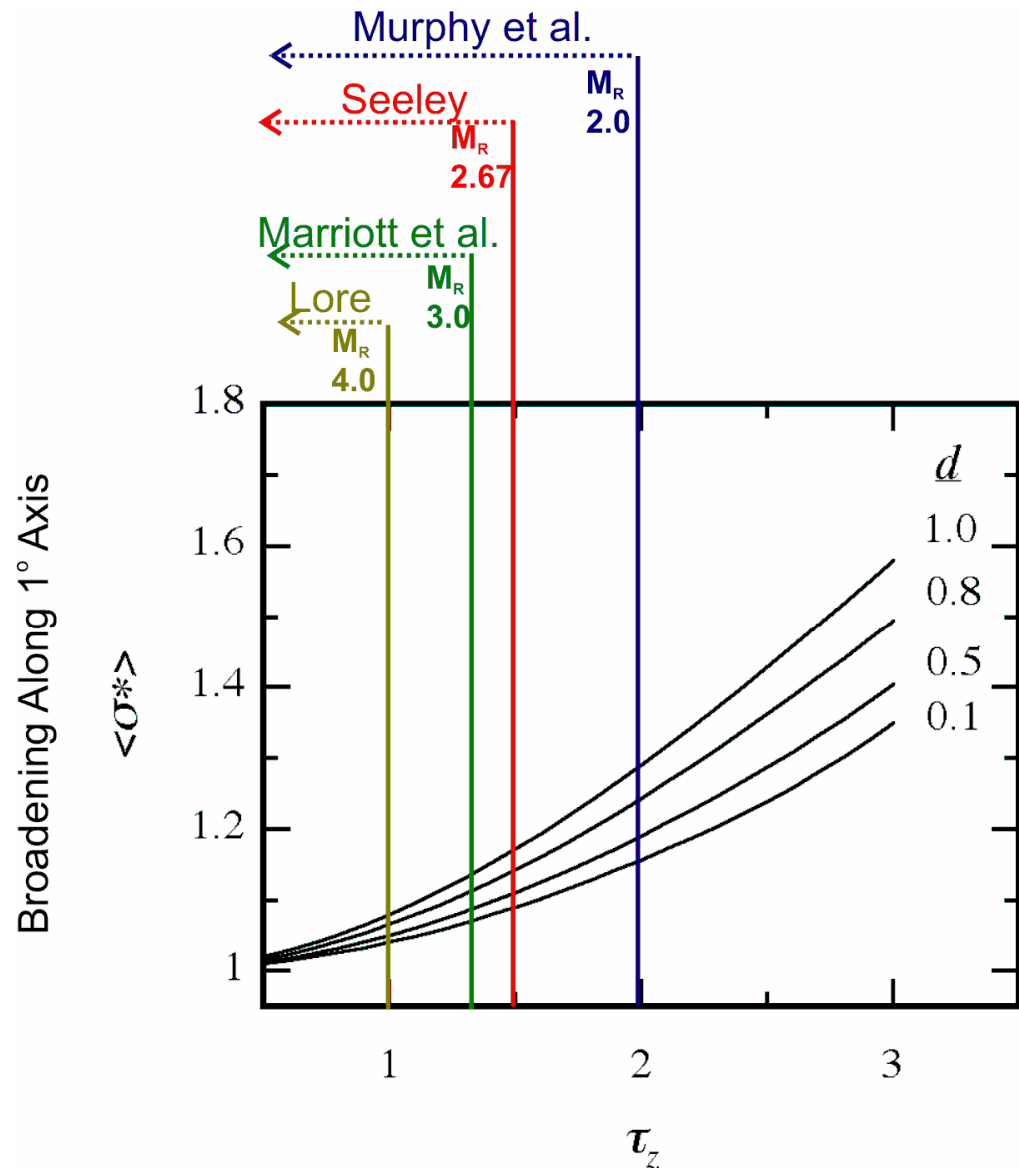
Modulation Ratio And 1° Peak Broadening

$M_R > 4$ διατηρεί την 1^η διεύρυνση μικρότερη του 10%.

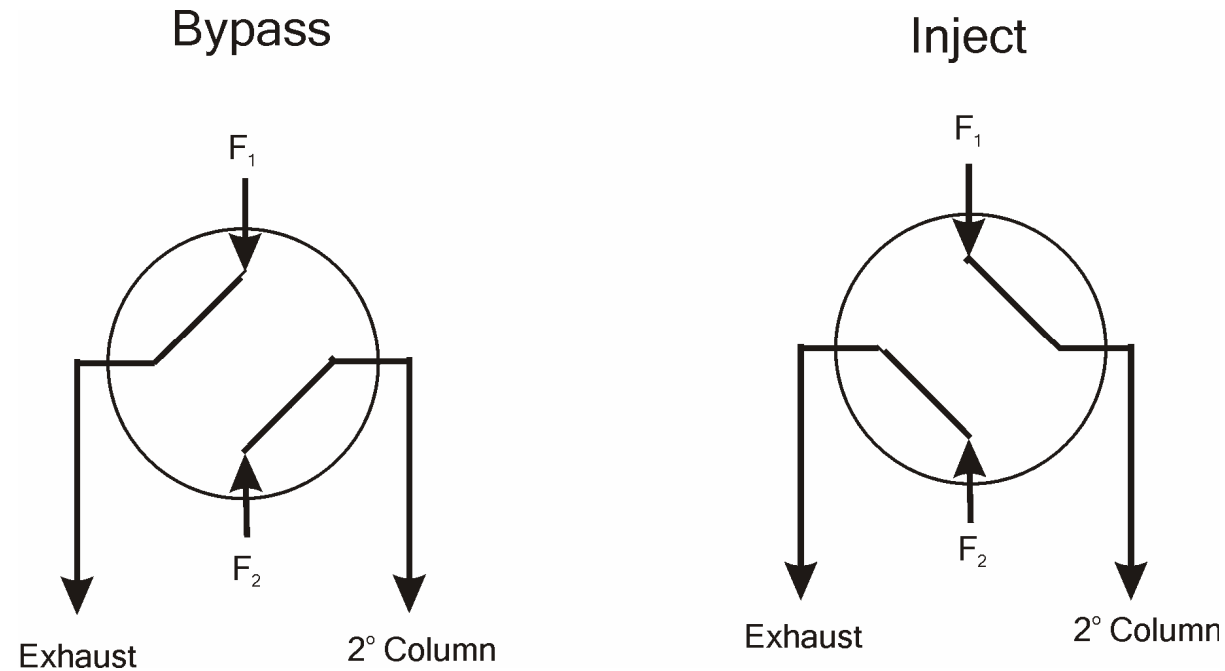
$M_R > 2$ επιτρέπει διεύρυνση μέχρι 30%.

$M_R > 2.67$ διατηρεί τη διεύρυνση μικρότερη του 20%.

Η χρήση μικρών κύκλων οδηγεί στη μείωση της διεύρυνσης

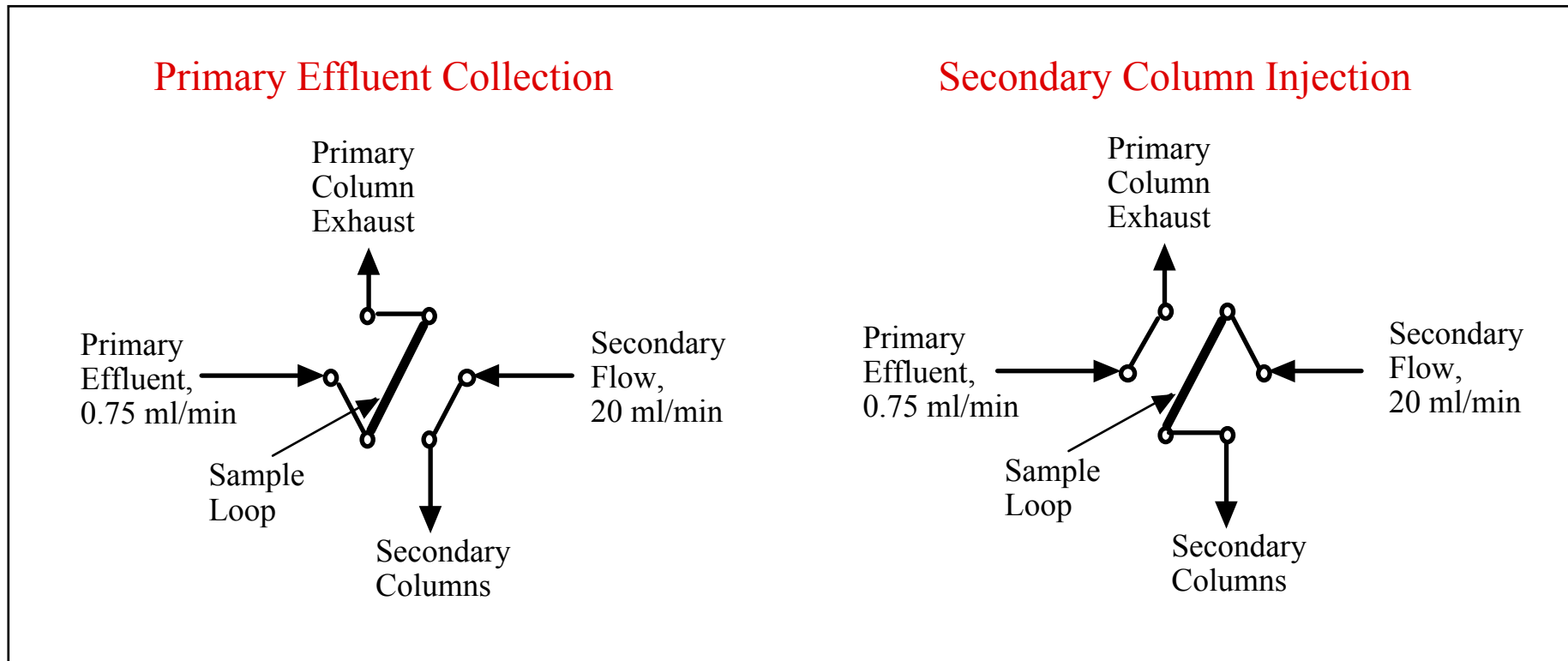


Ρύθμιση με τη χρήση βαλβίδα διαφράγματος 4 εισόδων



Απαιτούνται μικροί κύκλοι ($d < 0.1$).

Διαφορική ρύθμιση ροής



Οι βαλβίδες διαφράγματος έχουν θερμοκρασιακούς περιορισμούς.
Απαιτούνται υψηλότερες ροές στη 2^η στήλη.

Διάταξη GC x 2GC

H₂ φέρον αέριο

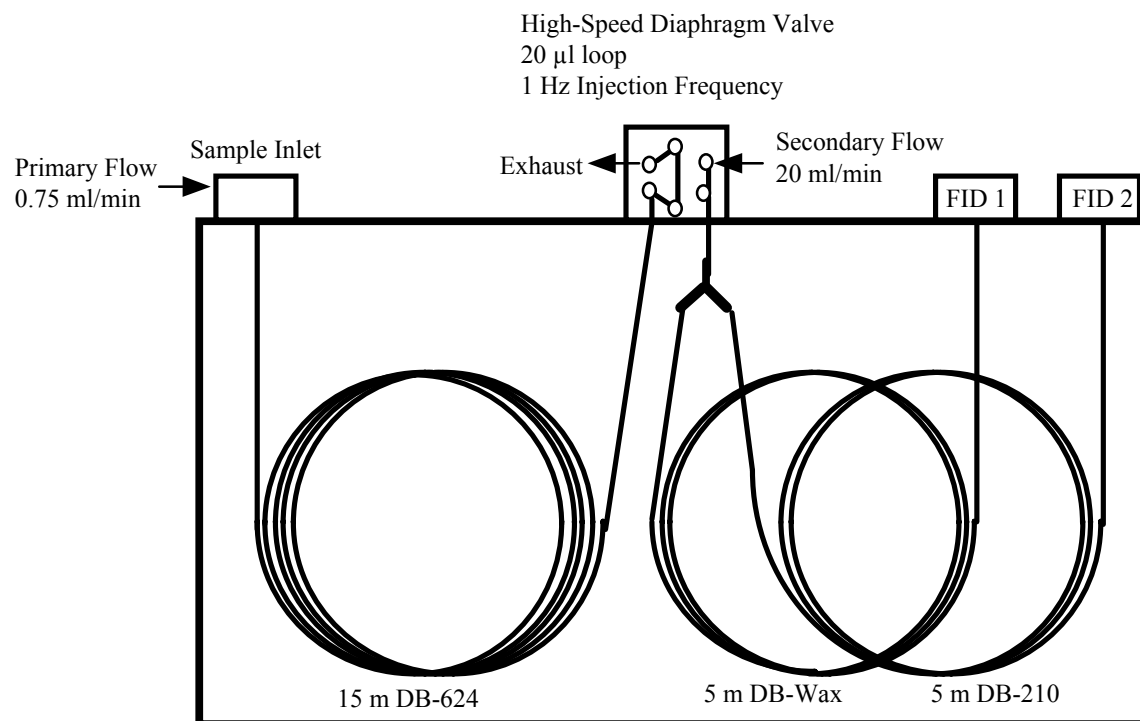
Σταθερής ροής

1^ο ροή = 1.0 cm³ min⁻¹

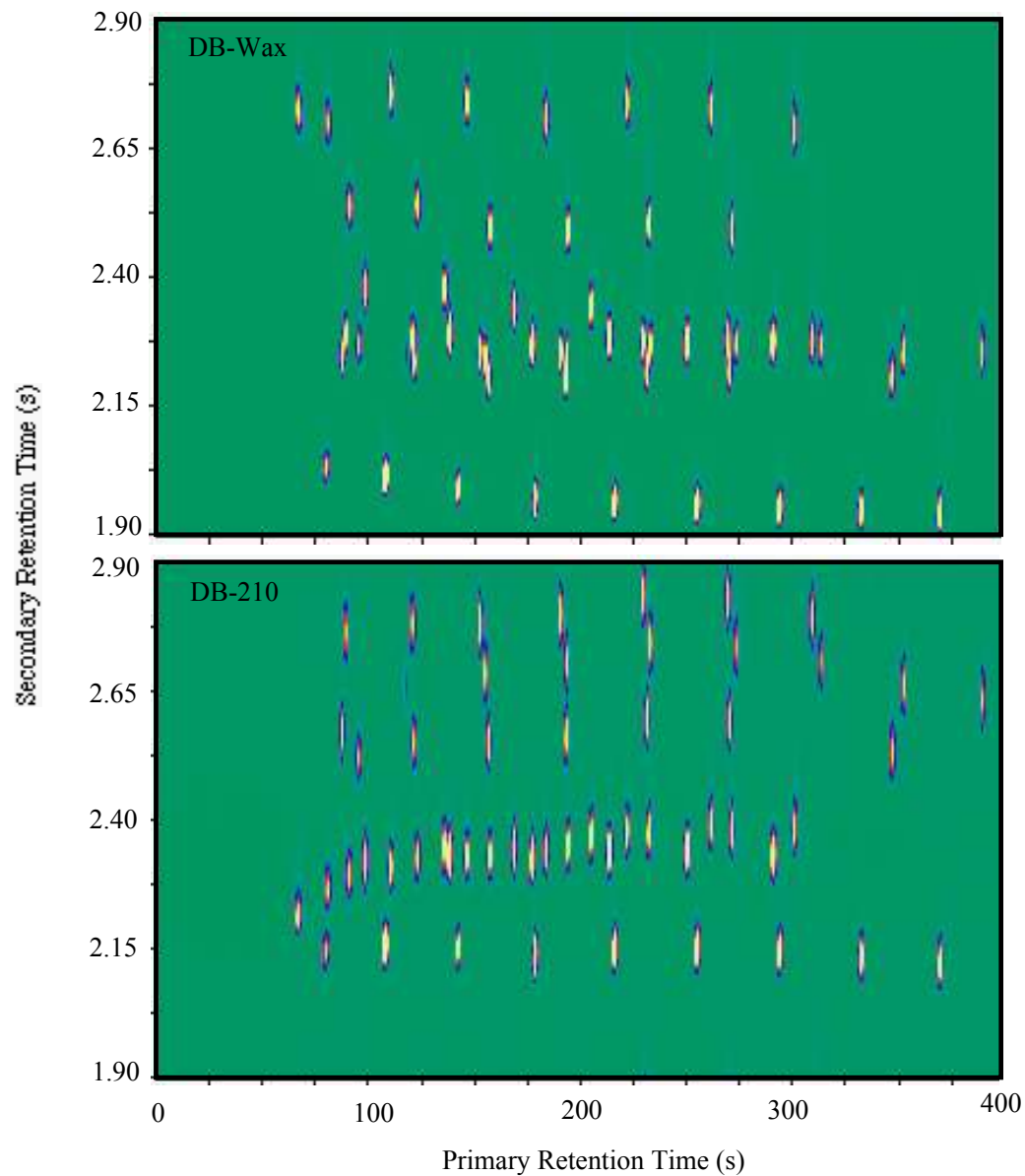
2^ο ροή = 20.0 cm³ min⁻¹

2^ο στήλης split = 1:1

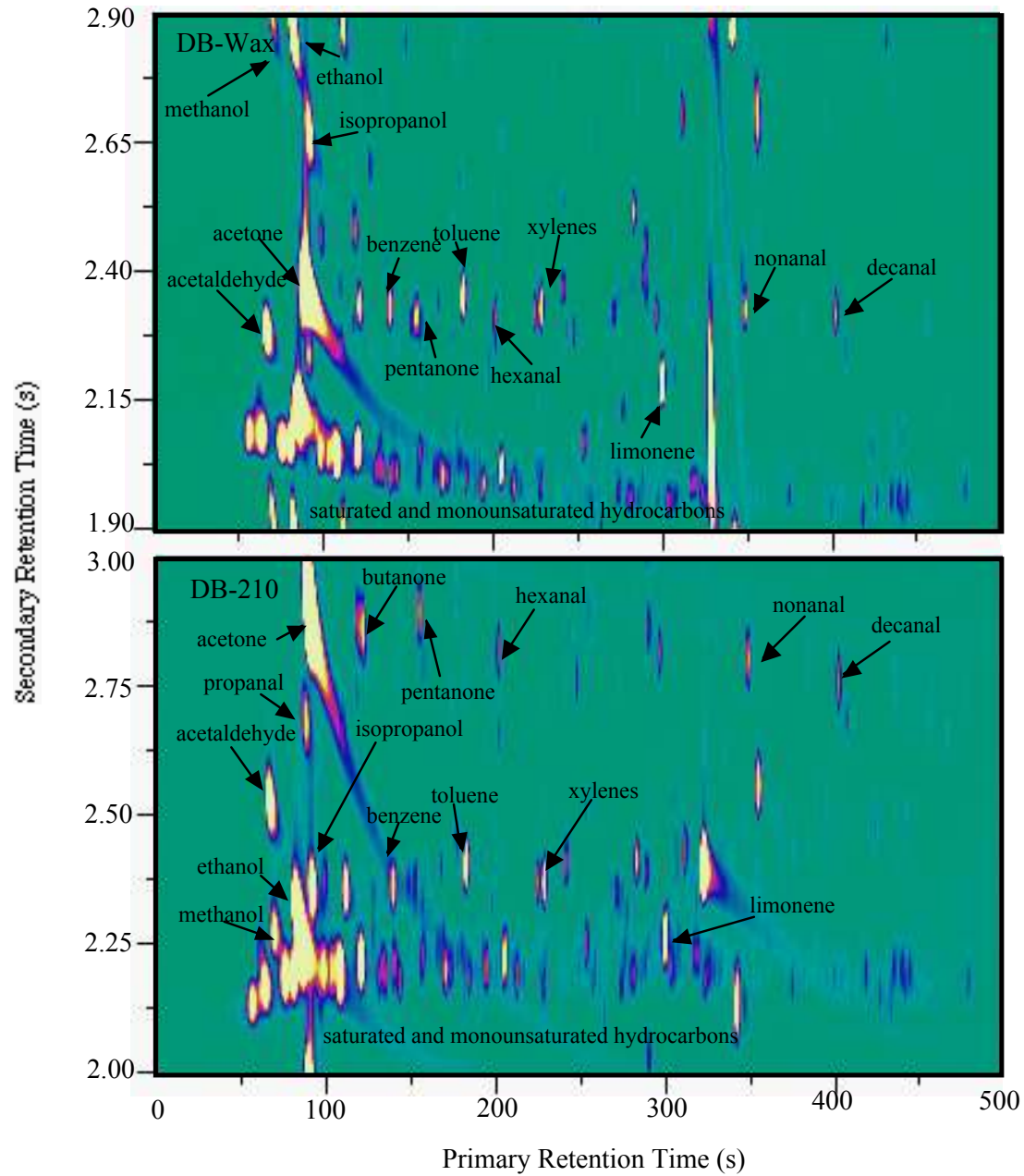
2^ο χρόνος εισαγωγής = 1.5s



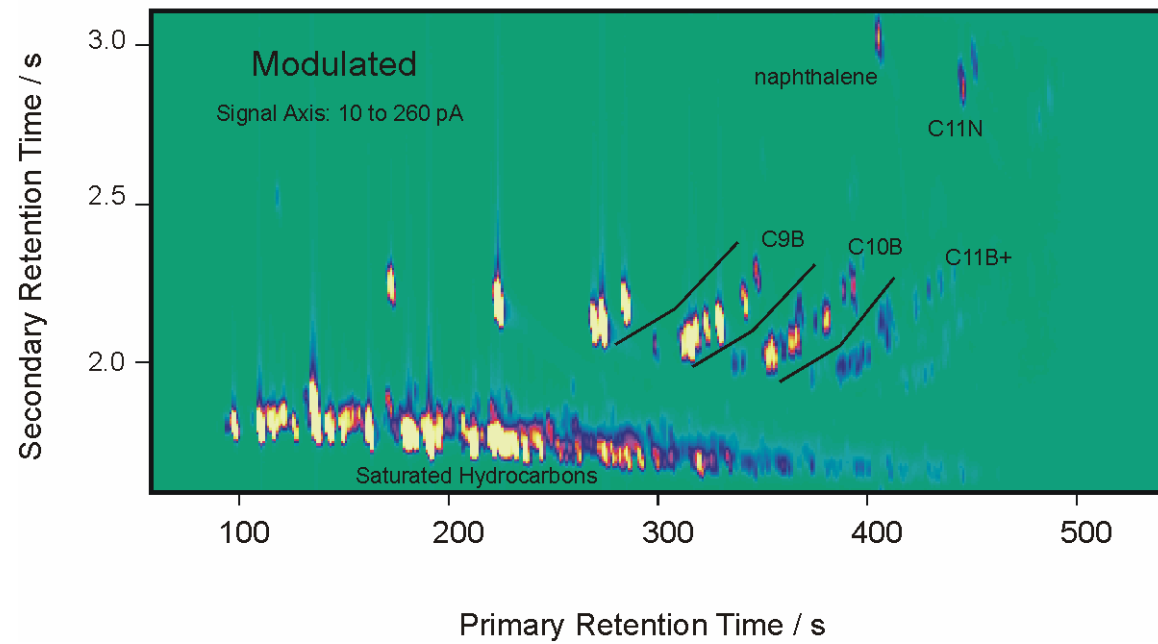
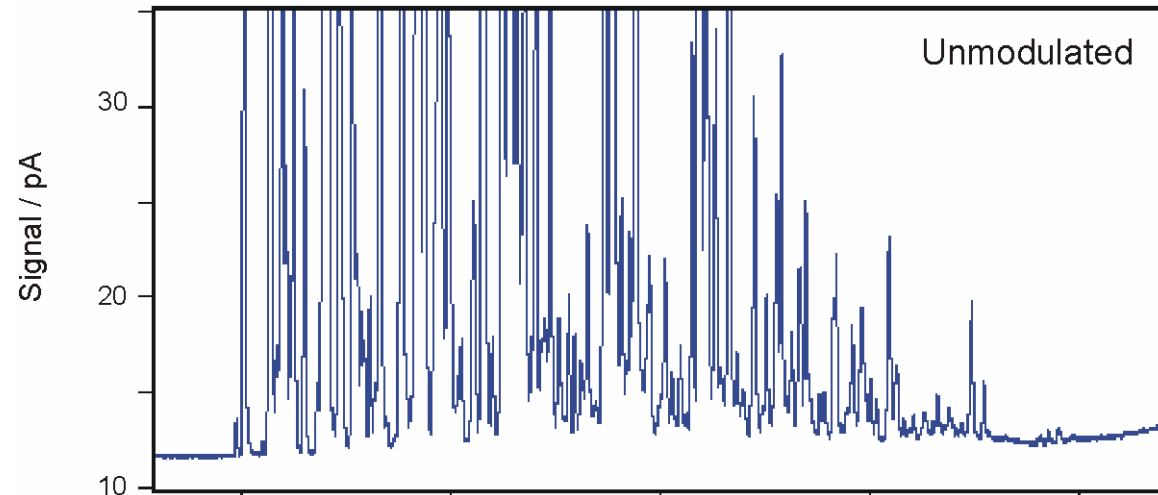
2-D χρωματογραφήματα μίγματος αλκανίων, 2-κετονών, 1-αλκοολών, 2-αλκοολών, 2-μεθυλο-2-αλκοολών, εστέρων, αλκυλο-αρωματικών, και αλδευδών (ευθείας αλυσίδας).



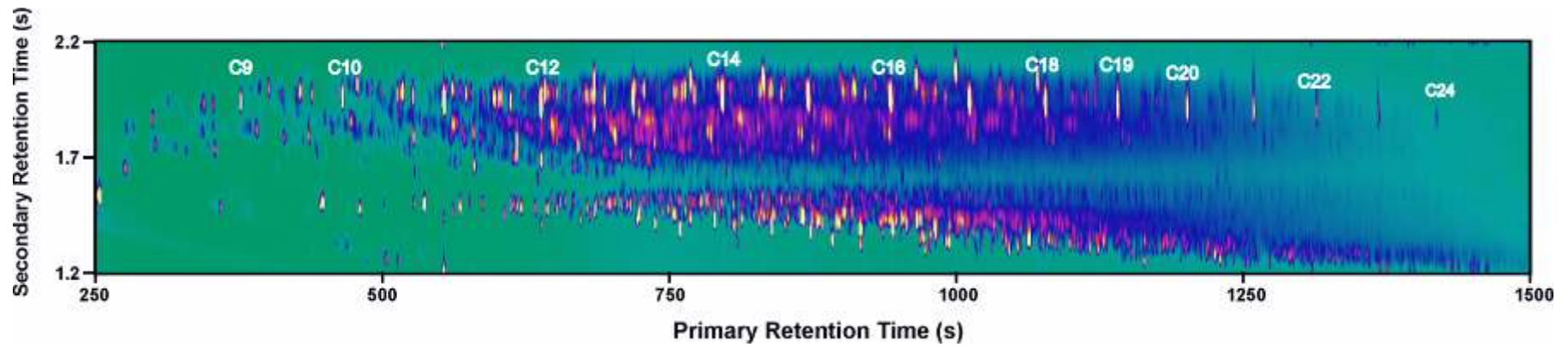
Χρωματογράφημα ανθρώπινης αναπνοής



1.5 L sampled
Full Scale = 500



0.2% Diesel Fuel in Hexane



0.2% Diesel Fuel in Hexane

