

Primjena višedimenzionalne kromatografije u analizi okoliša

Barić, Lana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:300393>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lana Barić

PRIMJENA VIŠEDIMENZIONALNE KROMATOLOGRAFIJE U
ANALIZI OKOLIŠA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Šime Ukić
izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
dr. sc. Suzana Sopčić

Zagreb, rujan 2016.

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Šimi Ukiću na strpljenu, pomoći i savjetima tijekom izrade ovoga rada.

Hvala prijateljima i prijateljicama koji su mi studentski život učinili ljepšim. Također hvala dečku koji je uvijek bio uz mene.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

SAŽETAK

Značajni izumi i tehnička ostvarenja osmišljena na polju kromatografije unazad nekoliko desetljeća omogućila su nove pristupe kromatografskom razdvajanju, osobito ističući višedimenzionalne kromatografske izvedbe. Porast svjesnosti analitičara o izvedbenim značajkama jednodimenzionalnih kromatografskih tehnika kao i konstantna potreba za analizom sve kompleksnijih analita (štoviše, uz što kraće vrijeme analize i što kvalitetniju separaciju) učinila je višedimenzionalnu kromatografiju iznimno prihvatljivim separacijskim pristupom. Svejedno, korisnici moraju biti svjesni i dalje prisutne kompleksnosti kao i visokih troškova ovog pristupa.

Višedimenzionalna kromatografija je danas prisutna u gotovo svim dijelovima ljudskog života. Pri tome ističem analizu okoliša kao jedan od ključnih problema današnjice.

Ključne riječi: kemijska analiza, višedimenzionalna kromatografija, analiza okoliša

SUMMARY

There have been significant discoveries and technical advantages in chromatography in last several decades which provided new modes of performing chromatographic separations, such as multidimensional chromatography. The increasing awareness of the performance limits associated with modern 1D chromatography and the continually increasing need to separate samples of greater complexity, moreover in less time and with better detection limits, promoted multidimensional chromatographic as quite acceptable analytical technique. Nevertheless, the users must be aware of still high performance complexity and significant level of costs that follows analysis by multidimensional chromatography.

Multidimensional chromatography is currently present in practically every part of human life, including environmental analysis as one of the nowadays most essential issues.

Key-words: chemical analysis, multidimensional chromatography, environmental analysis

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OSNOVE KROMATOGRFIJE	2
2.1. Povijest kromatografije.....	2
2.2. Temeljni pojmovi	2
2.2.1. Tekućinska kromatografija.....	3
2.2.2. Plinska kromatografija	4
2.2.3. Superkritična fluidna kromatografija	4
2.3. Karakteristične kromatografske veličine	4
2.3.1. Kromatografsko zadržavanje.....	4
2.3.2. Protok kroz porozni medij.....	5
2.3.3. Širenje kromatografske zone	5
2.3.4. Kapacitet pika.....	6
2.4. Kromatografski detektori.....	7
3. 2D KROMATOGRFIJA	10
3.1. Teorijske osnove.....	10
3.2. HPLC-GC	10
3.3. Višedimenzionalna plinska kromatografija	11
3.4. Višedimenzionalna tekućinska kromatografija	12
3.5. 2D plošna kromatografija	13
3.6. 2D elektroforeza visoke rezolucije	14

4. PRIMJENA VIŠEDIMENZIONALNE KROMATOGRAFIJE.....	17
4.1. Primjena u analizi okoliša.....	17
4.1.1. Analiza toksičnih tvari višedimenzionalnom plinskom kromatografijom	18
4.2. Primjena u analizi hrane	19
4.3. Primjena u industriji polimera i nafte	20
4.4. Primjena u biomedicini i farmaciji	20
4.5. Primjena u forenzici i toksikologiji	21
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24
7. ŽIVOTOPIS.....	30

1. UVOD

Prirodni svijet je kompleks koji se sastoji od složenih smjesa, primjerice petrolej može sadržavati od 10^5 do 10^6 komponenti, dok je procijenjeno da u ljudskom tijelu ima najmanje 150 000 proteina. Mnoge mješavine bitne za istražiti sastoje se od stotina pa čak i tisuća različitih komponenti. One su suviše složene da bi se razdvojile jednostavnom kromatografijom. [1].

Mnogi analitički problemi zahtijevaju veću razlučivost nego što to može pružiti jedna kromatografska tehnika. U takvim slučajevima snaga odvajanja može se poboljšati upotrebom više separacijskih tehnika ili mehanizama. [2]. Višedimenzionalna kromatografija pojavila se kao zanimljiva alternativa za analizu složenih kompleksa u tehnološkim poboljšanjima i dostigla svoju maksimalnu razinu. Pik kromatograma dobiven višedimenzionalnom kromatografijom daleko je veći od onoga kojeg daje jednodimenzionalna kromatografija. Višedimenzionalna kromatografija omogućuje separaciju dvaju neovisnih koraka čime povećava moć razlučivanja jednodimenzionalnog sustava, a time i fizičko odvajanje komponente u složenom uzorku. [3].

Ovaj rad bavi se upravo višedimenzionalnim kromatografskim tehnikama i njihovom primjenom u analizi okoliša.

2. OSNOVE KROMATOGRFIJE

2.1. POVIJEST KROMATOGRFIJE

Povijesno, kromatografija se počinje razvijati sredinom devetnaestoga stoljeća. Kromatografiju je početkom dvadesetog stoljeća izumio ruski botaničar Mihail Semenovič Cvet. On je odjeljivao otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Odijeljeni sastojci mogli su se vidjeti na koloni u obliku obojene vrpce po je tako ova tehnika i dobila ime kromatografija (grčki chroma što znači boja). [4]. Nove kromatografske tehnike razvijene su tijekom 30. i 40. godina 20 stoljeća kao korisni separacijski procesi, a značajnom razvoju kromatografije pridonijeli su Archer John Porter Martin i Richard Laurence Millington Synge u razdoblju od 1940. do 1950. godine. Upravo su Martin i Synge utemeljili osnovne principe kromatografije, što je potaklo daljnji brz razvoj novih kromatografskih tehnika. [5].

Počeci kromatografije u Hrvatskoj povezani su uz imena Đurđe Deur-Šiftar (plinska kromatografija) i Srećka Turine (tankoslojna kromatografija).

2.2. TEMELJNI POJMOVI

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja u kojoj se sastojci odjeljuju između dviju faza od kojih je jedna pokretna (mobilna), odnosno kreće se u određenom smjeru, dok je druga nepokretna (stacionarna). [6]. Kromatografski sustav sastoji se od pokretne i nepokretne faze te analita koji je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog dinamičke ravnoteže ispitivane tvari dolazi do narušavanja ravnotežnog stanja, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze. Pokretna faza može biti plinovita i tekuća koja nosi komponente uzorka kroz nepokretnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz nepokretnu fazu. Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća, dok tekuća ako je raspoređena na čvrstoj fazi ne mora sudjelovati u procesu odjeljivanja. Tekuća faza može se vezati na čvrstu kovalentnom vezom ili se imobilizirati na nju, na primjer *in situ* polimerizacijom nakon nanošenja. Eluat je naziv za otopinu pokretne faze koja izlazi iz kolone, a proces kojim se ispire analit s kromatografske podloge naziva se eluiranjem.

Zapis koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja naziva se kromatogram.

Glavne metode kromatografije su kromatografija ispiranjem, kromatografija istisnućem i frontalna kromatografija. Ako se uzorak unosi u sustav u ograničenoj količini, tada govorimo o kromatografiji istisnućem i ispiranjem. Ukoliko pokretna faza sadrži spoj koji se jače zadržava na nepokretnoj fazi nego sastojak uzorka koji se ispituje, uzorak će se istisnuti i govorimo o kromatografiji istisnućem. U kromatografiji ispiranjem pokretna faza, koja se u ovom slučaju naziva eluens, konstantno prolazi kroz kromatografsku podlogu. Eluens sadrži kompeticijske tvari koje se na kromatografskoj podlozi natječu za aktivna mjesta s ispitivanim uzorkom. Frontalna kromatografija je postupak u kojemu se uzorak (tekućina ili plin) kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu te se u njoj ne koristi dodatna pokretna faza.

Prema obliku kromatografske krivulje kromatografija se dijeli na kolonsku, u kojoj se nepokretna faza nalazi unutar kolone i plošnu, gdje je nepokretna faza unutar plohe.

Ukoliko govorimo o fizikalnom stanju pokretne i nepokretne faze, kromatografija može biti tekućinsko-tekućinska, tekućinsko-čvrsta, plinsko-tekućinska i plinsko-čvrsta, a prema fizikalnom stanju pokretne faze dijeli se na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima. [6].

2.2.1. Tekućinska kromatografija

Pokretna faza je kapljevinna, a nepokretnu fazu čine različiti sorbensi, stoga se tekućinska kromatografija može podijeliti na:

- adsorpcijsku kromatografiju (nepokretna faza je različiti adsorbens,
- razdjelnu (kapljevinska nepokretna faza je nanosena na čvrsti nosač).

Za razliku od plinske kromatografije, tekućinskom kromatografijom se mogu odjeljivati smjese zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti. [7]. Ovisno o polarnosti analita u tekućinskoj kromatografiji moguća je upotreba normalnih ili obratnih faza. Kromatografija normalnih faza pretpostavlja da je nepokretna faza polarna, a pokretna nepolarna. Odjeljivanje analita ovisi o interakciji s polarnom nepokretnom fazom. Kromatografija obrnutih faza pretpostavlja da je nepokretna faza nepolarna, a pokretna polarna. Mehanizam razdvajanja temelji se na hidrofobnosti analita. Primjenjuje se u razdvajanju homolognih i izomernih spojeva slične polarnosti te polarnih i ioniziranih spojeva koji se zbog čvrste veze s nepokretnom fazom ne mogu razdvajati kromatografijom normalnih

faza. [7]. U tekućinsku kromatografiju ubrajaju se: tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC), ionska (IC) i kromatografija isključenjem po veličini (SEC). [7].

2.2.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija jedna je od najčešće upotrebljivanih analitičkih tehnika i prva kromatografska tehnika kojom su se uspješno rješavali brojni problemi u medicini, biologiji, zaštiti okoliša, ali i u industriji. Postoje dvije temeljne tehnike u plinskoj kromatografiji:

- plinsko-adsorpcijska, u kojoj je čvrsti adsorbens nepokretna faza
- plinsko-tekućinska, nepokretna faza je kapljevina nanosena u tankom sloju na veliku, inertnu čvrstu površinu, a mehanizam separacije temelji se na razdiobi. [7].

Prednost metode je u brzini, mogućnosti odjeljivanja vrlo složenih smjesa te maloj masi uzorka, a nedostatak je što se njome mogu odjeljivati samo hlapljivi i toplinski stabilni spojevi. [7].

2.2.3. Superkrična fluidna kromatografija

Kromatografska separacija s fluidom kao mobilnom fazom iznad svoje kritične temperature i tlaka. Separacija se provodi s CO₂ koji predstavlja mobilnu fazu i kolonom tekućinske kromatografije kao stacionarnom.

Superkrična fluidna kromatografija omogućuje analizu smjesa koje je teško analizirati drugom kromatografskom metodom. [8].

2.3. KARAKTERISTIČNE KROMATOGRFSKE VELIČINE

2.3.1. Kromatografsko zadržavanje [7]

Tijekom prolaska kroz stupac molekule uzorka provode dio vremena u pokretnoj, a dio u nepokretnoj fazi. Sve molekule ostaju jednako dugo u pokretnoj fazi. To je tzv. zadržano vrijeme t_m , koje je jednako vremenu koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka detekcije.

Vrijeme zadržavanja otopljene tvari t_R jest vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu tvar.

Prilagođeno vrijeme zadržavanja $t_{R''}$ je vrijeme koje otopljena tvar provede uz nepokretnu fazu.

$$t_R = t_m + t_{R''} \quad (1)$$

Za optimizaciju kromatografske separacije važan je omjer vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi i vremenu u pokretnoj fazi. To se označava faktorom zadržavanja k :

$$k = \frac{t_{R''}}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (2)$$

Mogućnost separacije dvaju spojeva odnosno njihovo relativno zadržavanje izraženo je separacijskim faktorom α :

$$\alpha = \frac{k(A)}{k(B)} \quad (3)$$

Navedene veličine odnose se na kromatografiju na stupcu, a kada se govori o plošnoj tada se upotrebljava faktor zaostajanja R_F koji predstavlja omjer puta prijeđenog otapala i puta kojeg prijeđe ispitivana tvar.

$$R_F = \frac{l(\text{otapala})}{l(\text{tvari})} \quad (4)$$

2.3.2. Protok kroz porozni medij

Pokretna faza kroz sloj nepokretne faze u stupcu uglavnom protječe njezinim međuprostorima. Pokretna faza uhvaćena unutar poroznih čestica uglavnom je stagnirajuća.

2.3.3. Širenje kromatografske zone

Prilikom prolaska uzoraka kroz nepokretnu fazu, kromatografska zona se širi proporcionalno duljini puta ili vremenu. Širenje zone ukazuje na učinkovitost kromatografske separacije. Iskazuje se kao:

- Broj teorijskih tavana (odsječaka), n
- Visina tavana (odsječaka), H (omjer duljine stupca, L , i broja teorijskih odsječaka, n)

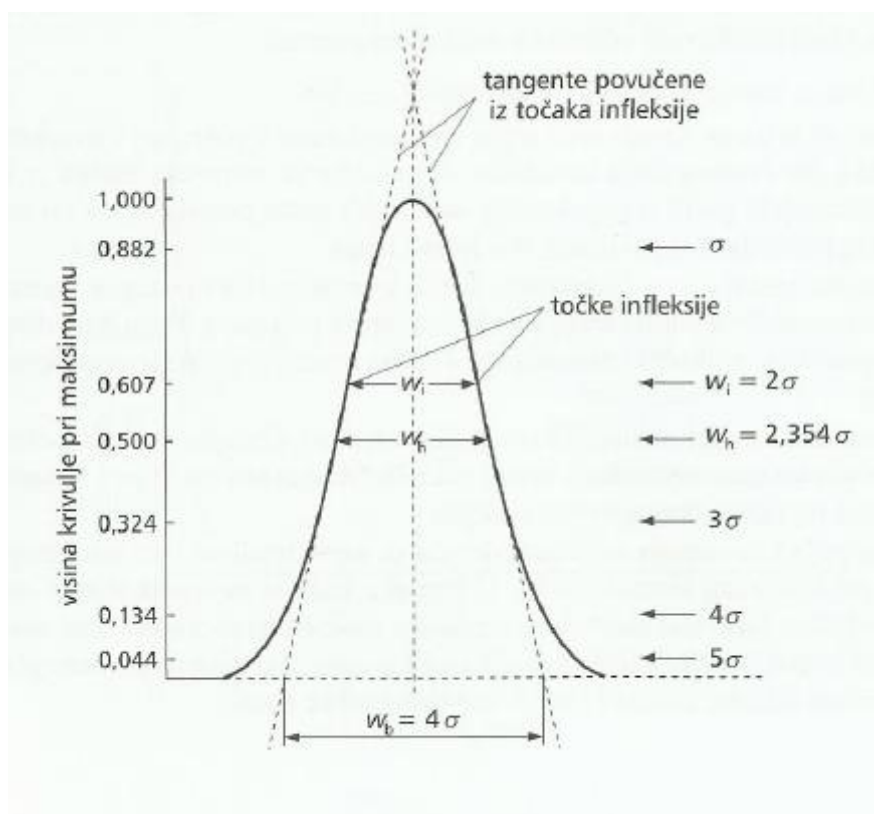
$$H = \frac{L}{n} \quad (5)$$

Ako se pretpostavi da se koncentracija kreće po Gaussovoj razdiobi tada se broj teorijskih odsječaka može izraziti ovisno o varijanci i vremenu zadržavanja prema izrazu:

$$n = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 \quad (6)$$

gdje je σ_t^2 varijanca u jedinici vremena. U praksi se umjesto varijance koristi širina kromatografske krivulje, w :

$$n = \alpha \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (7)$$



Slika 1. Karakteristična svojstva kromatografske krivulje. [7].

2.3.4. Kapacitet pika

Još jedna važna karakteristična veličina u kromatografiji je kapacitet pika. On se može definirati kao maksimalan broj pikova koji se mogu riješiti, s danim razlučivanjem, u definiranom separacijskom prostoru. Pod separacijskim prostorom, smatra se broj eluiranih pikova od prvog do posljednjeg. [9].

Za izokratnu separaciju Grushka je izračunao kapacitet pika n_1 :

$$n_1 = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{1+k'_2}{1+k'_1} \quad (8)$$

gdje su k_1 i k_2 faktori zadržavanja prve i posljednje komponente. [9].

Slično, kapacitet pika se može izračunati za gradijentnu separaciju pod pretpostavkom da je širina pika konstanta za sve komponente.

$$n_1 = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{k'_{G,2}}{k'_{G,1}} \quad (9)$$

N , mjeren za $k'=k'_G$ je proizvoljan broj. Međutim, značenje ima samo kada su uvjeti za izokratnu separaciju i Gaussovu krivulju. Pikovi skoro nikada nisu u Gaussovoj krivulji i u gradijentnoj separaciji postoji pretpostavka da N i t_0 ostaju konstantni tijekom promjene eluirane komponente. Ovi izrazi, da bi bili razumljiviji, mogu se uvrstiti u jednadžbu:

$$n_1 = 1 + \frac{at_G}{b + t_G} \quad (10)$$

Gdje su a i b konstante. Pik kapaciteta se može onda izračunati tako da se riješe konstante a i b uvrštavanjem u jednadžbu s eksplicitnom mjerenim n vs. t_G u bazi podataka.

Baza podataka je izgrađena iz mjerenja i računanja „uzorka“ i „kondicionalnog“ kapaciteta pika, n_c za gradijentu seriju (na primjer $t_G = 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20$ min...) iz jednadžbe:

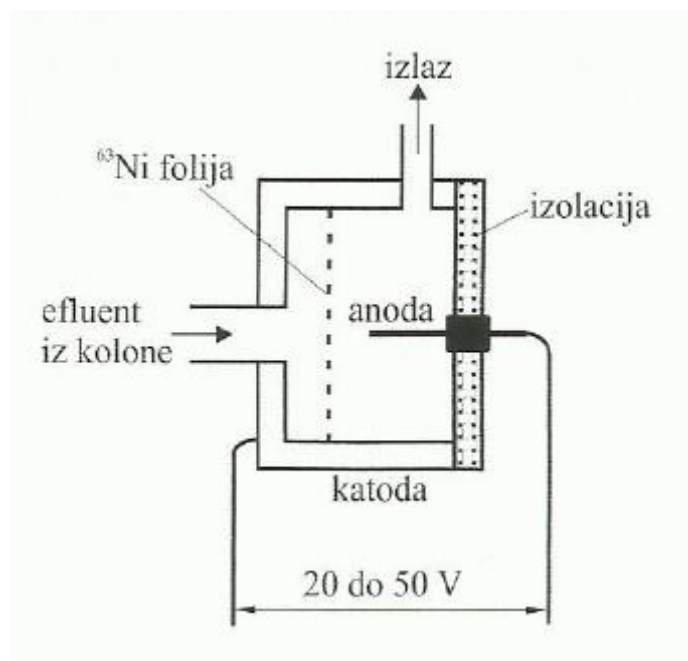
$$n_c = 1 + \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{\bar{w}} \quad (11)$$

Gdje su $t_{R,n}$ i $t_{R,1}$ retencijska vremena, a \bar{w} je prosječna bazna linija širine pika.

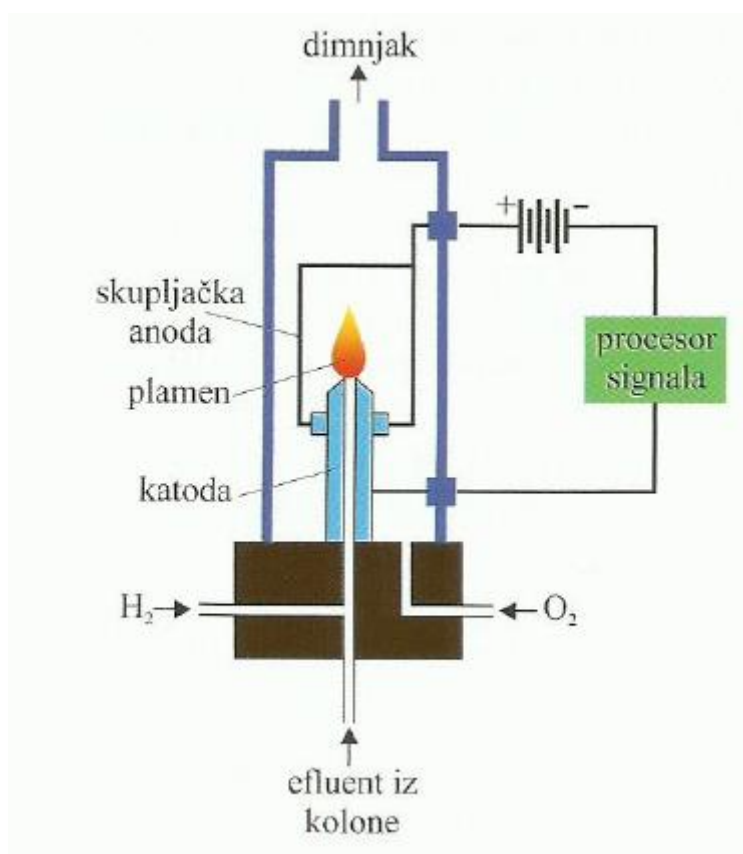
2.4. KROMATOGRAFSKI DETEKTORI

Kod plinske kromatografije postoje univerzalni detektori (plameno-ionizacijski) i specifični (detektor zahvata elektrona, plameni fotometar, FTIR (*Fourier Transform Infrared*) spektrometar i spektrometar masa.

Važni detektori kod tekućinske kromatografije su spektrometar masa, spektrofotometrijski detektori u UV-VIS području elektromagnetskog zračenja, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa loma, oni koji se temelje na raspršenju elektromagnetskog zračenja na isparenom uzorku te elektrokemijski detektori (konduktometrijski i amperometrijski).

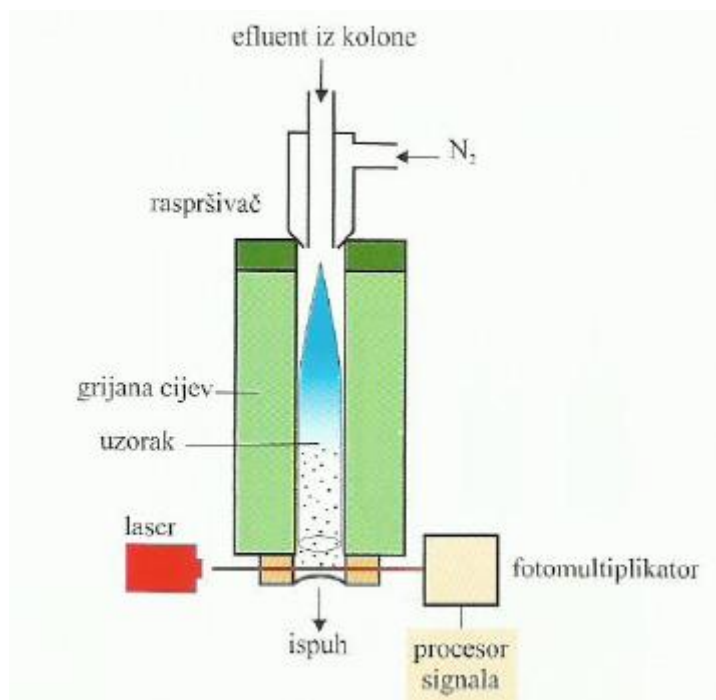


Slika 2. Detektor zahvata elektrona. [10].

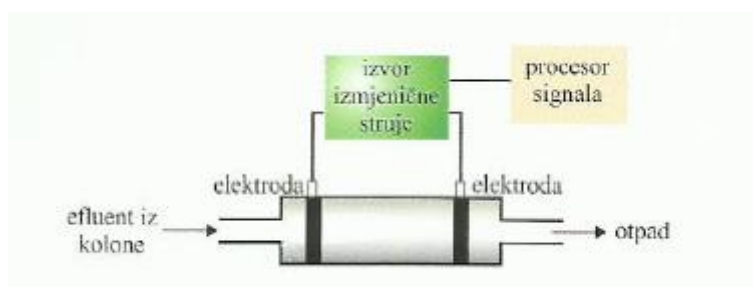


Slika 3. Plameno-ionizacijski detektor. [10].

Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze pri čemu se mjeri indeks loma ili provodnost pa se otopljeni analit dokazuje neizravno iz tih veličina ili prate karakteristike otopljene tvari. [10].



Slika 4. ELS (*Evaporative Light Scattering*) detektor. [10].



Slika 5. Konduktometrijski detektor. [10].

3. 2D KROMATOGRAFIJA

Veliki dio uzoraka koji su zanimljivi znanstvenicima za proučavanje vrlo su složene prirode. Kako bi se takvi uzorci pravilno analizirali (identifikacija/kvantifikacija) moraju se prethodno separirati. Višedimenzionalna kromatografija je jedna od najučinkovitijih metoda odvajanja složene smjese pri čemu su sastojci smjese organizirani u skupine na temelju njihovih kemijskih svojstava. Ovakav višedimenzionalni pristup osigurava veću moć razlučivanja složenih smjesa.

3.1. TEORIJSKE OSNOVE

Dvodimenzionalna kromatografija može biti izravna (dva kromatografa su spojena u sustav *on-line*) i neizravna (*off-line*).

Danas postoje dva oblika višedimenzionalne plinske kromatografije: konvecionalna (engl. *heart-cut*) i sveobuhvatna dvodimenzijska (engl. *comprehensive*). U konvencionalnoj samo dijelovi eluata s nerazdvojenim komponentama smjese ulaze u drugu kolonu, dok u sveobuhvatnoj GC×GC, kao i u LC×LC te LC×GC, cijeli uzorak pomoću modulatora ulazi u drugu kraću kolonu različitih karakteristika u kojoj odjeljivanje traje kratko, 2-10 sekundi ili manje. Zbog dviju vrijednosti vremena zadržavanja dvodimenzionalno odjeljivanje omogućuje bolje dokazivanje sastojaka. [10].

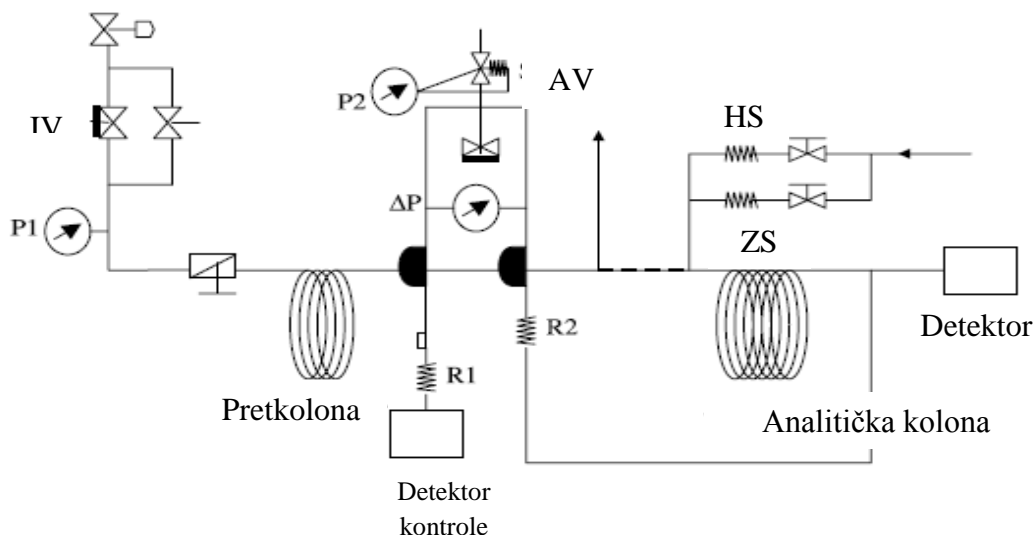
3.2. LC-GC

U slučaju LC-GC, selektivnost LC separacije spojena je s visokom učinkovitošću i osjetljivošću GC separacije, što u konačnici daje velik kapacitet kromatograma (engl. *peak capacity*). *Off-line* spajanje LC-GC često se koristi zbog jednostavnog rukovanja i prikupljanja tekućina, no tehnika je dugotrajna i naporna i uključuje brojne korake pri čemu postoji rizik od onečišćenja, formiranja artefakata i gubitka uzorka. *On-line* spajanje LC-GC donosi nekoliko prednosti: nije potrebna velika količina uzorka, uzorak se ne mora obrađivati te nije potrebno isparavanje ili razrjeđivanje. Nedostatak *on-line* sustava je skupoća početne instalacije, nezgodno rukovanje sustavom i poprilično komplicirana sučelja. Glavni problem koji bi trebalo riješiti kod LC-GC je prijenos velike količine kapljevine iz jednog sustava u drugi. Naime prilikom transfera iz LC u GC uzorak mora prijeći iz jedne faze u drugu, pa

velike količine tekućine predstavljaju problem. Sve do danas poznate tehnike prijenosa zasnovane su na selektivnom uklanjanju otapala, pri čemu na ulazu u kolonu ostaju samo otopljene tvari. [1].

3.3. VIŠEDIMENZIONALNA PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Postoje dva glavna zahtjeva koja definiraju višedimenzionalno odvajanje [11]. Prvo, komponente su podvrgnute na dva ili više međusobno nezavisna separacijska koraka, drugo, jednom separirane komponente moraju ostati odvojene dok ne završi proces. GC-GC je praktična alternativa za povećanje kapaciteta kromatograma. Metodi je potrebno manje vremena za analitički postupak nego kod ostalih spojenih metoda, poput LC-GC, stoga se GC-GC, kao napredna tehnika, primjenjuje za odvajanje smjesa toksičnih tvari.



Slika 6. Shematski dijagram instalacije višedimenzionalne plinske kromatografije. [33].

P_1 , P_2 i ΔP = tlakovi, R_1 i R_2 = otpornici, AV = automatski ventil, IV = igličasti ventil,

HS = hladena spirala, ZS = zagrijana spirala

Kao što se vidi na slici 9., GC-GC sustav sastoji se od neovisne dvostruke peći i detektora. T-komad omogućuje kvantitativan i reproducibilan prijenos malih, izabranih frakcija eluensa iz prve u drugu kolonu, a proces se naziva konvencionalan (heart-cutting). Detektori koji služe za analizu višedimenzionalne plinske kromatografije su EDC (engl. *electron capture detector*) (za analizu organohalogenih spojeva) i MS zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti.

Oštrina GC-GC razlučivanja određuje se prema dimenziji stupca i razlike u moći razdvajanja između dviju nepokretnih faza. Duge kolone i manji unutarnji promjeri poboljšavaju razdvajanje. Razlika u selektivnosti između dviju nepokretnih faza može utjecati na konačno razdvajanje, na primjer, odvajanje će poboljšati povećanje razlike u polarosti. Dakle, konvencionalna tehnika mora omogućiti bolju razlučivost za potpuno odvajanje ciljnih kongenera od ostalih interferencija. Općenito, prva kratka kolona se koristi za izolaciju frakcije analita koji je naknadno izdvojen iz interferirajućih komponenata koristeći drugu dugu kolonu. Iako višedimenzionalna plinska kromatografija u pravilu daje iznimno visoku razlučivost, moguće je provesti samo manji broj diskretnih heart-cut prijenosa tijekom pojedine analize. Nažalost, ovime se jako ograničava kapacitet kromatograma. [12].

3.4. VIŠEDIMENZIONALNA TEKUĆINSKA KROMATOLOGRAFIJA

Tehniku definiraju dva različita kriterija. [13]. Prvi kriterij je da komponente moraju biti pomaknute s dvije ili više separacijske tehnike koje uključuju mehanizam ortogonalne separacije, a drugi, komponente razdvojene pojedinačnom separacijom ne smiju se kombinirati u svakoj daljnjoj separaciji. [14].

Spajanje tekućinske kromatografije odnosi se na konvencionalan način u kojem se frakcije iz jedne kolone selektivno prenose u drugu za daljnu separaciju.

U odnosu na konvencionalu kromatografiju, sveobuhvatnu LCxLC karakterizira uvjet da se cijeli proces provodi *on-line*. Preneseni volumen mobilne faze iz jedne kolonu u drugu može odgovarati grupi pikova, pojedinačnom piku ili frakciji pika tako da različiti dijelovi uzorka mogu slijediti različite staze kroz LCxLC konfiguraciju. Veliki broj čimbenika igra ulogu u razdvajanju LCxLC postupka; moć separacije kromatografske kolone, sastav mobilne faze, priroda i broj analita te vrsta matrice i interferencije. Postoje tri pristupa 2D-LC: *on-line*, *stop and go* i *off-line* pristup. [15].

On-line pristup

On-line se sastoji od sekundarne dimenzije koja se provodi u stvarnom vremenu s primarnom dimenzijom. Ovaj sustav zahtijeva da druga analiza jedne frakcije mora biti dovršena tijekom vremena koje je potrebno za prikupljanje frakcije, prijenosa i analize te vraćanje kolone prema primarnim uvjetima analize. To ograničava separaciju druge dimenzije

kako bi bila dovršena u kratkom vremenu, rezultirajući do ograničene separacije. Gradijent druge dimenzije je reda veličine od nekoliko sekundi do dvije minute u *on-line* sustavu.

Stop and go pristup

Ovaj pristup uključuje pauziranje ili zaustavljanje eluiranja kolone prve dimenzije, dok se frakcija prenosi i analizira u koloni druge dimenzije i zatim se eluiranje nastavlja u koloni prve dimenzije. To donekle ublažava ograničeno vrijeme druge dimenzije, no može doći do prekomjerne dužine vrha pika što smanjuje učinkovitost separacije prve dimenzije.

Off-line pristup

U *off-line* sustavu eluirana frakcija iz kolone prve dimenzije je prikupljena i pohranjena na neodređeno vrijeme, do ubrizgavanja frakcije u kolonu druge dimenzije. Nema ograničenog vremena te ne postoji gornja granica separacije. Prednost *off-line* sustava je ta da samo jednodimenzionalna tekućinska kromatografija je potrebna kako bi se izvršila separacija 2D-LC. [1].

3.5. 2D PLOŠNA KROMATOGRAFIJA

Neupitno je da se većina analitičkih problema može riješiti plošnom kromatografijom TLC (tankoslojna kromatografija) dok za analitičku primjenu nije praktično primijeniti 2D TLC. Međutim, 1D ima neadekvatnu sposobnost za rješavanje složenih bioloških smjesa te za takve uzorke se primjenjuje višedimenzionalna kromatografija. [16].

Višedimenzionalna kromatografija iskorištava kombinacije različitih mehanizama separacije ili sistema; takvi postupci se razvijaju kombinacijom bilo koji različitih mehanizama ili faza (pokretna i/ili nepokretna) te elektroforetskim tehnikama. Točna definicija višedimenzionalne kromatografije ima dva uvjeta. Prvo, komponente složene smjese koje su podvrgnute na dva ili više separacijska koraka u kojima njihovi pomaci ovise o različitim faktorima. Drugi kriterij, dvije komponente razdvojene uglavnom u pojedinačnom koraku, ostaju separirane dok se ne završi kompletna separacija. Posljedni uvjet podrazumijeva da komponente spojene u prvom separacijskom sistemu ne mogu biti spojene u drugom. Sljedeći načini su najčešće korišteni za višedimenzionalnu kromatografiju i uključuju plošnu kromatografiju:

- 2D razvoj na istom monosloju stacionarne faza s mobilnim karakteriziran je s različitom snagom otapala i vrijednošću selektivnosti
- 2D razvoj na istom dvosloju stacionarne faze karakteriziran je ili s istom mobilnom ili s mobilnim fazama različitog sastava
- Višestruki razvoj u jednoj, dvije ili tri dimenzije karakteriziran je s različitom snagom otapala i vrijednošću selektivnosti
- Spojeni slojevi sa stacionarom fazom padajućih polariteta razvijeni s mobilnom fazom istog sastava
- Kombinacija od najmanje dva navedena načina
- Automatsko spajanje dvije kromatografske tehnike u kojoj se PC (plošna kromatografija) koristi kao druga dimenzija i druga separacijska metoda, a prva npr. GC, HPLC...

3.6. 2D ELEKTROFOREZA VISOKE REZOLUCIJE

Ukratko, elektroforeza se definira kao putovanje električki nabijenih čestica kroz otopinu pod djelovanjem električnog polja. [17].

Metodom elektroforeze u jednoj dimenziji moguće je razlučiti 50-60 diskretnih zona. Pri tome se molekule razdvajaju na temelju ukupnog električnog naboja, izoelektrične točke, veličine odnosno mase molekule itd. U analizi kompleksnih analita, koji sadrže tisuće različitih makromolekulskih vrsta, nalazi se veliki broj molekulskih vrsta unutar diskretne zone. Elektroforezom u drugoj dimenziji, odnosno okomito na smjer razdvajanja u prvom stupnju, mogu se razdvojiti molekulske vrste. Na taj način dobiju se razdvojene molekulske vrste u dvije dimenzije koja omogućuje identifikaciju i determinaciju velikog broja analita.

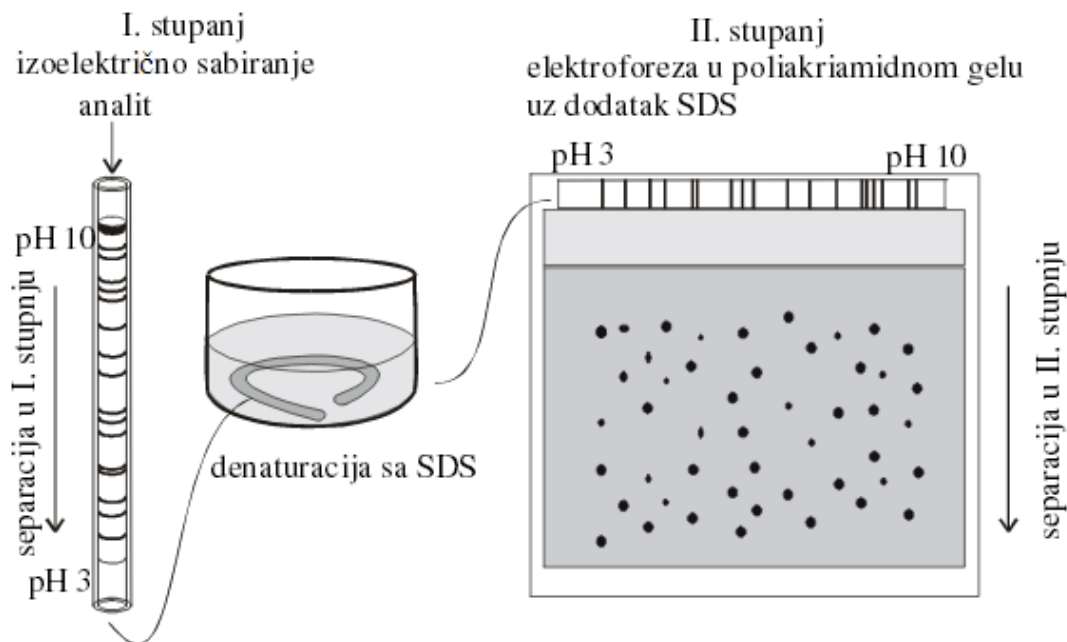
2D elektroforeza visoke rezolucije jedina je metoda elektroforeze u dvije dimenzije koja omogućuje razdvajanje kompleksne smjese proteina. Danas je temeljna metoda u analizi proteinskih molekulskih vrsta cijelih stanica i tkiva u tzv. *proteome* analizi. [18].

O'Farell [19] uveo je 1975. godine metodu, razdvojivši 1100 stanica proteina *Escherichia coli* na jednoj separacijskoj plohi.

Izoelektričnim sabiranjem u vertikalnom cilindričnom poliakrilamidnom gelu učinjeno je razdvajanje u prvoj dimenziji, a u drugoj na vertikalnoj ploči poliakrilamidnog gela.

Pošto je to analiza ukupnih proteina, primijenjena su denaturirajuća sredstva za otapanje najvećeg dijela proteina stanice, u prvoj dimenziji urea i neionski deterdžent, a u drugoj natrijev dodecilsulfat (SDS) [20]. U otopinu za polimerizaciju, uz poliakrilamidni gel, dodan je i neionski deterdžent otopina amfolita te je pomoću njih uspostavljen gradijent pH.

Nakon polimerizacije u napravi za vertikalnu elektroforezu s otopinom NaOH u gornjoj komori za elektrode i otopine H_3PO_4 , u donjoj komori uspostavljen je, stupnjevitim povećanjem električnog napona, gradijent pH. Uz prekid napona, na gornju površinu gela uštrcana je otopina analita i nad nju otopina uree i amfolita. Izoelektrično sabiranje učinjeno je uz iste otopine u komorama za elektrode, ponajprije uz napon od 400 V, a zatim uz 800 V. Zatim je gel istisnut iz staklene cijevi i uronjen u otopinu pufera koja sadrži i natrijev dodecilsulfat.



Slika 3. Načelo dvodimenzijske elektroforeze. [17].

U drugom stupnju razdvajanja korišten je poliakrilamidni gel u obliku ploče s gradijentom pora. Iznad separacijskog gela izliven je sloj gela za nagomilavanje. Stavljanjem umetka, u gornjoj površini gela za nagomilavanje, prije polimerizacije, formiran je kanal u koji je umetnut valjkasti gel iz prvog stupnja razdvajanja.

Elektroforeza je provedena uz kontrolu struje u drugom stupnju. Rezultat je sustav točaka razdvojenih molekula u ploči gela.

Za identifikaciju i detekciju važna je dobra reprodukcija rasporeda točaka u ponovljenom mjerenju. Identifikacija se najčešće čini usporedbom prema mapi rasporeda točaka dobivenih razdvajanjem smjesa poznatih molekulskih vrsta uz iste uvjete razdvajanja.

4. PRIMJENA VIŠEDIMENZIONALNE KROMATOGRAFIJE

Kromatografija je najbolja tehnika za separaciju smjese kompleksa. Uzorci koji se analiziraju često su složeni te analitičar često mora odabrati kompleksne tehnike analize. Višedimenzionalne separacije, *off-line* i *on-line*, korištene su za analizu složenih uzoraka.

Višedimenzionalna kromatografija primjenjuje se u raznim poljima poput ekologije [21,22], analizi hrane [23,24], industriji nafte i polimera [25], biomedicini, farmaciji, forenzici [26] i toksikologiji.

4.1. PRIMJENA U ANALIZI OKOLIŠA

Uzorci okoliša mogu biti jako kompleksni jer je velik broj komponenti polaran, a postoji i mnogo izomera i kongenera sa sličnim karakteristikama, stoga je teško takve komponente odvojiti koristeći jednodimenzionalne kromatografske metode. Poznato je da su glavni ciljevi u većini analiza, pa tako i analizi okoliša: osjetljivost, selektivnost te automatiziranost analiza, a višedimenzionalna kromatografija ostvaruje sva tri cilja: osjetljivost je pojačana injektiranjem velike količine volumena u kombinaciji s kompresijom pika, selektivnost je pojačana ako se za separacije koriste kolone različitih selektivnosti dok *on-line* tehnike smanjuju broj ručnih operacija u analitičkom postupku.

U analitici okoliša primjeri primjene višedimenzionalnih kromatografskih tehnika nalaze se podjednako u kontroli zagađenja [27] kao i kod detekcija komponenti od interesa [22].

Što se tiče kontrole zagađenja, podjednako je važno pratiti prioriteta zagađivala [27] kao i ona koja to nisu. Ponekad selektivnost kolone nije dovoljna. Često detekcija masenom spektrometrijom (MS) može riješiti problem pa se za rutinsku analizu primjenjuje GC-MS [28]. No, MS kao i MS/MS ne mogu uvijek riješiti problem, stoga je najprikladnija tehnika višedimenzionalna kromatografija. Često je problem u analizi okoliša niska razina mikrozagađivala koju treba odrediti pri čemu je višedimenzionalna kromatografija idealna tehnika [29].

Općenito, kapilarna plinska kromatografija pruža visoku rezoluciju za većinu određivanja u analizi okoliša [30], a višedimenzionalna kromatografija se primjenjuje u

analizi okoliša za separaciju složene skupine spojeva [31]. Važna primjena GC-GC je u analizi organskih mikrozagađivala [29], polikloriranih dibenzodioksina [32], polikloriranih dibenzofurana [33] i polikloriranih bifenila [34], koji zbog sličnih svojstava imaju problematičnu separaciju.

4.1.1. Analiza toksičnih tvari višedimenzionalnom plinskom kromatografijom

Razlog separacije višedimenzionalne plinske kromatografije može se objasniti kada veliki broj pikova u sekundarnoj dimenziji separacije okolišnih zagađivala ukazuje na to da je razlučivost u jednoj koloni nedovoljna pa dolazi do lažno pozitivnih rezultata. To je osobito kada se koristi spektrometrijska detekcija za kvantifikaciju.

Za određivanje polikloroterfenila (PCT) [33] korišteni su detektori ECD i MS. Određivanje kompletnog polikloroterfenila jako je teško pomoću MS. Zbog kemijskih transformacija, biološke raspoloživosti, metabolizma i eliminacije iz organizma, pik uzorka polikloroterfenila bit će različit od polikloroterfenila [33] u tehničkim smjesama. Teško je kvantificirati PCT, gotovo nemoguće, zbog nedostatka u komercijalnoj dostupnosti pojedinačnog PCT-a.

Jedno od najvažnijih ograničenja višedimenzionalne plinske kromatografije je činjenica da se snaga separacije može primijeniti samo na nekoliko dijelova u kromatogramu, umjesto na cijeli uzorak. Dugotrajan je proces analiziranja komponenti u složenom uzorku korištenjem višedimenzionalnog pristupa. Ključni problem konvencionalnog procesa je pravilno i precizno mjerenje.

Višedimenzionalna plinska kromatografija nije pogodna za opsežne analize složenih smjesa te je teško mjeriti male pikove u složenim uzorcima. Prisutnost smetnji i pomaci u zadržanom vremenu mogu dovesti do netočnih rezultata čak i kada se ispitivanja provode u visoko kvalificiranom laboratoriju.

Pošto je višedimenzionalna plinska kromatografija obećavajuća tehnika u rješavanju kompleksnih toksičnih tvari [35] i ostvaruje analitičku preciznost i točnost, može se reći da bilo koja tehnika, koja ostvaruje takav cilj i koja se može primijeniti na cjelokupni uzorak, također ima važnu ulogu u pružanje vrhunske analize, posebice ako je tehnologiju lakše provesti.

Danas se višedimenzionalna kromatografija rijetko koristi za određivanje pesticida u uzorcima okoliša, iako se sveobuhvatna GCxGC može primijeniti na određivanje pesticida u kompleksnijim uzorcima, kao što je ljudski serum. [36,37,38]. S druge strane, novi trendovi

na tržištu pesticida koji se kreću prema proizvodnji aktivnih enantiomera, [39] mogu biti novo područje za primjenu sveobuhvatne plinske kromatografije.

GCxGC se također koristi za kvantitativnu analizu zagađenih okolišnih ekstrakata koristeći spektralne tehnike detekcije kao što su infracrvena spektroskopija i masena spektrometrija [40]. Te tehnike daju najbolje rezultate kada se radi o čistoj tvari, stoga treba u kromatografskom procesu izbjegavati preklapanje vrhova. [1].

Višedimenzionalna LC-LC, s dvije kolone visoke razlučivosti te mehanizmom ortogonalne separacije, ima nekoliko primjena u analizi okoliša. Primjenjuje se za analizu polarnih komponenti kao što su izoproturon i bentazon [41] te manje polarnih poput pentaklorfenola. [42].

LC-GC je jako moćna tehnika zbog svoje osjetljivosti i selektivnosti u analizi složenih smjesa te se kao takva primjenjuje u velikoj mjeri za određivanje komponente u tragovima u uzorku okoliša. LC omogućuje razdvajanje i koncentraciju komponenata prema vrsti spoja, dok GC služi za analiziranje frakcija. Grob i suradnici te Brinkman grupa [43] proučavali su primjene LC-GC tehnike u analizi okoliša. Tehnika je uglavnom primijenjena na vodu, zrak [44] i ekstrakte tla. Jedan primjer je odvajanje i identifikacija alkiliranih, oksigeniranih i nitriranih policikličkih spojeva u zraku. [45].

4.2. PRIMJENA U ANALIZI HRANE

Hrana [23,46] je dobar primjer složene prirodne smjese. Analiza tih matrica se može provesti tako da se:

- odredi kvalitativni i/ili kvantitativni sastav komponente
- kontrolira kvaliteta i autentičnosti proizvoda
- otkrije prisutnost primjesa ili onečišćenja

Ponekad, jednodimenzionalna separacija nije dovoljna kako bi riješila komponente. Problem koji se može pojaviti je preklapanje pikova i često je potrebno razdvajanje uzorka. Separacija teži cilju smanjenja složenosti matrice izvornog uzorka, separacijom jednostavnije frakcije od izvornog uzorka. Frakcija treba sadržavati istu količinu analita kao cijeli uzorak, treba biti spremna za analizu i bez interferencija koji bi ometale kromatografsku analizu. Separacija se najčešće provodi *off-line* tehnikom, iako postoji nekoliko nedostataka kao što su duže vrijeme separacije, mogućnost onečišćenja itd... S druge strane, *on-line* separacijske

metode razvijene su tako da imaju smanjeno vrijeme analize naspram klasične *off-line* tehnike kako bi se dobili analiti s minimalnim interferencijama. Nedostatak tehnika je skuplja i složenija oprema nego kod jednodimenzionalne kromatografije. [1].

Sveobuhvatna GCxGC korištena je za određivanje aromatskih ugljikovodika u školjkama [47] dok su policklički aromatski ugljikovodici određivani u jestivim uljima poput maslinovog i suncokretovog. [48].

4.3. PRIMJENA U INDUSTRIJI POLIMERA I NAFTE

Višedimenzionalna tehnika se također primjenjuje u analizi uzoraka polimera. [49,50].

Višedimenzionalna kromatografija primjenjuje se i za analizu industrijskih kemikalija i srodnih uzoraka. Industrijski uzorci koji se njome analiziraju su katran [51], laki ugljikovodici [52], trihaloalkani i trihaloalkeni u industrijskim otapalima, čađa te razne industrijske kemikalije prisutne u benzinu i uzorcima ulja. [53,54].

Od svojih početaka, kromatografija igra važnu ulogu u industriji ulja. [53,54]. Složenost frakcije nafte nije u broju komponenti različitih klasa, već u totalnom broju komponenti koje su prisutne. Za razliku od drugih složenih spojeva u kojima je nekoliko specifičnih komponenta separirano od matrice, u frakciji nafte analiti su komponente same matrice. [55].

4.4. PRIMJENA U BIOMEDICINI I FARMACIJI

Separacije igraju važnu ulogu u analizi farmaceutskih i bioloških uzorka. [56,57]. Pošto su uzorci složeni i smanjuje se razina koncentracije, potreban je sustav s viskom učinkovitošću i osjetljivošću. Uvjet koji je još potreban je smanjeno vrijeme analize jer broj uzoraka raste, a informacije trebaju biti brzo dostupne. To također znači da treba obratiti pozornost na postupak uzorka prije liječenja koji treba biti integriran s korakom analize, po mogućnosti u automatiziranom sustavu. Spajanje kromatografskih sustava prema istom načinu ili spajanje kromatografskih sustava prema različitim načinima pokazali su visok potencijal u postizanju tih ciljeva. Ti takozvani kromatografski sustav nudi mnoge

mogućnosti, povećanje selektivnosti i osjetljivosti cjelokupnog analitičkog sustava, posebice kada se kombiniraju više ili manje ortogonalne tehnike.

Glavna tehnika u području farmacije i biomedicine je tekućinska kromatografija [58] i često je jedna od komponenti kada govorimo o spojenom sustavu. Spajanje kolona tekućinske kromatografije se naširoko koristi, a LC-GC se primjenjuje u bioanalizi. *On-line* spajanje krute faze ekstrakcije s LC ili GC koristi se za određivanje farmaceutskih i bioloških tvari. Može se dodati da kapilarna elektroforeza [18] ima visok potencijal za separaciju droga, proteina i peptida. Tehnika koja se češće primjenjuje u polju farmacije i biomedicine je *on-line* jer nudi kraće vrijeme analize i dobre mogućnosti za automatizaciju. [43].

U biomedicinskoj analizi LC-LC je jedna od najopsežnijih i uspješno korištenih tehnika za analizu droga i sličnih spojeva u matricama kao što su plazma [59], urin [60] i serum. [36,37,38].

4.5. PRIMJENA U FORENZICI I TOKSIKOLOGIJI

U forenzici i toksikologiji, [61] kemijska analiza uključuje detekciju i identifikaciju komponenata koje su pokazatelji bolesti, otrova i mnoge vrste nezakonitih aktivnosti. Često se analiti nalaze u teškim matricama kao što su krv, [62] serum [36,37,38], urin [63], tkiva [64], kosa [65] i komadići različitog materijala. Budući da je mnogo analita za određeni uzorak, ekstrakcija i kromatografija su tehnike koje se naširoko koriste u forenzičkoj i toksikološkoj analizi za separaciju analita iz složene matrice. Potrebna je identifikacija s ortogonalnom tehnikom kao što je masena spektrometrija. U klasičnoj kromatografskoj analizi, složenost uzorka i matrice, identifikacija i kvantitativna detekcija zahtijevaju složenu i opsežnu metodu pripreme uzorka.

Kako bi se smanjile ili eliminirale *off-line* tehnike pripreme uzorka, primijenjene su višedimenzionalne tehnike za takve teške analize. LC-GC primjenjuje se u brojnim programima za analizu otrovnih spojeva ili metabolita iz biološke matrice poput tkiva [64] i masti. Van der Hoff i suradnici koristili su tu metodu za odvajanje i određivanje organoklornih pesticida i polikloriranih bifenila [33] iz matrica masti. [64]. GC-GC koristi se za analizu složenih smjesa kao što su eksplozivni plinovi i za uzorke u kojima je potrebna posebna selektivnost, poput prepoznavanja kiralnosti. Podebrad je odredio nekoliko kiralnih aminokiselina indikativne javorom sirupu za urinarne bolesti. [66].

Za razliku od analize okoliša, višedimenzionalnoj kromatografiji u toksikološkoj i forenzičkoj analizi nije posvećeno toliko pažnje, iako se nude mnoge mogućnosti te visok potencijal. Višedimenzionalna kromatografija nudi forenzičaru visoku osjetljivost i razlučivost te kraće vrijeme analize. [1].

5. ZAKLJUČAK

Ovim završnim radom pokušao je dati pregled upotrebe višedimenzionalnih kromatografskih metoda u danas iznimno važnom aspektu ljudskog života, a to je okoliš. Tradicionalne kromatografske metode i dalje su iznimno zastupljene u raznim sferama ljudskog djelovanja i njihov primat vjerojatno nikad neće biti ugrožen. No, nepobitno je da kompleksni uzorci zahtijevaju znatno kompleksnije pristupe uslijed čega će pojedine analize biti moguće isključivo primjenom višedimenzionalnih kromatografskih metoda. Stoga se mogu usuditi kazati kako će glavnina iskoraka u kromatografskoj budućnosti biti vezana upravo uz višedimenzionalnu kromatografiju.

6. LITERATURA

1. L.Mondello, A.C.Lewis, K.D.Bartle, Multidimensional chromatography, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.
2. H.J. de Geus, J. de Boer, U.A.Th.Brinkman: Multidimensionality in gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **15** (1996) 168–178
3. M.Herrero, E.Ibanez, A.Cifuentes, J.Bernal, Multidimensional chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A* **1216** (2009) 7110–7129
4. M. Tswett, Absorption analysis and Chromatographic Methods, Application to the Chemistry of the Chlorophylls, *J. Chem. Educ.* **44** (4) (1967) 238
5. Richard Laurence Millington Synge, The partition between of acetaamino-acid between immiscible solvent, *Biochem J.* **33** (12) (1939) 1913–1917
6. T.Bolanča, Š.Ukić: Ionska kromatografija: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.
7. M. Kaštelan-Macan: Kemijska analiza u sustavu okoliša, Školska knjiga, Zagreb 2003.
8. H.B.Lee, T.E.Peart, R.L.Hong-You, D.R.Gere, Supercritical carbon dioxide extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments, *Journal of Chromatography A*, Volume **653**, (1993), 83–91
9. Eli Grushka, Peak Capacity and the Factors Influencing It, *Anal. Chem.* **42** (11) (1970) 1142–1147
10. M. Kaštelan-Macan i M. Petrović: Analitika okoliša, Hinus & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
11. G.W.Kelly, K.D.Bartle, The use of combined LC-GC for the analysis of fuel products, *Journal of Separation Science* **17** (1994) 390–397
12. J.C.Giddings, Multidimensional gas chromatography, *Journal of Separation Science* **10** (1987) 319–323
13. Jacob de Boer, Capillary gas chromatography for the determination of halogenated micro-contaminants, *Journal of Chromatography A* **843** (1999) 179–198
14. J.C.Giddings, Concepts and comparisons in multidimensional separation, *Journal of Separation Science* **10** (1987) 319–323
15. J.N.Fairchild, K.Horváth, G.Guiochon, Approaches to comprehensive multidimensional liquid chromatography systems, *Journal of Chromatography A* **1216** (2009) 1363–1371

16. P.E.Flinn, Y.H.Juhl, T.P.Layloff, A simple, inexpensive thin-layer chromatography metoda for the analysis of theophylline, *Bull World Health Organ.* **67 (5)** (1989) 555–559.
17. I.Piljac: Elektroforeza, Media Print, Zagreb, 2006.
18. P.H.O'Farell, High-resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins, *J Biol Chem.* **250 (10)** (1975) 4007–4021
19. H.Blum, H.Beier, H.J.Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA u polyacrylamide gels, *J Biol Chem.* **8** (1987) 93–99
20. D.W.Cleveland, S.G.Fischer, M.W.Kirschner, U.K.Laemmli, Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis, *J Biol Chem.* **252 (3)** (1977) 1102–6
21. M.Chiera Pietrogrande, D.Bacco, N.Marchetti, M.Mercuriali, G.Zanghirati, 2D autocovariance function for comprehensive analysis of two-way GC–MS data matrix: Application to environmental samples, *Talanta* **83** (2011) 1225–1232
22. S.Naeher, S.K.Lengger, K.Grince, A new method for the rapid analysis of 1H-Pyrrole-2,5-diones (maleimides) in environmental samples by two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1435** (2016) 125–135
23. M.Kivilompolo, T.Hyötyläinen, Comparison of separation power of ultra performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the separation of phenolic compounds in beverages, *Journal of Separation Sciences* **31** (2008) 3466–3472, doi:10.1002/jssc.200800287.
24. F.Cacciola, P.Delmonte, K.Jaworska, P.Dugo, L.Mondello, J.I.Rader, Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of Stevia rebaudiana extracts, *Journal of Chromatography A* **1218** (2011) 2012–2018, doi:10.1016/j.chroma.2010.08.081.
25. A.Ginzburg, T.Macko, F.Malz, M.Schroers, I.Troetsch-Schaller, J.Strittmatter, R.Brülla, Characterization of functionalized polyolefins by high-temperature two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **1285** (2013) 40–47, doi:10.1016/j.chroma.2013.01.067.
26. A.A.S.Sampat, M.Lopatka, G.Vivó-Truyols, P.J.Schoenmakers, A.C. van Asten, Towards chemical profiling of ignitable liquids with comprehensive two-dimensional gas chromatography: Exploring forensic application to neat white spirits, *Forensic Science International* **267** (2016) 183–195

27. S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment, *Journal of Chromatography A* **1186** (2008) 161–182
28. C.Hao, X.Zhao, P.Yang, GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26** (2007) 569–580
29. M.Farre, L.Kantiani, M.Petrovic, S.Perez, D.Barcelo, Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques, *J Chromatogr A*. **1259** (2012) 86-99
30. W.Giger, C.Schaffner, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment by glass capillary gas chromatography, *Anal. Chem.* **50(2)** (1978) 243–249
31. C.J.Ventrakamani, J.B.Phillips, Comprehensive two-dimensional gas chromatography applied to the analysis of complex mixtures, *Journal of Microcolumn Separations*, **5** (1993) 511-516
32. P.R.Gardinali, T.L.Wade, L.Chambers, J.M.Brooks, A complete method for the quantitative analysis of planar, mono, and diortho PCB's, polychlorinated dibenzodioxins, and furans in environmental samples, *Chemosphere* **32** (1996) 1-11
33. P.J.Marriott, P.Haglund, R.C.Y.Ong, A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC, *Clinica Chimica Acta* **328** (2003) 1–19
34. J.C.Duinker, D.E.Schulz, G.Petrick, Multidimensional gas chromatography with electron capture detection for the determination of toxic congeners in polychlorinated biphenyl mixtures, *Anal. Chem.* **60** (5) (1988) 60 (5) 478–482
35. E.Sippola, K.Himberg, Determination of toxic PCB congeners in biological samples by multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (GC/GC/MS), *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **339** (1991) 510–512
36. B. Wong, M. Castellanos: Enantioselective measurement of the candida metabolite D-arabinitol in human serum using multidimensional gas chromatography and a new chiral phase, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **495** (1989) 21–30
37. M.Madera, Y.Mechref, I.Klouckova, M.V.Novotny, Semiautomated High-Sensitivity Profiling of Human Blood Serum Glycoproteins through Lectin Preconcentration and

- Multidimensional Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *J. Proteome Res.* **5** (9) (2006) 2348–2363
38. W.H.Jin, J.Dai, S.J.Li, Q.C. Xia, H.F.Zou, R.Zeng, Human Plasma Proteome Analysis by Multidimensional Chromatography Prefractionation and Linear Ion Trap Mass Spectrometry Identification, *J. Proteome Res.* **4** (2) (2005) 613–619
39. M.Wang, P.J.Marriott, W.H.Chan, A.W.M.Lee, C.W.Huie, Enantiomeric separation and quantification of ephedrine-type alkaloids in herbal materials by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A* **1112** (2006) 361–368
40. T.Ieda, Y.Horii, G.Petrick, N.Yamashita, N.Ochiai, K.Kannan, Analysis of Nonylphenol Isomers in a Technical Mixture and in Water by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* **39** (18) (2005) 7202–7207
41. E. A.Hogendoorn, U.A.Th.Brinkman, P. van Zoonen, Coupled-column reversed-phase liquid chromatography-UV analyser for the determination of polar pesticides in water, *J. Chromatogr.* **754** (1996) 77–84
42. R.B.Geerdink, W.M.A.Niessen, U.A.Th. Brinkman, Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography, *Journal of Chromatography A* **970** (2002) 65–93
43. U.A.Th.Brinkman, Multidimensional gas and liquid chromatographic approaches to trace-level environmental analysis, *Chromatographia* **45** (1997) 445–449
44. D.Helmig, Air analysis by gas chromatography, *Journal of Chromatography A* **843** (1999) 129–146
45. A.C.Lewis, S.A.Askey, R.E.Robinson, K.D.Bartle, M.J.Pilling, Identification of polycyclic aromatic compounds in urban air particulate extracts by on-line coupled LC-GC-ITD-MS, *Anal. Proc.* **32** (1995) 297–300
46. P.Q.Tranchida, P.Dugo, G.Dugo, L.Mondello, Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A* **1054**, 29 (2004) 3–16
47. M.Herrero, E.Ibanez, A.Cifuentes, J.Bernal, Multidimensional chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A* **1216** (2009) 7110–7129
48. A.M.Booth, P.A.Sutton, C.A.Lewis, A.Scarlett, W.Chau, J.Widdows, S.J.Rowland, Unresolved Complex Mixtures of Aromatic hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.* **41** (2) (2007) 457–464

49. H.Pasch, M.Adler, F.Rittig, S.Becker, New Developments in Multidimensional Chromatography of Complex Polymers, *Journal of Polymer Science Part A* **26** (2005) 438–444
50. A.Hagman, S.Jacobsson, Analysis of volatile organic compounds in polymers by dynamic headspace—multi-dimensional gas chromatography —mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **395** (1987) 271-279
51. C.H.Marvin, J.A.Lundrigan, B.E.McCarry, D.W.Bryant, Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal–tar contaminated sediment, *Environmental Toxicology and Chemistry* **14** (1995), 2059–2066
52. J.Loung, R.Gras, H.J.Cortes, R.E.Shellie, Multidimensional gas chromatography for the characterization of permanent gases and light hydrocarbons in catalytic cracking process, *Journal of Chromatography A* **1271** (2013) 185–191
53. H.J.Cortes, B.E.Richter, C.D.Pfeiffer, D.E.Jensen, Determination of trace chlorinated benzenes in fuel oil by on-line multidimensional chromatography using packed-capillary liquid chromatography and capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A* **349** December (1985) 55-61
54. G.Eyres, P.J.Mariott, J.P.Dufour, The combination of gas chromatography–olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils, *Journal of Chromatography A* **1150** (2007) 70–77
55. L.I.Andersson, Selective solid-phase extraction of bio- and environmental samples using molecularly imprinted polymers, *Bioseparation* **10** (2001) 353–364
56. D.Tsikis, S.Rothmann, J.Y.Schneider, M.T.Suchy, A.Trettin, D.Modun, N.Stuke, N.Maassen, J.C.Frölich, Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC–MS and GC–MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F_{2α} and nitric oxide (NO), *Journal of Chromatography B* **1019** (2016) 95–111
57. T.Kakisaka, T.Kondo, T.Okano, K.Fujii, K.Honda, M.Endo, A.Tsuchida, T.Aoki, T.Itoi, F.Moriyasu, T.Yamada, H.Kato, T.Nishimura, S.TODO, S.Hirohashi, Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer, *Journal of Chromatography B* **852** (2007) 257–267

58. A.Araki, Y.Sako, Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **422** (1987) 43-52
59. Q.B.Cass, A.L.G.Degani, N.M.Cassiano, J.Pedrazolli, Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* **766** (2002) 153–160
60. J.Adachi, C.Kumar, Y.Zhang, J.V.Olsen, M.Mann, The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins, *Genome Biol.* **7** (9) (2006) 80
61. C.Brasseur, J.Dekeirsschieter, E.M.J.Schotsmans, S.de Koning, A.S.Wilson, E.Haubruege, J.F.Focant, Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses, *Journal of Chromatography A* **1255** (2012) 163–170
62. S.Roche, L.Tiers, M.Provansal, M.Seveno, M.T.Piva, P.Jouin, S.Lechmann, Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: The more the better?, *Journal of Proteomics* **72** (2009) 945–951
63. S.C.Cunha, J.O.Fernandes, Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography–mass spectrometry (MD–GC/MS), *Talanta* **83** (2010) 117–125
64. G. Rene van der Hoff, R. A. Baumann, P. van Zoonen, U. A. Th. Brinkman: Determination of organochlorine compounds in fatty matrices: Application of normal-phase LC clean-up coupled on-line to GC/ECD, *Journal of Separation Science* **20** (1997) 222–226
65. M.N.R.Alves, G.Zanchetti, A.Piccinotti, S.Tameni, B.Spinosa de Martinis, A. Poletini, Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405** (2013) 6299–6306
66. F.Podebrad, M.Heil, S.Leib, B.Geier, T.Beck, A.Mosandl, A.C.Sewell and H.Böhles, ‘Analytical approach in diagnosis of inherited metabolic diseases: maple syrup urine disease (MSUD)–simultaneous analysis of metabolites in urine by enantioselective multidimensional capillary gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of High Resolution Chromatography* **20** (7) (1997) 355-362

7. ŽIVOTOPIS

Lana Barić rođena je 19.07.1993. u Zagrebu. Pohađala je Srednju školu Krapina, smjer jezična gimnazija, od 2008. do 2012. godine. Nakon završene srednje škole odlazi u Zagreb gdje upisuje Preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom studija odradila je praksu u tvornici stakla Vetropack Straža d.d. Hum na Sutli.