

Razvoj modula za prijenos analita u dvodimenzijskoj fluidnoj kromatografiji pri superkričnim uvjetima

Petković, Orjen

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:149:144922>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Orjen Petković

RAZVOJ MODULA ZA PRIJENOS ANALITA
U DVODIMENZIJSKOJ FLUIDNOJ
KROMATOGRAFIJI PRI SUPERKRITIČNIM
UVJETIMA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof.dr.sc. Dragana Mutavdžić Pavlović
prof.dr.sc. Čedomila Milin

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Orjen Petković

DEVELOPMENT OF ANALYTE TRANSFER
MODULE IN TWO DIMENSIONAL
SUPERCRITICAL FLUID
CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
prof.dr.sc. Dragana Mutavdžić Pavlović
prof.dr.sc. Čedomila Milin

Zagreb, 2018

UDK: **543.544.32(043.3)**

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Institucija: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

prof. dr. sc. Čedomila Milin, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Broj stranica: 95

Broj slika: 43

Broj tablica: 13

Broj literaturnih referenci: 100

Datum obrane: 12. listopada 2018.

Sastav povjerenstva za obranu: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić, Fakultet kemijskog i inženjerstva tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

prof. dr. sc. Bruno Zelić, Fakultet kemijskog i inženjerstva tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

doc. dr. sc. Dalibor Broznić, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Rad je pohranjen u knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilišnoj knjižnici Rijeka, Dolac 1; knjižnici Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5 i knjižnici Sveučilišta u Osijeku, Trg Svetog Trojstva 3.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 24. veljače 2014., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 24. travnja 2014.

Zahvale

Razmišljajući o svim osobama koje su mi pomogle da učinim sve potrebno za izradu ovog rada shvatio sam da mi nije lako niti nabrojati sve one koji su mi u pomogli pri radu ili pak u trenucima kada mi nije bilo jednostavno nastaviti. Stoga zahvaljujem svima koji su dio mog svakodnevnog života jer bez njih ovo ne bi bilo moguće... Mojoj obitelji prije svega.

Zahvaljujem mentoricama, prof. Mutavdžić Pavlović prije svega na strpljenju i izdržljivosti te na pomoći pri izradi rada, a prof. Milin jer mi je omogućila suradnju i uputila me na nekoliko pravih adresa. Nadam se da Vas nisam previše izmorio.

Zahvaljujem svim suradnicima i osoblju ESPCI - Paris, prije svega dr. Dideru Thiébaudu na svojoj pomoći tijekom tehničke izrade instrumentacije te analiza.

Zahvaljujem svim suradnicima sa Zavoda, čak i kada nije bilo jednostavno mogli smo komunicirati na ljudskom nivou, prof. Srećku Valiću na pomoći pri odlasku u Francusku.

Veliko hvala gđi. Elizabeti Šlezak bez čije bi se pomoći vjerojatno izgubio u meandrima hodograma i obrazaca.

Na kraju moram se zahvaliti ocu, koji je redovito podsjećao kako treba završiti započete procese. Hvala tata, evo gotovo je.

SAŽETAK

Kromatografija superkritičnim fluidom (SFC) doživljava novi uspon zbog potreba analize sve kompleksnijih uzoraka. SFC analitički sustavi dopuštaju korištenje širokog raspona nepokretnih faza i detektora. Kao pokretna faza najčešće je korišten CO₂. Upravo ta sloboda izbora detektora i nepokretnih faza čini SFC vrlo pogodnom tehnikom u razvoju višedimenzijskih kromatografskih sustava.

Dobro su poznati SFC × GC i SFC × HPLC dvodimenzijski sustavi, dok su SFC × SFC sustavi još u fazi razvoja. Jedna od osnovnih zapreka bržem razvoju dvodimenzijskih kromatografija upravo je međudimenzijski prijenos analita.

Kako bi se omogućilo dublje i kvalitetnije upoznavanje problematike međudimenzijskog prijenosa analita, razvijen je novi modul međudimenzijskog prijenosa analita. Glavna odrednica modula je mogućnost neovisnog upravljanja vrijednostima protoka i tlaka pokretne kromatografske faze. Modul je korišten za utvrđivanje utjecaja tih vrijednosti na kvalitetu dvodimenzijske fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima.

Hipoteza o potrebi neovisne kontrole stanja pokretne faze u tijeku prijenosa pokazala se točnom te su korištena nova saznanja u razvoju metode za analize stvarnih uzoraka.

Razvijena metoda koristi velik protok uz nizak tlak pokretne faze pri međudimenzijskom prijenosu analita, što dovodi do kompresije analita u drugoj dimenziji čime se povećava razlučivost u drugoj dimenziji pa tako i u cijelom analitičkom sustavu.

Razvijena metoda primijenjena je u analizi stvarnih uzoraka pri čemu su se potvrdila poboljšanja u kvaliteti analitičkog podatka te primjenjivost metode u analizi složenih uzorka.

Ključne riječi: instrumentacijski modul, kromatografija, superkritični fluid, CO₂, međudimenzijski prijenos analita

SUMMARY

The supercritical fluid chromatography (SFC) is experiencing a revival due to the need to analyze samples of growing complexity. Such analytical systems allow for the use of a wide range of stationary phases and detectors, while commonly used mobile phase is CO₂. The variety of choice of detectors and stationary phases makes SFC a good basis for the development of multi-dimensional chromatographic systems.

SFC × GC and SFC × HPLC two-dimensional systems are well known, while SFC × SFC systems are still under development. One of the main obstacles to the faster development of two-dimensional chromatography is the analyte transfer between dimensions.

A new module for the inter-dimensional transfer of the analyte was constructed, to allow a better insight to the problem of inter-dimensional transfer of the analyte. The principal characteristics of the module is the ability to control the flow values and the pressure values of the mobile chromatographic phase. The module was used to determine the influence of these values on the quality of two-dimensional fluid chromatography under supercritical conditions. The hypothesis of the need for independent control of the mobile phase during the transfer has proven correct and new approach, in developing the actual sample analysis method, has been tried.

The developed method uses a high flow rate with a low mobile phase pressure during interdimensional transfer of analyte leading to compression analites in the second dimension, thus increasing the resolution in the second dimension and in the entire analytical system.

The developed method was applied in the analysis of actual samples, confirming the improvements in the quality of the analytical data and the applicability of the method in the analysis of complex samples.

Keywords: instrumentation module, chromatography, supercritical fluid, CO₂, interdimensional analite transfer

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Značaj kromatografije u analitičkoj kemiji	3
2.2. Kromatografija fluidom u superkritičnim uvjetima	7
2.3. Ugljikov(IV) oksid pri superkritičnim uvjetima	9
2.3.1 Ugljikov(IV) oksid - pokretna kromatografska faza	15
2.4. Višedimenzijски kromatografski sustavi	24
2.4.1. Teorijska osnova višedimenzijске kromatografije	24
2.5. Pregled izabranih primjera primjene višedimenzijских kromatografskih sustava.....	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	39
3.1. Materijali	39
3.1.1. Kromatografski sustav.....	39
3.1.2. Uzorci	47
3.2. Metoda.....	48
3.2.1. Razvoj i provjera rada sustava.....	48
3.2.2. Kromatografske postavke.....	51
4. REZULTATI I RASPRAVA	54
4.1. Provjera rada kromatografskog sustava.	54
4.1.1. Prva dimenzija.....	54
4.1.2. Modul prijenosa analita.....	56
4.1.3. Druga dimenzija	59
4.2. Utjecaj tlaka i protoka u pojedinim dijelovima sustava na ponašanje analita.....	60
4.2.1. Analiza probne smjese lakohlapljivih ugljikovodika	60
4.2.2. Utjecaj parametara sustava na širinu kromatografske krivulje	65
4.2.3. Analiza nehlapljivih ugljikovodika	70
4.2.4. Parametri kromatografske metode.....	71
4.3. Analiza stvarnih uzorka.....	74
4.3.1. Vakumski destilat frakcija sirove nafte	75
4.3.2. Vakuumski destilat frakcija tekućeg ostatka parne destilacije ugljena	76
4.3.3. Analiza uzorka maslinovog ulja	79
5. ZAKLJUČAK	84
6. LITERATURA.....	86

1. UVOD

Metode korištene u kemijskim analizama su, u najboljem slučaju, selektivne, a rijetke su uistinu specifične. Posljedično, u primjeni analitičkih postupaka razdvajanje uzoraka iz potencijalno interferirajuće matice je vrlo često nužan pa i esencijalan korak. Bez sumnje, kromatografija je najzastupljeniji postupak kojim se ostvaruju razdvajanja u kemijskoj analizi. Metoda je to koja primjenu nalazi u svim granama znanosti.

Uporaba pokretnih faza u plinovitom i tekućem agregatnom stanju trenutno dominira u kromatografiji, no postoje naznake da bi tekućina u superkritičnom stanju ponovo mogla doći u središte zanimanja. Povijesni je razvoj kromatografije tekućinama u superkritičnom stanju bio pod snažnim utjecajem oprečnih, često sukobljenih, mišljenja vodećih znanstvenika u polju što je usporavalo razvoj tehnike.

Uz prevladavajuće oblike kromatografskih sustava u kojima se analiti razdvajaju jednodimenzijski, razvijaju se i sustavi koji koriste mogućnosti razdvajanja tvari koristeći nepokretne faze različitih svojstava – višedimenzijski sustavi. Ovi su sustavi izvedbeno zahtjevniji, kako sa stajališta dizajna tako i sa stajališta održavanja. Unatoč zahtjevnijem korištenju sustava, prednosti koje proizlaze iz kvalitetnijeg razdvajanja analita nisu zanemarive te se stoga razvijaju novi instrumenti koji omogućuju višedimenzijske analize.

Upravo je cilj ovog rada razviti način prijenosa analita između dviju dimenzija sustava koji kao pokretnu fazu koristi ugljikov(IV) oksid u superkritičnom stanju. Dosad razvijeni sustavi nemaju aktivnu kontrolu stanja pokretne faze tijekom međudimenzijskog prijenosa.

Prijenos analita između dviju dimenzija u 2D-kromatografiji od iznimne je važnosti. Izvedba sustava prijenosa analita i njihova primjena često čine razliku između uporabnog i manjkavog sustava analize. Postojeći analitički sustavi nemaju mogućnost neovisnog upravljanja sustavom prijenosa analita među dimenzijama. Ukoliko bi se takav prienos mogao ostvariti, to bi omogućilo poboljšanje kvalitete analize i proširenje iskoristivosti dvodimenzijskih superkritičnih kromatografskih sustava.

Osmišljavanje, izvedba i provjera funkcionalnosti sustava neovisnog međudimenzijskog prijenosa analita potencijalno može omogućiti razlučivanje utjecaja parametara stanja pokretne faze u sustavu prijenosa analita od utjecaja stanja pokretne faze u pojedinim dimenzijama na rezultat analize. Ukoliko se dokaže mogućnost uistinu neovisne kontrole međudimenzijskog prijenosa analita, razvoj novih metoda kromatografije fluidom u superkritičnom stanju bio bi uvelike pojednostavljen.

Brz i sveobuhvatan prijenos analita među dimenzijama trebao bi povećati kapacitet kromatografskog sustava, kao i moć razlučivanja.

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

1. Razviti modul za prijenos ispitivanih analita među dimenzijama.
2. Provjeriti funkcionalnost i primjenjivost razvijenog modula.
3. Utvrditi utjecaj tlaka i protoka pokretne faze na kvalitetu analitičkog rezultata u konstruiranom sustavu pomoću modelnih uzoraka.
4. Provesti dijelove procesa validacije kromatografske metode u cilju ispitivanja rada sustava.
5. Analizirati realni uzorak i usporediti dobivene rezultate s rezultatima analize pomoću postojećih 2D-GC- sustava te 2D-SFC- sustava.

2. OPĆI DIO

2.1. Značaj kromatografije u analitičkoj kemiji

Pojam kromatografije danas podrazumijeva skupinu analitičkih tehnika koje omogućuju razdjeljivanje sastojaka smjese između dviju faza od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna i giba se u određenom smjeru [1]. Dvije se faze nalaze u dinamičkoj ravnoteži s ispitivanom tvari koju kontinuirano narušava protok pokretne faze, a to omogućuje razdjeljivanje sastojaka temeljeno na različitom afinitetu prema nepokretnoj, odnosno pokretnoj fazi [2].

Dok je u začecima kromatografije nepokretna faza bila neka netopljiva tvar, a pokretna faza voda što je omogućavalo razdvajanje samo tvari topljivih u vodi, suvremena kromatografija oslanja se na pokretne faze svih fluidnih agregatnih stanja, od tekućeg (LC)¹ preko plinskog (GC)² do superkritičnog (SFC)³ koji je predstavljen kao pokretna faza 1962. godine [3]. Iako je LC-u prethodila uporabi plinske, GC prva uvodi instrumentalne sustave u kromatografsku analizu. Širenjem i razvojem plinske instrumentalne kromatografije, kromatografski sustavi poprimaju izgled i dijelove karakteristične za moderne analitičke sustave: dobavu pokretne faze, injektor, termostatirajuću komoru, nepokretnu fazu punjenu u metalne cilindre te neki oblik detekcije. Instrumentalni sustavi tekućinske kromatografije počeli su se razvijati tek sredinom šezdesetih godina 20. stoljeća [4] s ciljem analize uzoraka koji zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika nisu mogli biti razdvojeni plinskom kromatografijom te se za njih počinje rabiti naziv tekućinska kromatografija pod visokim tlakom (engl. *high pressure liquid chromatography*, HPLC), kasnije preimenovana u tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (također HPLC)⁴.

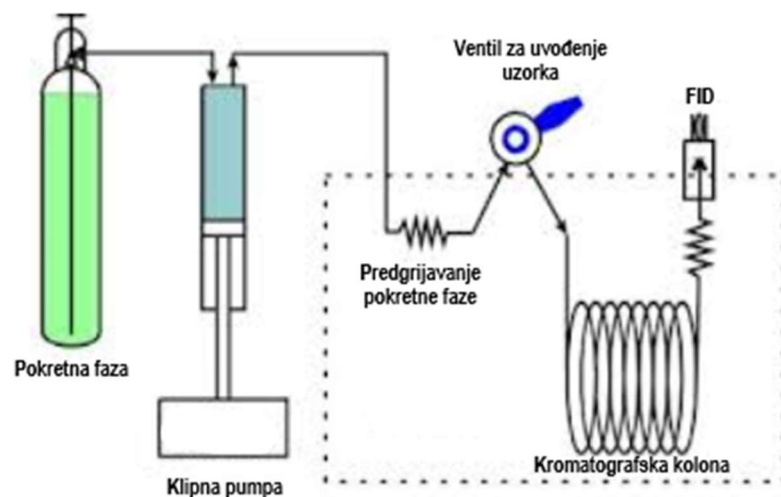
Kromatografska analiza može biti provedena na nepokretnoj fazi nanesej na podlogu ili punjenoj u dvostrano otvorene cilindre. U prvom slučaju govorimo o plošnoj kromatografiji pri kojoj svi analiti provode isto vrijeme u doticaju s pokretnom fazom, a prolaze različite puteve. Pri tome kvalitativni analitički podatak odgovara prijađenom putu svakog analita posebno. Ukoliko je pak pokretna faza punjena u cilindar, govorimo o kromatografiji na stupcu ili kolonskoj kromatografiji (lat. *columna* – stupac) pri čemu svi analiti moraju prijeći isti put, cijelu duljinu stupca/kolone, a vrijeme potrebno za prolaz specifično je za svaki od analita.

¹ engl. *Liquid Chromatography*

² engl. *Gas Chromatography*

³ engl. *Supercritical Fluid Chromatography*

⁴ engl. *High Performance Liquid Chromatography*



Slika 1. Shematski prikaz kromatografskog sustava superkritičnim CO₂

Kvantifikacija se kod plošne kromatografije provodi najčešće izravno vaganjem analizirane tvari uklonjene s nepokretne faze mehaničkim postupcima (izrezivanjem ili struganjem) i alternativno spektrofotometrijskim postupcima nakon desorpcije analita ili denzitometrijskim postupkom pri čemu je količina tvari proporcionalna apsorbiranom elektromagnetskom zračenju. Kod kolonske kromatografije kvantifikacija je gotovo isključivo neizravna, integracijskog tipa, pri čemu je kvantitativni podatak površina ispod pika kromatografske krivulje ili njegova visina. Slika 1. prikazuje elemente kolonskoga kromatografskog sustava.

Prema mehanizmu raspodjele između pokretne i nepokretne faze razlikuju se sljedeće kromatografske tehnike [5]:

1. razdjelna kromatografija: najčešći mehanizam kod tekućinske kromatografije, ravnoteža ovisi ponajprije o kemijskom afinitetu tvari prema pokretnoj, odnosno nepokretnoj fazi.
2. adsorpcijska kromatografija: ravnoteža se uspostavlja na površini nepokretne faze i vodi se mehanizmima adsorpcije uz izražena fizikalna međudjelovanja, primarno u plinskoj kromatografiji.
3. kromatografija isključenjem: nema uspostave ravnoteže u kemijskom smislu, već dolazi do «filtriranja» molekula kroz nepokretnu fazu koju čine molekularna sita te se odjeljivanje vrši zbog razlike u dimenzijama analita.
4. afinitetna kromatografija: mehanizam ravnoteže je vrlo specifičan i selektivan prema analitu, često temeljen na stereo- ili regio-selektivnosti.
5. ionsko-izmjenjivačka kromatografija: koristi mehanizme ionske izmjene na nepokretnoj fazi.

Cilj kromatografskog razdvajanja je dobiti što izoliraniji i intenzivniji odziv detektora na prisutnost analita. Razlučivost kromatografskog sustava povezuje se s visinom i brojem teorijskih odsječaka u zadanoj duljini kromatografske kolone. Što je broj teorijskih odsječaka veći, a njihov razmak (visina) manji, to je razdvajanje kvalitetnije. Van Deemterova jednadžba povezuje visinu teorijskog odsječka s parametrima koji mogu utjecati na kvalitetu razdvajanja:

$$H = A + B/v + (C_m + C_s)v \quad (1)$$

Pri tome je:

H – visina teorijskog odsječka

A – koeficijent korekcije neidealnih putanja pokretne faze

B – koeficijent longitudinalne difuzije čestica unutar sustava

C_m – koeficijent otpora masenom prijenosu analita prema pokretnoj fazi

C_s – koeficijent otpora masenom prijenosu analita prema nepokretnoj fazi

v – brzina gibanja analita uzduž analitičkog sustava.

Odabirom nepokretne i pokretne faze pokušavamo iz jednadžbe ukloniti vrijednost A koja je posljedica nesavršenosti u izvedbi nepokretne faze. Ove nesavršenosti omogućile su različite putanje pokretne faze kroz nepokretnu te time i različita vremena zadržavanja analita u sustavu – posljedica je širenje kromatografskih pikova. Koeficijent B je neovisan o vanjskim utjecajima i posljedica je prirode pokretne faze. Poprima manje vrijednosti za tekućine, a veće za plinove. Koeficijenti C_m i C_s ovise o međudjelovanju analita s pokretnom i nepokretnom fazom. Odabirom faza izravno utječemo na njihovu vrijednost.

Kvalitativni podatak određen je vremenom zadržavanja, a možemo ga prikazati i retencijskim faktorom – Rf . Vrijednost ovog faktora omjer je vremena prolaza analita kroz kolonu i vremena prolaza čiste pokretne faze.

Izbor tehnike i metode kromatografske analize ovisi, u prvom redu, o analitu i uzorku u kojem se analit nalazi. Plinska kromatografija pogodna je za plinovite uzorke, primjerice smjese kratkolančanih ugljikovodika ili monomera u polimernoj industriji, kao i za uzorke koji se lako mogu prevesti u plinovito stanje, primjerice pesticida u praćenju zagađenja okoliša [6-8] ili za uzorke koji se mogu lako i kvantitativno derivatizirati u takve spojeve poput lipida [9]. Uzorci također moraju biti termički stabilni jer, ukoliko nisu, dolazi do razgradnje uzoraka te posljedično gubitka dijela ili cijelog analita uz moguća neželjena međudjelovanja s nastalim

razgradnim produktima [10]. Plin kao pokretna faza pokazuje nizak nivo kompetitivnih puteva te je stoga koeficijent A nizak.

Tekućinska kromatografija koristi se kod analiza uzoraka koji nisu lako hlapljivi ili su pak termolabilni na temperaturama pri kojima se odvijaju GC-analize [5]. Nedostaci tekućinske kromatografije proizlaze iz fizikalne prirode kondenzirane pokretne faze. Otpor koje čestice nepokretne faze pružaju toku tekućine te njihovo nesavršeno punjenje stvaraju više mogućih puteva prolaza pokretne faze čime se koeficijent A povećava. Utjecaj vrijednosti koeficijenta B je razmjerno manji u odnosu na GC-analizu što proizlazi iz prirode kondenzirane faze.

Sustavi tekućinske kromatografije koriste pumpe, filtre, mješalice, stabilizatore faza, prigušnice i razne manje zastupljene elemente. Uz potencijalne mehaničke probleme, koji proizlaze iz složenijeg sustava, javlja se i problem obrade i uklanjanja kondenzirane pokretne faze onečišćene analitom, kao i cijene i dostupnost same pokretne faze [11]. Iskorištena pokretna faza može se reciklirati, no postupak je skup i zahtjevan, dok je cijena utrošene pokretne faze za isto vrijeme korištenja analitičkog sustava 2 do 3 reda veličine veća kod HPLC-a no kod GC-a [12]. HPLC- i/ili GC-sustavi koriste se u procesnoj industriji za kontinuirano praćenje procesnih parametara u potpuno automatiziranim sustavima spregnutim s upravljačkim elementima, poput automatskih ventila, plamenika ili hladionika, pri čemu je rezultat kromatografske, najčešće semikvantitativne, analize uputni signal za odradu nekog od nabrojanih elemenata [13]. U analitičkim se pak laboratorijima češće koriste samostojeći sustavi. Podaci dobiveni laboratorijskim analizama obrađuju se te se, nakon potvrde analitičara, mogu smatrati rezultatom kemijske analize.

Razvijene su i mnoge standardizirane metode kromatografskih analiza, što za primjenu u laboratorijskoj praksi, što za neprekidnu industrijsku primjenu te nadzorne analize širokog spektra matica uzoraka od prehrambenih artikala, okolišnih uzoraka preko farmaceutskih pripravaka do medicinsko-biokemijskih uzorka, a primjenu nalaze i u forenzici [14-16].

Tvari koje se najčešće koriste kao pokretna faza u tekućinskoj kromatografiji su voda, kratkolančani alkoholi, acetonitril, uz dodatak modifikatora polarnosti u vidu slabih kiselina ili *in-situ* pufera mravlje, octene ili fosfatne kiseline [17, 18], dok se kod plinske kromatografije najčešće koriste plinovi helij, argon, dušik te vodik [5].

Nepokretne faze razvijane su od jednostavnih soli preko složenih silikata do organski modificiranih silikata, stakala, tankih slojeva, kiralnih sustava [19] i na kraju monolitnih sustava integriranih u minijaturizirane analitičke uređaje [20]. Cilj razvoja i tehničke dorade uvijek je isti: kvalitetnije i potpunije razdvajanje smjesa u analitičkom postupku.

2.2. Kromatografija fluidom u superkritičnim uvjetima

Još od 19. stoljeća poznata su svojstva, kao i visoka topljivost, nehlapljivih organskih spojeva u nepolarnim fluidima. Od sredine 20. stoljeća isto vrijedi i za fluide u superkritičnom stanju. Primjeri tih tekućina su: CO₂, SO₂, H₂O, NH₃. Prof. Jim Lovelock 1957. godine predlaže korištenje upravo tih tvari kao pokretne faze u kromatografiji, a s ciljem razdvajanja puno polarnijih i težih spojeva no što je to bilo moguće u GC-u. U stlačivom superkritičnom stanju pokretna se faza ponaša kao otapalo te ulazi u međudjelovanje pomoću razdjelnih mehanizama, za razliku od plinovitog stanja u kojem se pokretna faza ponaša kao inertan nositelj te prevladava adsorpcijska ravnoteža. Na osnovu toga prof. Lovelock predlaže naziv *kromatografija u kritičnim uvjetima*⁵. Ernst Klesper bio je prvi koji je uspio iskoristiti tekućine u superkritičnom stanju prilikom razdvajanja termolabilnih metalo-porfirina [21]. Koristio je smjesu CCl₂F₂ i CHClF₂ zagrijanu na 115 °C pri tlaku od 55 - 160 bara na punjenoj koloni duljine 75 cm, veličine punjenja od 175 do 250 μm, prilagođenoj za plinsku kromatografiju. Ustanovljena je proporcionalna povezanost elucijske moći i tlaka superkritične pokretne faze. Već u ovom početnom stadiju razvoja došlo je do razmimoilaženja u imenovanju tehnike pa Giddings koristi više imena: kromatografija turbulentnog toka [22], ultra visokotlačna plinska kromatografija [23] kao i kromatografija gustim plinom [24], no ovi prijedlozi nisu dovoljno isticali solvativirajuću prirodu pokretne faze. Sie i Rijnders [25] prvi koriste naziv kromatografija fluidom pri superkritičnim uvjetima, no taj naziv (kojim se i danas najčešće opisuje ovaj tip kromatografija) podrazumijeva korištenje samo i isključivo fluida u superkritičnom stanju, što nije potpuno točno. Mourier [26] opisuje pokretne faze CO₂ modificirane malim količinama polarnog modifikatora u subkritičnim uvjetima. Takve faze pokazuju visoku gustoću, izrazitu podložnost kompresiji te zadržavanje razdjelnog mehanizma razdvajanja, iako su u subkritičnim uvjetima.

Giddings i suradnici [23] procjenjuju Hildebrandove parametre topljivosti iz kojih se može zaključiti da je polarnost gustog, superkritičnog CO₂ usporediva s polarnosti izopropilnog alkohola. Smatralo se da bi promjenama tlaka, odnosno posljedičnim promjenama gustoće pokretne faze, mogli mijenjati elucijsku moć CO₂ u rasponu od vrijednosti karakterističnih za ugljikovodike (dakle normalnofazna otapala) do vrijednosti karakterističnih za alkohole (otapala obrnute faze). Da su se ove pretpostavke pokazale točnim, SFC bi vjerojatno zauzimao puno istaknutije mjesto u kromatografiji, no, razvojem HPLC-a i posljedičnim proširenjem

⁵ engl. *Critical State Chromatography*

shvaćanja teorijskih postavki instrumentalnih analitičkih tehnika, ove su se ideje pokazale pogrešnima. Uz to, više grupa znanstvenika istovremeno nailazi na probleme s gubitkom razlučivosti i efikasnosti kolona s punjenjem velikim zrnima (do 120 μm) kod većih tlakova pokretne faze [25, 27, 28]. Jedno od tada prihvaćenih objašnjenja uspoređuje učinak smanjenja gustoće superkritične pokretne faze u SFC-u s gradijentnim padom temperature kod GC-a pri čemu dolazi do pada efikasnosti kolone. Predstavljeno je nekoliko hipoteza koje su pokušale objasniti ovu pojavu [26, 29]. Bitan čimbenik su tadašnja ograničenja u tehničkoj izvedbi sustava poput najveće moguće veličine čestice nepokretne faze (5 μm) ili gornje granice ostvarivog broja teorijskih odsječaka od približno 20000. Daljnim razvojem tehnike u ranim devedesetim godinama 20. stoljeća uvidjela su se tehnička ograničenja ranih SFC-sustava. Problem loše razlučivosti povezivan s gustoćom ili tlakom pokretne faze konačno se povezao s parametrima stanja u sustava. Analize su se često provodile u rubnim uvjetima superkritičnosti. Zbog nesavršenosti u sustavima, protok i gustoća pokretne faze u raznim dijelovima kolone nisu bili konstantni [30]. Uzrok leži u načinu vođenja i održavanja tlaka pokretne faze. Nepromijenjive redukcije toka korištene su kako bi se smanjio protok, a tlak se pratio samo na ulazu kolone. Upravljanje sustavom putem povratne sprege između tlaka pokretne faze na izlazu kolone i sustava dobave nije bilo moguće pa korisnik nije mogao znati u kakvom je stanju pokretna faza.

Dodatna prepreka široj uporabi SFC-a bila je i nereverzno međudjelovanje polarnih analita i nepokretne faze. Kromatogrami dobiveni analizama uzoraka s visokim udjelom polarnih tvari bili su neprihvatljivi, vrlo niskog omjera visine i širine kromatografskog pika. Problem se ponavljao i pri višim koncentracijama dodanih modifikatora. Uzrokom su smatrane otvorene, aktivne skupine na silikatnoj nepokretnoj fazi, što se pokušalo riješiti korištenjem nepolarnih modifikatora nepokretne faze te dodatkom zatvarajućih tvari u sastav nepokretne faze. Unatoč tim izmjenama, vrijeme zadržavanja analita bilo je vrlo kratko, a izgled kromatografske krivulje nedovoljno dobar. Problem je riješen dodatkom vrlo malih količina izrazito polarnih tvari (jakih kiselina ili baza) u tok pokretne faze. Analitički rezultati dobiveni korištenjem ovako modificiranih pokretnih faza puno su kvalitetetniji i potpuniji [31, 32]. Danas su upravo polarni i organski modifikatori dodatak koji omogućuje primjenu SFC-a u područjima analize, od obrnutofaznog i normalnofaznog HPLC-a preko nekih primjena u ionskoj kromatografiji pa sve do HILIC⁶-a [33].

⁶ engl. *Hydrophilic interaction chromatography*

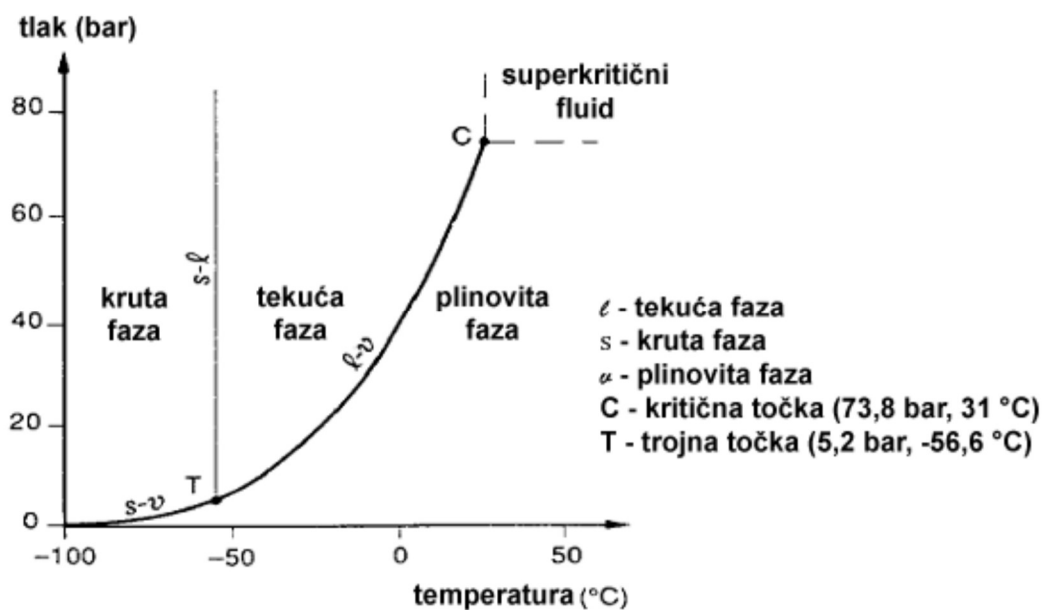
Velika prednost SFC-sustava je funkcionalnost u kombinaciji s vrlo širokim rasponom detektora, od plameno-ionizacijskog, detektora zahvata elektrona preko UV/VIS-spektrofotometara i serijskih refraktometara do spektrometara masa pa i pokušaja povezivanja sa sustavima nuklearne magnetne rezonancije [34].

SFC je, unatoč problemima u razvoju i nemogućnosti korištenja kapilarnih kolona, pronašao svoje mjesto u kemijskom procesima tijekom devedesetih godina 20. stoljeća kada su razvijene metode analitičkog i preparativnog korištenja SFC-sustava tijekom razdvajanja kiralnih analita u raznim uzorcima, primarno uzorcima farmaceutskih pripravaka. Rezultati tih analiza bili su mnogo bolji no oni dobiveni korištenjem HPLC-sustava, pretpostavlja se zbog manjeg utjecaja međudjelovanja pokretna faza-analit [35]. Tvar najčešće korištena kao pokretna faza u SFC-u je ugljikov(IV) oksid [36].

2.3. Ugljikov(IV) oksid pri superkričnim uvjetima

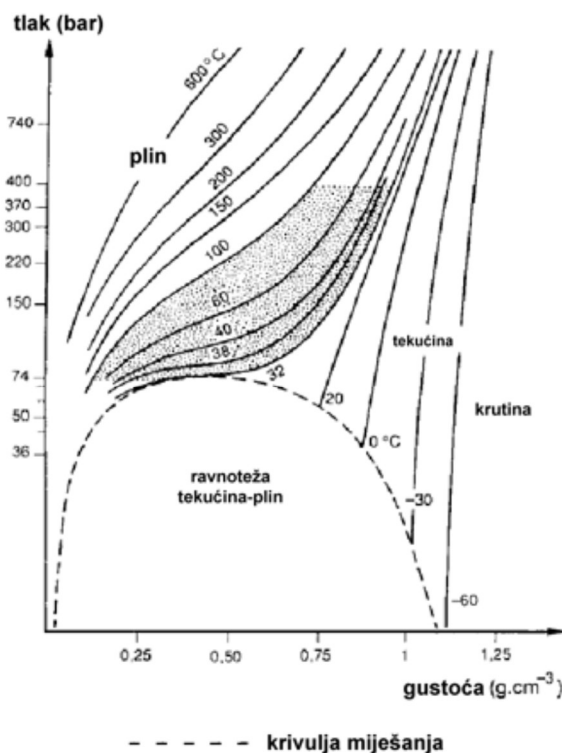
2.3.1. Fizikalno-kemijske karakteristike CO₂ u superkričnim uvjetima

Termodinamičko stanje tvari definira se vrijednostima volumena, temperature i tlaka. Dijagram prikazan na Slici 2. je dvodimenzijski prikaz p, V, T dijagrama ugljikova(IV) oksida – fazni dijagram, krivulje definiraju fazne prijelaze. Točka C na krivulji isparavanja naziva se kritična točka i pridružene su joj vrijednosti kritične temperature (T_c), tlaka (p_c) i gustoće (ρ_c). Ukoliko vrijednosti temperature i tlaka u sustavu prijeđu kritične vrijednosti, ulazimo u fazni prostor koji je svojim značajkama između plinovitog i tekućeg – superkrično stanje.



Slika 2. Fazni dijagram (p/T) za CO_2

Kromatografske analize superkritičnim fluidom najčešće se provode izobarno i izotermno. Slika 2. prikazuje fazni dijagram p/ρ CO_2 . Vrijednosti temperature i tlaka, najzastupljenije pri SFC- ekstrakcijama i kromatografijama, osjenčane su sivom. U tom rasponu vidljiva je gotovo linearna ovisnost gustoće i tlaka pri izotermnim uvjetima na čemu se temelji kontrola elucijske moći fluida promjenom tlaka.



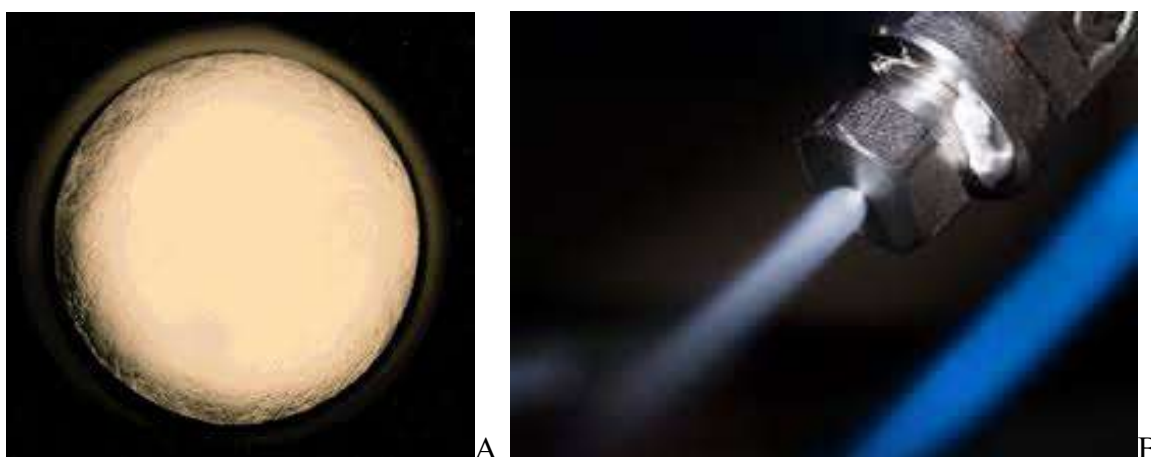
Slika 3. Fazni dijagram (p/ρ) za CO_2

U Tablici 1. navedeni su rasponi vrijednosti gustoće, viskoznosti i koeficijenta difuzije za plin, tekućinu i superkritični fluid (SF). Vrijednosti gustoće superkritičnog fluida usporedive su s gustoćom tekućina, dok je viskoznost usporediva s plinovima.

Tablica 1. Vrijednosti gustoće, viskoznosti i koeficijenta difuzije plina, tekućine i superkritičnog fluida

Faza	Gustoća, g cm^{-3}	Viskoznost, Pa s	D (koeficijent autodifuzije), m^2s^{-1}
Plinovita	$(0,6 - 2) \cdot 10^{-3}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-5}$	$(1 - 4) \cdot 10^{-5}$
Superkritična	0,2 – 0,9	$(1 - 9) \cdot 10^{-5}$	$(1 - 5) \cdot 10^{-8}$
Tekuća	0,6 – 1,6	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-3}$	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-9}$

Makroskopski superkritični CO_2 je mliječno bijela tvar koja zauzima čitav slobodan prostor na raspolaganju, što je prikazano na Slici 4A. Proces dekompresije izrazito je endoterman uz gubitak superkritičnosti, vidljivo na Slici 4B.



Slika 4. Superkritični CO_2 u pred ekstrakcijskoj komori - A, pri dekompresiji - B

2.3.1.1. Gustoća i stlačivost SF-a CO_2

Pri vrijednostima tlaka i temperature bliskim kritičnim vrijednostima, superkritični fluidi postaju izrazito stlačivi. Mala povećanja tlaka dovode do velikih povećanja gustoće.

Stlačivost je približno 500 puta veća u usporedbi s tekućinama. Kako gustoća pokretne faze izravno utječe na elucijsku moć, promjenom se izravno utječe na vrijeme zadržavanja analita u kromatografskom sustavu.

Giddings i sur. [23] stavljaju u odnos promjenu polarnosti superkritičnog CO₂ s gustoćom:

$$\delta = 1,25\sqrt{p_c} \frac{\rho}{\rho_1}, \quad (2)$$

gdje je p_c vrijednost kritičnog tlaka izražena u atm, a ρ i ρ_1 su vrijednosti gustoće SF-a i tekućine. Kada gustoća SF-a raste, koeficijent difuzije D_m se smanjuje. Razmatranjem kinetičke komponente razdjeljenja smanjenjem difuzije pokretne faze smanjuje se efikasnost kolone te je poželjno ograničiti gustoću CO₂ koliko je to moguće.

2.3.1.2. Viskoznost SF-a CO₂

Gradijent pada tlaka u kromatografskoj koloni izravno je proporcionalan viskoznosti, odnosno koeficijentu difuzije fluida. Manja viskoznost superkritičnih fluida omogućuje korištenje duljih kromatografskih kolona u odnosu na HPLC. Viskoznost raste porastom tlaka, no porast je manje izražen u usporedbi s porastom gustoće.

2.3.1.3. Utjecaj temperature na SF CO₂

Pri konstantnoj gustoći pokretne faze vrijeme zadržavanja analita u koloni smanjuje se povećanjem temperature. Smanjenje ovisi o hlapljivosti samog analita otopljenog u pokretnoj fazi. Pri stalnom tlaku utjecaj temperature ovisi o dva međusobno neovisna čimbenika, tj. dva međudjelovanja koja su specifična za svaku pojedinu analizu. Prvi je gustoća pokretne faze koja porastom temperature pada pa time pada i topljivost analita. Drugi čimbenik je hlapljivost analita koji nužno raste porastom temperature što uzrokuje rast afiniteta analita prema pokretnoj fazi. Posljedica ovih međudjelovanja je nemogućnost teorijskog određenja optimalnih uvjeta analize.

2.3.1.4. Koeficijent difuzije SF-a CO₂ i razdjeljenja analita

Koeficijent difuzije opisuje difuzijsko kretanje molekula fluida unutar samog fluida. Za CO₂ vrijednosti su između vrijednosti karakterističnih za plin i tekućinu i smanjuju se s porastom tlaka.

Koeficijent difuzije definira procese prijenosa analita između nepokretne i pokretne faze.

$$C_M = \frac{f(d_p^2, d_c^2, u)}{D_M} u \quad (3)$$

C_M – prijenos mase unutar pokretne faze

u – protok pokretne faze

d_p – promjer čestica nepokretne faze

d_c – promjer kolone

D_M – koeficijent difuzije unutar pokretne faze

Kod superkritičnog fluida vrijednost D_M veća je nego kod tekućina. Vrijednost D_M obrnuto je proporcionalna gustoći pokretne faze što objašnjava veće vrijednosti optimalnog protoka pokretne faze kod SFC-a te manji porast visine teorijskog odsječka kod povećanih vrijednosti u . Porast visine odsječka povezan je sa smanjenjem ukupne vrijednosti koeficijenta C_M i C_s u Van Deemterovoj jednadžbi.

2.3.1.5. Uporaba SF-a CO₂

Ugljikov(IV) oksid jednostavno je dobavljen plin, u čistoći od 99,999%, [37] te se u analitičkoj kemiji, ali i u industrijskim primjenama, vrlo uspješno koristi kao ekstrakcijsko sredstvo kada se nalazi iznad kritične točke. Iako i ostali superkritični fluidi pokazuju svojstva dobrih otapala, CO₂ je posebice zanimljiv jer pokazuje zelena svojstva: nije zapaljiv, ograničene je reaktivnosti, relativno je netoksičan, a vrijednost maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) u iznosu od 5000 mg/L za osmosatnu izloženost čine ga daleko boljim u usporedbi s acetonom (750 mg/L), pentanom i hlapljivim lakim alkanima (600 mg/L) te kloriranim ugljikovodicima (0,5 do 10 mg/L) [38].

Vrijednosti temperature i tlaka kritične točke CO₂ niske su te se relativno lako mogu ostvariti uvodeći CO₂ u dostupnu aparaturu. CO₂ se u superkritičnom stanju dobro miješa s raznim organskim modifikatorima, prije svega alkoholima, što poboljšava ekstrakcijsku i elucijsku moć prema raznim analitima i time postaje dodatno zanimljiv kao ekstrakcijsko sredstvo.

U drugoj polovici 20. stoljeća CO₂ u superkritičnim uvjetima istisnuo je iz uporabe klasična organska otapala poput ugljikovodika i njihovih halogeniranih derivata gdje god je to moguće. Neka od područja primjene su:

- ekstrakcija kofeina iz čaja i kave [38]
- ekstrakcija eteričnih ulja [39]
- ekstrakcija aroma iz prirodnih izvora [40]
- ekstrakcija masti iz prehrambenih proizvoda [41]
- održavanje elektroničkih komponenti ekstrakcijom lubrifikanata [42].

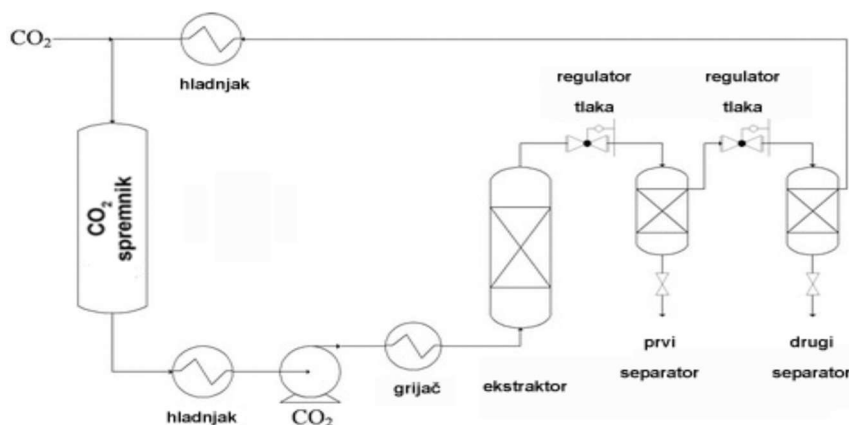
Ekstrakcija kofeina jedna je od prvih uporaba CO₂ u superkritičnim uvjetima. Primjer takvog uređaja prikazan je na Slici 5. Zelena zrna kave izlože se toku superkritičnog CO₂ koji zbog visoke penetrabilnosti molekula u superkritičnom stanju (ponašanje slično plinu) prolazi kroz strukturu zrna kave. Kako je ponašanje superkritičnog CO₂ kao razdjelno-ekstrakcijskog sredstva slično tekućinama, dolazi do izdvajanja kofeina uz iskoristivost procesa od 97% do 99% ovisno o vrsti kave i stupnju zrelosti samog ploda. Ovako izdvojen kofein, u drugom koraku tehnološkog procesa pri kojem se ekstrakt ispiru vodom, prelazi iz superkritične faze u tekuću te se može iskoristi u druge svrhe. Uz kofein, iz biljnih matica uzoraka ovim se putem izdvajaju i ostale aromatske tvari [42] pa tako Chen i sur. navode razlike u sastavu melanoidina u zrnima kave obrađenim prženjem ili ekstrakcijama vodom i superkritičnim CO₂, uz osvrt na kvalitativne i kvantitativne promjene u sastavu bioaktivnih tvari.

Područje usmjerene ekstrakcije eteričnih ulja iz raznih biljnih matica te karakterizacija sastava ekstrakta drugo je veliko područje primjene CO₂ u superkritičnom stanju. Fornari i sur. [43] prikazuju rezultate obimnog istraživanja uspoređujući količinu i sastav ekstrakata više od 25 biljnih vrsta s postojećim literaturnim izvorima. Male izmjene vrijednosti tlaka i temperature u području neposredno iznad kritične točke imaju velik utjecaj na kvalitativni sastav ekstrakta i na kvantitativnu zastupljenost pojedinih komponenti.

Kako se CO₂ u superkritičnim uvjetima pokazao kao dobro ekstrakcijsko sredstvo za kofein i arome, Imanishi i sur. [44] određuju topljivost sastojaka ribljeg ulja u CO₂ pri temperaturama od 313 K do 353 K, u rasponu tlakova od 20 do 35 MPa. Utvrđena je proporcionalnost topljivosti sastojaka ribljeg ulja i porasta tlaka CO₂, dok je pri stalnom tlaku porast temperature u nižem temperaturnom rasponu dovodio do smanjenja topljivosti, a nastavak porasta temperature do povećanja vrijednosti njihove topljivosti. Također, Catchpole i sur. [45] dokazuju pozitivan učinak polarnih modifikatora (etanola u ovom slučaju) na ekstrakcijsku moć CO₂ i u ovim maticama. Esequiel i sur. [46] iznose zaključke koji otvaraju mogućnost primjene superkritičnog CO₂ u ekstrakciji višestruko nezasićenih omega-3 masnih kiselina, onih slobodnih i u sastavu triglicerida, iz ribljeg ulja uz iskorištenje od 95%. U ribljem ulju, kao i u ostalim maticama čiju osnovu čine esteri masnih kiselina, promjenama vrijednosti

tlaka i temperature superkritičnog ekstrakcijskog sredstva mijenja se sastav ekstrakta. Izrađene su zbirke fizikalnih vrijednosti CO₂ u superkritičnim uvjetima pri kojima je ekstrakcijsko iskorištenje najveće [47] [48, 49] i za većinski zastupljene sastojke ulja, i za mikronutrijente (α -tokoferol, β -karoten, stigmasterol, skvalen).

Uz poznate prednosti superkritičnog CO₂, jednostavnost izdvajanja ekstrahiranih tvari iz otapala nakon ekstrakcije dodatno izdvaja ovu tehniku prilikom usporedbi s klasičnim načinima ekstrakcije. Izlaskom iz područja superkritičnih vrijednosti tlaka za CO₂ i prelaskom u područje plinovite faze, dolazi do naglog pada topljivosti ekstrahiranih tvari te izlučivanja iz toka ekstrakcijskog sredstva – shematski prikazan na Slici 5. Ukoliko je potrebno ovaj se učinak može pojačati sniženjem temperature.



Slika 5. Shematski prikaz sustava za ekstrakciju superkritičnim CO₂

Fizikalno-kemijska svojstva superkritičnog CO₂ koriste se u pripremi i obradi površina, posebice u preciznoj mehanici, optici i elektronici. Uspješno se primjenjuje pri uklanjanju hidrotransmisijskih tekućina, silikonskih ulja, mineralnih lubrikanata i bioloških masnoća ispod granice prihvatljive u preciznoj obradi (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Prednosti superkritičnog CO₂, u usporedbi s klasičnim organskim otapalima, pokazuju se i u ovoj primjeni: nema potrebe za skladištenjem opasnih tvari, a recikliranje iskorištenog otapala je relativno lako smanjenjem tlaka uz prolaz kroz celulozne ili silikatne filtre. Jednom pročišćen CO₂ jednostavno se ponovo koristi.

2.3.1 Ugljikov(IV) oksid - pokretna kromatografska faza

Svojstva CO₂ u superkritičnom stanju, predstavljena u postupcima ekstrakcije, čine tu tvar potencijalno moćnom pokretnom fazom u sustavima kromatografske analize. Spomenuta

istraživanja Lovelocka i sur.[3, 21], Klespera i sur., Caudea i sur [26, 30]. otvorila su put široj primjeni SFC kromatografije.

Razvoj kromatografskih sustava ove vrste započeo je u šezdesetim godinama 20. stoljeća primjenom nemodificiranog toka CO₂ kao pokretne faze, dok su nepokretnu fazu činile punjene kolone. Punjenje je bilo polarno, najčešće silikatno. Kvaliteta analitičkog rezultata bila je usporediva s tadašnjom tekućinskom kromatografijom [27]. No, unatoč prednostima korištenja CO₂ u superkričnom stanju kao pokretne faze, put razvoja nije bio lak ni brz. Uz primjenu novih nepokretnih faza, ponajprije organski modificiranih silikata koji su i danas najrašireniji u primjeni prilikom analize u obrnutoj fazi, 1981. godine prvi puta je u SFC-u opisana uporaba kapilarnih kolona od taljene silike [50]. One koriste jednostavan sustav dobave pokretne faze pomoću stapne pumpe koja im omogućava jednostavnu i brzu promjenu tlaka superkričnog CO₂ te topljivost analita u pokretnoj fazi. Kromatografske metode počele su se oslanjati na promjenu tlaka pri regulaciji elucijske moći te na mogućnost korištenja univerzalnog i jeftinog plameno-ionizacijskog detektora u analizi raznih uzorka. Naizgled se činilo da su problemi korištenja SFC-a i punjenih kolona riješeni na ovaj način. Jednostavnost ove tehnike bila je toliko privlačna da su tijekom osamdesetih godina punjene kolone gotovo potpuno istisnute iz uporabe. Manja količina pokretne faze i samog uzorka, i lakša mogućnost kontrole tlaka u kapilarnoj koloni u odnosu na punjenu kolonu doveli su do zagušenja tržišta SFC-materijala kapilarnim kolonama i sustavima za njihovo korištenje. Šest od sedam tvrtki koje su proizvodile SFC-sustave okrenule su se isključivo kapilarnim kolonama. No, kada su 1990. godine [31, 51] napokon prikazani rezultati detaljnih mjerenja gustoće smjese metanol/CO₂, dokazali su kako pri konstantnoj gustoći modifikatori znatno utječu na elucijsku moć pokretne faze. Nakon toga slijede rezultati istraživanja [52] koji ruše do tada prihvaćena Giddingsova stajališta o polarnosti superkričnog CO₂. Polarnost superkričnog CO₂ usporediva je s polarnošću heksana, a nikako polarnih pokretnih faza. Ova otkrića snažno utječu na razvoj i primjenu superkričnog CO₂ u analizi malih polarnih molekula gdje se modifikatore prihvaća i široko rabi kao osnovni čimbenik u prilagodbi elucijske moći. Giddinsova stajališta nisu u potpunosti odbačena te se koriste i danas pri procjenama stanja pokretne faze kod analize nepolarnih spojeva.

Hipoteza o gubitku efikasnosti nepokretne faze i ograničenoj ukupnoj efikasnosti sustava zbog velikog pada tlaka duž kromatografske kolone također je opovrgnuta ranih devedesetih godina 20. stoljeća [53] kada je prikazan uspješan serijski spoj kolona s 220 tisuća teorijskih odsječaka pri tlaku od 300 bara.

Shvaćanje je uloge modifikatora u eluiranju polarnih molekula raslo pa su uspješno analizirane matice polarnih spojeva poput primarnih amina [60,62]. Upravljanje tlakom postaje mehanizam upravljanja drugog reda, a primjena kapilarnih kolona u SFC-u se gotovo potpuno gasi. Iz današnje perspektive, povezanost instrumentalnog sustava i njegova pouzdanost usko se povezuje s SFC-analizama. Razvoj, međutim, ni ovdje nije tekao glatko. Do ranih osamdesetih godina 20. stoljeća sva dostupna instrumentacija bila je izrađena u laboratorijima, koristeći dijelove sustava drugih tehnika. Prvi komercijalno dostupan sustav, koji je omogućavao ponovljive analize SFC-om, bio je nadograđeni HP Model 1084 HPLC-sustava proizvođača Helvett-Packard. Najznačajnija preinaka bilo je uvođenje mehaničkog regulatora tlaka te mogućnost praćenja pada tlaka kroz kolonu i neautomatizirane kontrole toka. Vrijeme zadržavanja i modificiranje kemijskih parametara ovisilo je isključivo o sastavu pokretne faze. Proizvođač JASCO 1985. godine predstavlja objedinjeni sustav ekstrakcije i kromatografije u superkritičnoj fazi. U ovom sustavu prvi puta je uvedena elektronička kontrola tlaka fluida na izlazu kolone, no još uvijek nema govora o automatiziranoj povratnoj sprezi kontrole tlaka – pumpi. Helwett Pacard 1992. godine predstavlja model kromatografskog sustava s povratnom kontrolom pada tlaka i kompenzacijom stlačivosti pokretne faze. Takav sustav omogućavao je puno točnije i ponavljajuće postavke protoka i sastava pokretne faze. U istom vremenu pojavljuju se prvi sustavi s Peltierovim hlađenjem glava pumpi. Elektronska regulacija pada tlaka i hlađenje glava pumpi danas su standard u SFC-kromatografskim sustavima. Tehnički usavršeniji i usklađeniji SFC-sustavi olakšali su razvoj robusnijih metoda analize s više mogućnosti podešavanja stanja pokretne faze. Komercijalni sustavi opremaju se nizom detektora, od univerzalnog plameno-ionizacijskog detektora (FID)⁷, UV/VIS-a i detektora s nizom dioda (DAD)⁸ preko detektora zahvata elektrona (ECD)⁹ i dušik-fosfor termoionskog detektora (NPD)¹⁰ pa sve do detekcije spektrometrima masa (MS) [54]. CO₂ u superkritičnoj fazi pokazao se kao vrlo pogodna pokretna faza pri detekciji MS-sustavima. Ostvareni su uspješni vezani sustavi uz uporabu kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI)¹¹ ili ionizacije elektroraspršenjem (ESI)¹² uz kvadripolni analizator s vremenom preleta (QTOF)¹³ [55]. Spojne linije kromatograf – MS razvijale su se i pojednostavljivale pa postoje inačice s odgovarajućom visokolegiranom čeličnom cijevi.

⁷ engl. *Flame Ionisation Detector*

⁸ engl. *Diode Array Detector*

⁹ engl. *Electron Capture Detector*

¹⁰ engl. *Nitrogen-Phosphorus Detector*

¹¹ engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

¹² engl. *Electrospray Ionization*

¹³ engl. *Quadrupole Time of Flight*

Posljednji veliki iskorak u razvoju kromatografije superkritičnim CO₂ započeo je 2009. godine predstavljanjem Aurora SFC-sustava za pretvorbu. Ovaj sustav pretvara Agilent HPLC-model 1200 ili model 1100 u SFC u moćno oruđe uskladivo s HPLC- i SFC-analitičkim sustavima. SFC-modul je ovim rješenjem uveden u klasični HPLC-sustav [56]. Rad modula na usisnoj strani HPLC-pumpe dovodi do pred-stlačivanja pokretne faze do vrijednosti usporedivih s vrijednostima tlaka na ulazu u kromatografsku kolonu. Kako je tlak pokretne faze već na ulaznoj strani dobavne pumpe sumjerljiv tlaku na tlačnoj strani dobavne pumpe, jedina zadaća dobavne pumpe je održavanje i kontrola protoka već stlačene pokretne faze. Uklanjanjem istomjesnog stlačivanja i održavanja protoka pokretne faze, uklonio se uzrok šuma bazne linije prisutan kod spektrofotometrijskih detektora. Spajanjem aktivnog uklanjanja uzroka šuma s osjetljivim regulatorima izlaznog tlaka pokretne faze, omogućilo se iznimno sniženje praga osjetljivosti detektora do čak 50 puta u odnosu na prethodne generacije SFC-uređaja. Sustav predstavljen od strane proizvođača Waters Inc. sličan učinak kompenzacije šuma te stabilizacije stanja pokretne faze postiže na nešto drugačiji način. Koristi se dvocilindrična pumpa s nezavisno pogonjenim klipovima. Dva klipa pune zajednički, izolirani prostor u glavi dobavne pumpe. Dok jedan klip vrši kompresiju u svom cilindarskom prostoru, drugi obavlja dobavu stlačenog CO₂ u kromatografski sustav te se taktovi dvaju cilindara izmjenjuju. Kako su takt stlačivanja i dobave i u ovom slučaju međusobno razdvojeni, uklonjen je izvor šuma uzrokovan pripravom superkritičnog CO₂ u istom taktu s njenom dobavom.

Razvoj novih sustava SFC-analize pomoću CO₂ od strane renomiranih proizvođača još je jedan u nizu pokazatelja uzlaznog trenda primjene ove analitičke tehnike. Izrazito smanjenje šuma te stabilizacija toka superkritičnog CO₂ po prvi puta otvara SFC-metodama područje kvantifikacije analita u tragovima. Već su predstavljene metode [57] koje omogućuju razmjernu kvantifikaciju analita čija je vrijednost površine kromatografskog pika 0,1% površine najzastupljenije tvari uz omjer signal/šum veći od 10.

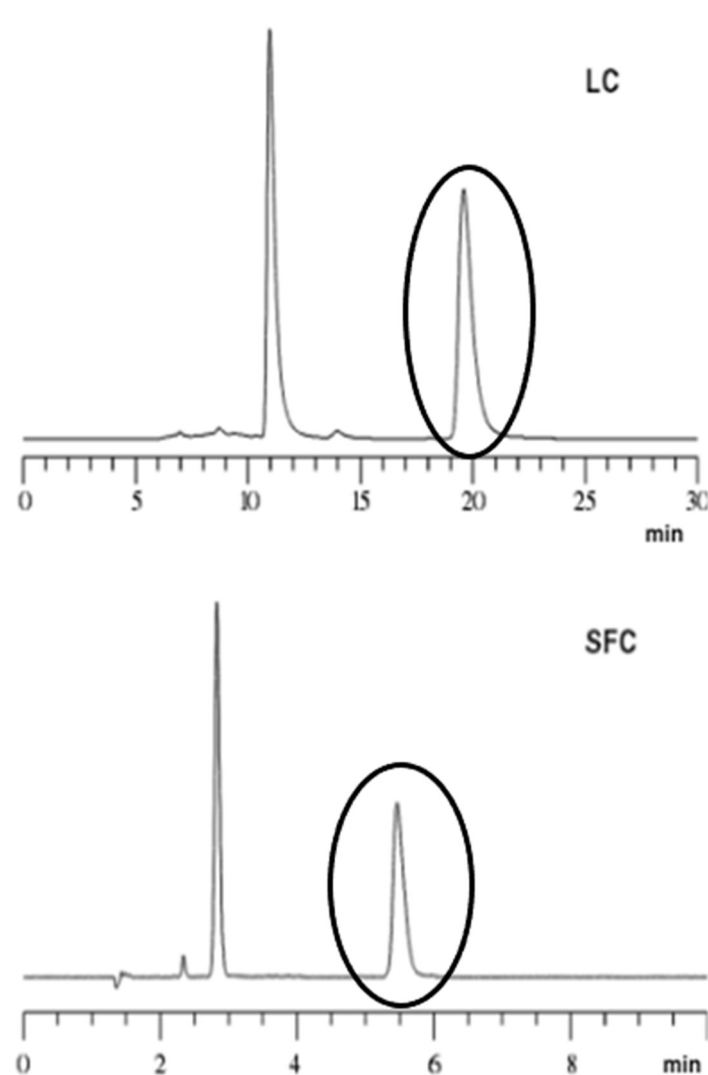
Od najranijih se početaka SFC-analiza, uz CO₂, primjenjuje na velik broj različitih matica poput:

- farmaceutskih pripravaka
- uzoraka iz okoliša: bioloških i nebioloških
- prehrambenih proizvoda
- površinski aktivnih tvari (surfaktanti)
- pesticida i herbicida
- polimera i aditiva u polimernim maticama
- fosilnih goriva

- eksploziva i potisnih sredstava

U razdoblju usporenog razvoja tehnike usko područje SFC-a modificiranim superkritičnim CO₂ bila je enantiomerna kromatografija lakih farmaceutika. Prvi puta kiralnu nepokretnu fazu koriste Mourier i sur. [26] 1985. godine pri razdvajanju supstituiranih fosfina što potiče interes za stereo selektivnu kromatografiju fluidom u superkritičnoj fazi. Prvi puta kiralni modifikatori dodani su u pokretnu fazu 1988. godine [58]. Pri razvoju metoda koriste se kiralne nepokretne faze s nemodificiranim CO₂, kiralni dodatci s akiralnim nepokretnim fazama kao i sustavi u kojima su obje faze kiralne.

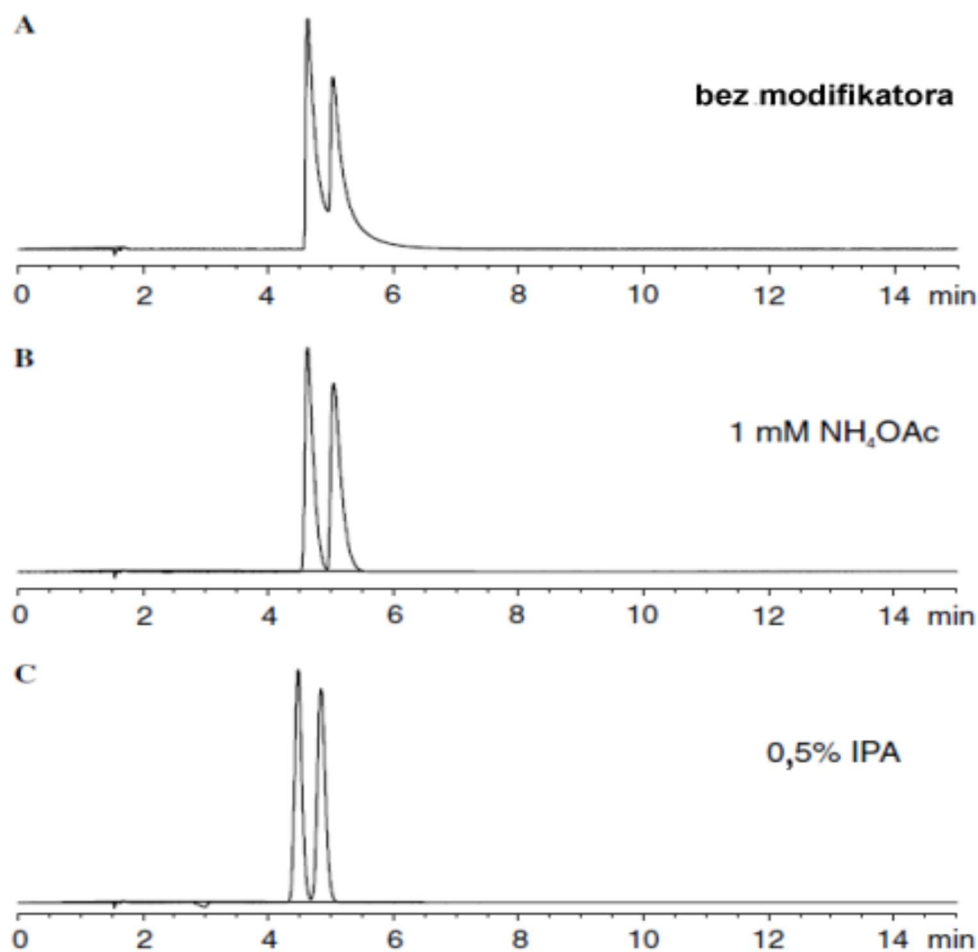
Izrazita selektivnost i kraće vrijeme analize ostvareno ovim pristupom koristi se u farmaceutskoj industriji, ali i u drugim područjima ukoliko je potrebna visoka protočnost metode.



Slika 6. Analiza enantiomera metoprolola pomoću LC-a i SFC-a na kiralnoj nepokretnoj fazi [58]

Usporedni prikaz dvaju kromatograma analize metoprolola, prikazan na Slici 6., primjer je prednosti korištenja superkritične pokretne faze. Vrijeme analize skraćeno je na trećinu u usporedbi s HPLC-analizom uz četiri puta veći protok pokretne faze, a pik metoprolola je unutar elipse.

Dodatak polarnog organskog modifikatora već u malim količinama znatno poboljšava kvalitetu kromatografske analize (Slika 7.).



Slika 7. Analiza enantiomera orfenadrinatm na kiralnoj nepokretnoj fazi bez modifikatora (A), uz dodatak amonijeva acetata koncentracije 1mmol/L (B) i 0,5% izopropilamina (C). Uočava se izrazito poboljšanje efikasnosti razdvajanja kao i simetričnosti kromatografskog pika [59]

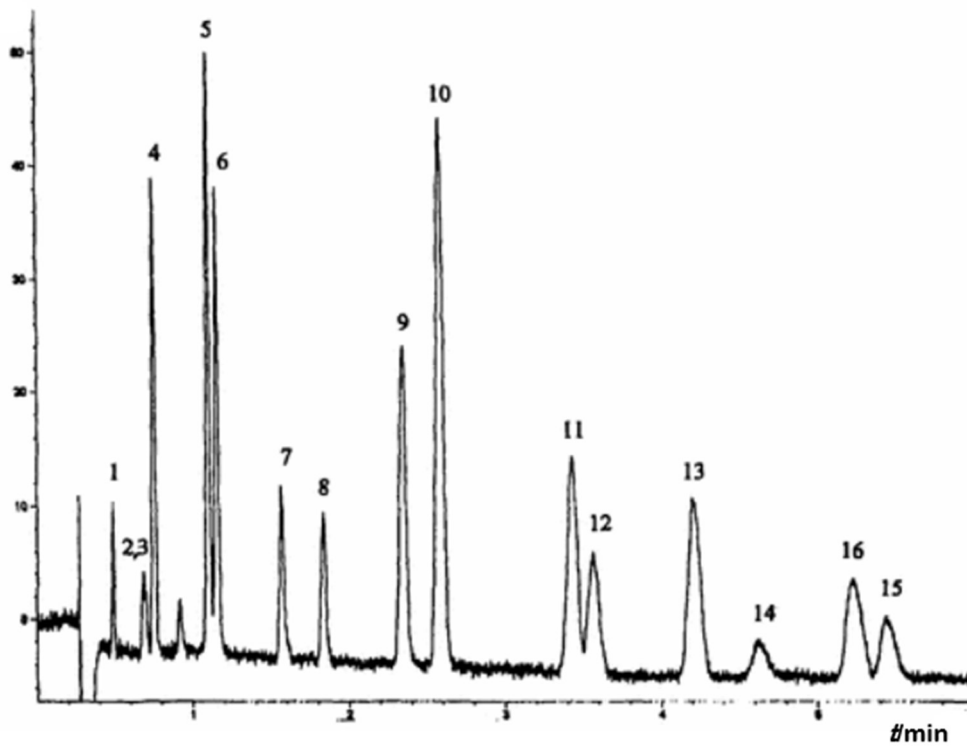
Mehanizmi koji bi objasnili ovakvu razliku među tehnikama nisu jednoznačno objašnjeni. Predložene hipoteze podrazumijevaju stvaranje kompleksa između amina i CO₂ u superkritičnom stanju [60]. Stvaranje nestabilnih kompleksa moglo bi objasniti razlike u smanjenom afinitetu kiralnih nepokretnih faza prema analitima kod SFC-a, za što postoje i dokazi dobiveni spektroskopskim metodama [61]. Fischer i sur. [62] pokušali su nizom reakcija amino supstituiranih organskih spojeva s CO₂ pri superkritičnim uvjetima sintetizirati

prijelazne kompleksne spojeve s ciljem pojašnjenja stanja koja vladaju u kromatografskom sustavu. Dokazano je stvaranje karbaminskih kiselina u reakcijama CO₂ sa sekundarnim aminima ukoliko supstituenti na amino skupini nisu sterički zaklanjajući. Vidno smanjenje afiniteta prema ovoj reakciji prisutno je već ukoliko je supstituent 2-propil skupina. Ovi su podaci u skladu s predviđanjima o izraženoj prostornoj osjetljivosti pri reakcijama koju pokazuje CO₂ u superkričnom stanju.

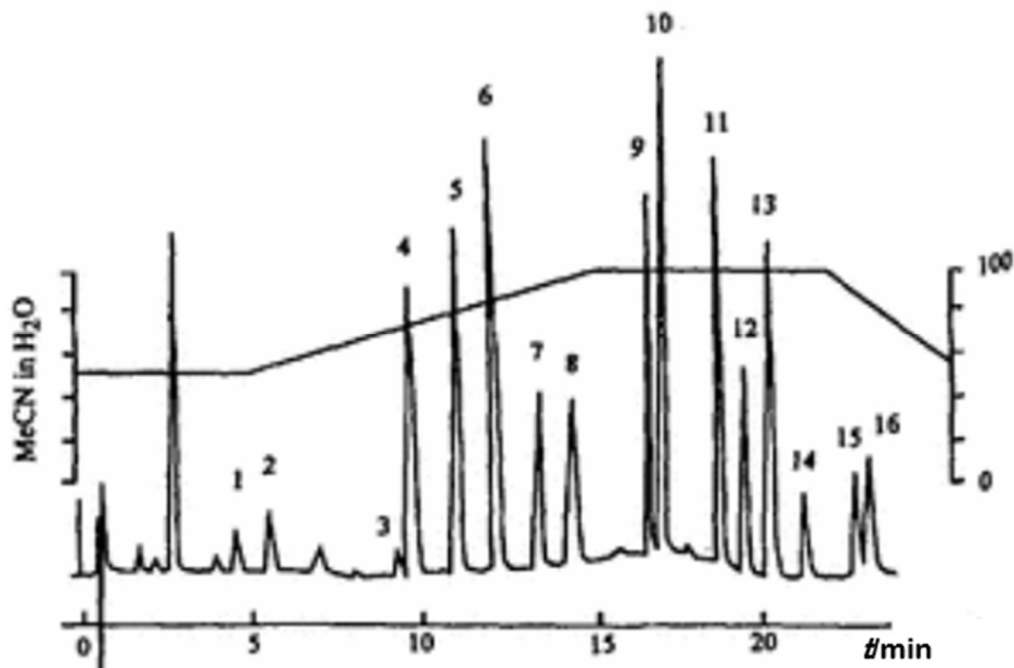
Desmet i suradnici [63] opisuju enantioselektivna razdvajanja termolabilnih spojeva nastalih ozračivanjem UV-zrakama 4-fenoksibut-1-ena. Nažalost, pokušana GC-analiza produkata nije dala rezultata zbog termičkog raspada nastalih produkata. Oswald i sur. [64] koriste CO₂ SFC pri određivanju odnosa enantiomera nekolicine farmaceutika iz porodice 3-hidroksi-1,4-benzodiazepina uključujući temazepamtm, oxazepamtm i lorazepamtm. Gyllenhaal [65] je razvio metodu razdvajanja uporabom vezanih kolona kako bi utvrdio sastav enantiomera u formulaciji lijeka. Usavršavanjem tehnike razvijen je cijeli niz enantioselektivnih analiza farmaceutika.

Nozal i sur. [66] koriste CO₂ s programom modifikacije pri razdvajanju stereoizomera pesticida triadimefonatm i triadimenolatm. Voorhees i sur. [67] predstavljaju objedinjeni serijski sustav ekstrakcija – kromatografsku analizu – MS-detekcija termolabilnih pesticida grupe karbamata iz uzoraka mesa govedine i piletine. Razina detekcije ovog sustava pri odnosu signal:šum 2:1 bila je 200 µg/L za Bendiocarbtm te 175 µg/L za Carbaryltm.

Analize uzoraka fosilnih goriva pomoću CO₂ SFC predstavlja drugo značajno interesno područje. U periodu od sredine osamdesetih godina 20. stoljeća pa do danas razvijene su metode ekstrakcije te analize srednje i dugolančanih ugljikovodika iz raznih matica uzoraka. Heaton i sur. [68] opisuju analizu 16 policikličkih aromatskih ugljikovodika na punjenoj koloni te uspoređuju HPLC- i SFC-analize uz istu nepokretnu fazu. Analizirajući spojeve u raznim maticama tla, vode, proizvoda petrokemijske industrije te ugljena oni pokazuju efikasnost SFC-tehnike. Slike 8A i 8B prikazuju kromatograme istog uzorka analiziranog pomoću SFC- i HPLC-tehnike.



A



B

Slika 8. Analiza 16 PAH-ova standardna EPA- smjesa pomoću SFC CO₂, uz polarni modifikator pokretne faze metanol [57] - A.

Analiza 16 PAH-ova standardna EPA-smjesa, HPLC- tehnikom, pokretna faza acetonitril/voda gradijentna analiza [68] - B

Iz spomenutih slika vidljivo je značajno skraćanje vremena potrebnog za analizu uz prihvatljiv gubitak efikasnosti kolone te zadržanu mogućnost kvantifikacije sastojaka uzorka.

M'Hamdi i sur. [33] u nizu članaka pokazuju plan i razvoj metode analize srednjetemperaturnih destilata sirove nafte uz dodatak sumporovog(VI) fluorida. Optimizacijom parametara analize dobivena je metoda usporedive analitičke moći s postojećim HPLC-metodama analize mono-, di- i poliaromatskih spojeva u spomenutoj matici. Chen i sur. [69] prikazuju SFC-metodu razvijenu s ciljem analize rasapa aromatskih ugljikovodika u rafinerijskim tokovima, posebice destilatima dizelskog goriva. Analitički rezultati dobiveni predloženom metodom pokazali su vrlo dobru korelaciju s verificiranom i uobičajenom HPLC-MS-analizom u rasponu od 6% do 40% masenog udjela aromatskih ugljikovodika u destilatu.

Venter i sur. [70] prikazuju sustavnu razradu SFC-metode analize alkana, alkena i oksospojeva u sastavu destilata nafte. Analiza alifatskih ugljikovodika pred autore postavlja probleme u tehničkoj izvedbi instrumentacije, prije svega u linijama prijenosa nepokretna faza-analizator. Uvode cijevna suženja i graničnike protoka značajno povećavajući složenost sustava. Unatoč preprekama, uspješno povezuju SFC-i preparativni dio sa GC- i GC-MS-sustavima te dokazuju povezanost selektivnosti sustava u odnosu na alkane i alkene s tlakom pokretne faze.

Kromatografija pomoću CO₂ pri superkritičnim uvjetima omogućuje brže i instrumentacijski manje zahtjevne analize opisanih skupina analita, no kod složenih matica s više grupa analita problem razdvajanja se ponovo vraća s pokretne na nepokretnu fazu. Mehanizmi međudjelovanja pokretna faza – analit – nepokretna faza često ne omogućuju dovoljnu selektivnost u stvarnim uvjetima ukoliko koristimo samo jednu vrstu nepokretne faze. Moguće rješenje je sve češća primjena višedimenzijske kromatografije, uz korištenje raznih pokretnih faza kako po kemijskom sastavu tako i po agregatnom stanju [70].

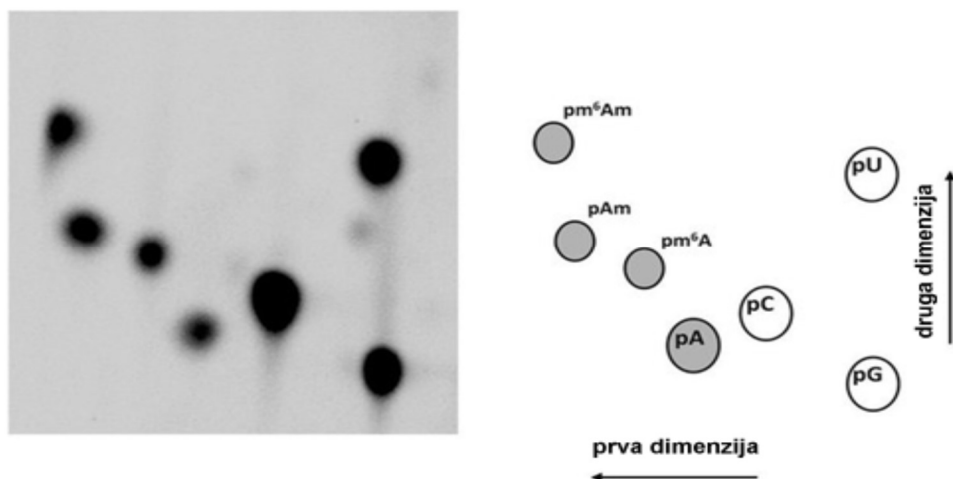
2.4. Višedimenzijski kromatografski sustavi

2.4.1. Teorijska osnova višedimenzijske kromatografije

Jednodimenzijski kromatografski sustavi određeni su međudjelovanjem pokretne faze stalnog ili promjenjivog sastava s analitom te s jednom nepokretnom fazom uz definiran i nepromjenjiv smjer toka pokretne faze. Kromatografski kapacitet punjenih HPLC kolona, a i kapilarnih kolona u GC-u, razvojem materijala, od kojih su izrađene nepokretne faze, postao je vrlo visok. Priroda kromatografske tehnike, temeljena na afinitetu analita prema fazama, onemogućuje postizanje razdjeljenja kod sličnih spojeva [71]. Prolaskom analita kroz kromatografsku kolonu neminovno dolazi do širenja kromatografskih zona te je stoga i broj potpuno razdvojenih sastojaka na izlazu kromatografske kolone također ograničen. Ovo ograničenje je neizbježno čak i uz pretpostavku infinitezimalno uske injekcijske fronte. Ovo suštinsko ograničenje nije moguće prevladati jednostavnim promjenama parametara kromatografskog sustava poput temperature, protoka pokretne faze ili sastava. No, ukoliko analitički sustav predviđa i/ili omogućuje promjenu smjera toka pokretne faze ili pak uzastopno razdjeljivanje analita iz uzorka pomoću više fizikalno-kemijski različitih nepokretnih faza govorimo o višedimenzijskoj kromatografiji [72]. Tijekom višedimenzijskih kromatografskih analiza uspostavlja se više od jednog sustava pseudo-ravnoteže razdjeljenja analita među fazama. Svaki od sustava doprinosi povećanju kromatografskog kapaciteta te posredno povećanju analitičke moći sustava.

Analize tankoslojnom kromatografijom (TLC) ¹⁴ od svojih početaka koriste dvodimenzionalno razdvajanje analita ponajprije zbog relativne jednostavnosti takve analize. Dovoljno je kromatografsku ploču ili nepokretnu fazu s nanesenim uzorcima izložiti jednoj pokretnoj fazi te nakon razvijanja kromatograma istu nepokretnu fazu zakrenutu za 90° izložiti drugoj pokretnoj fazi različite elucijske moći ili polariteta. Zbog različitih konstanti razdjeljenja u dvama sustavima, otvara se dodatna dimenzija kromatografskog razdvajanja. Svako od tvari detektiranih na takvom kromatogramu pridružene su dvije R_f vrijednosti čime je ona kvalitetnije i jednoznačnije određena. Ova se metoda primjenjuje u analizama širokog spektra matica uzoraka pogodnih za tankoslojnu kromatografiju i/ili gel elektroforezu [73-76].

¹⁴ engl. *Thin Layer Chromatography*



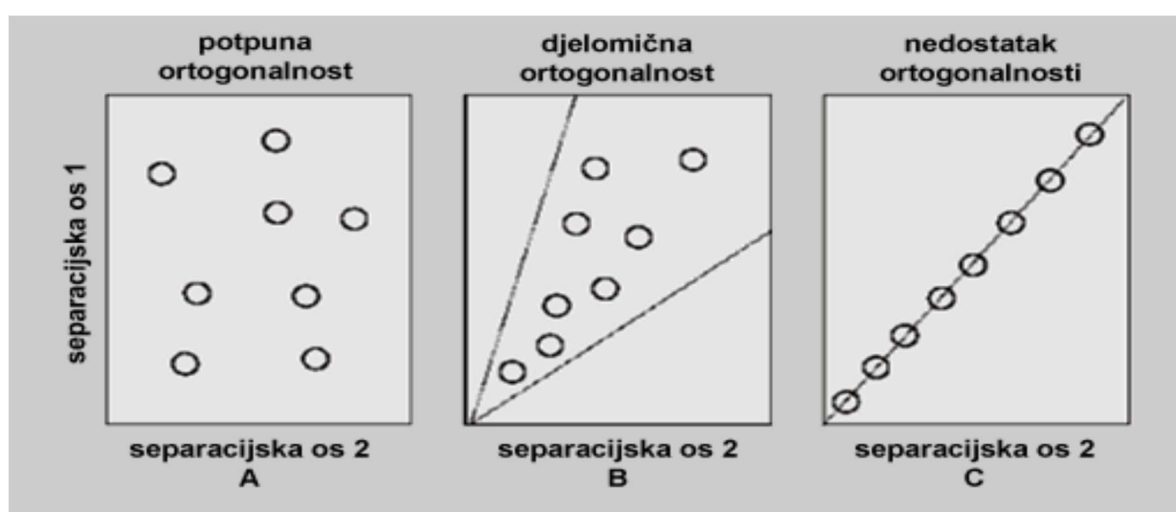
Slika 9. 2D-TLC-analiza adenozijskih modifikacija mRNA u miša [75]

Giddings [77] prvi teorijski razrađuje i definira pojam višedimenzijskih sustava. Prema njemu ti sustavi moraju zadovoljavati dodatan uvjet u odnosu na prethodne: procesi međufaznog razdvajanja u svakoj od dimenzija moraju se temeljiti na međusobno različitim mehanizmima, što stvara ortogonalnost dimenzija. Potpuno iskorištenje mogućnosti višedimenzijskih sustava leži upravo u ispunjenju ovog uvjeta. Analitička moć sustava izravno ovisi o stupnju korelacije između dimenzija. Slika 10. prikazuje tri teorijske mogućnosti:

A – potpunu ortogonalnost – mehanizmi razdvajanja u prvoj i drugoj dimenziji su potpuno različiti

B – djelomičnu ortogonalnost – mehanizmi razdvajanja dijelom se preklapaju

C – nedostatak ortogonalnosti – mehanizmi razdvajanja su identični



Slika 10. Ilustracija različitih stupnjeva ortogonalnosti

Odabir kromatografskog postupka u različitim dimenzijama, prije svega odabir nepokretnih faza i vrste kolona, odlučujući su faktor pri povećanju raspodjele kromatografskog signala na cijelom prostoru kromatograma [78]. Kod većine 2D-sustava, uz različite parametre stanja pokretne faze, odabiru se kolone različite polarnosti. Prva dimenzija pokazuje veći afinitet za nepokretnu fazu u odnosu na drugu dimenziju te stoga i određuje trajanje analize.

Za razliku od tankoslojne kromatografije kao plošne kromatografije, mogućnost razvoja višedimenzijskih sustava podrazumijeva obvezno korištenje najmanje dviju kolona s nepokretnom fazom. Postupak dvodimenzijskog kromatografskog razdjeljivanja može se prikazati kroz tri dijela:

1. analiza u prvoj dimenziji
2. međudimenzijski prijenos analita
3. analiza u drugoj dimenziji praćena detekcijom.

2.4.1.1. Značajke razdvajanja u prvoj dimenziji

Analiza u prvoj dimenziji korak je koji određuje ukupno trajanje cijelog analitičkog postupka. Uvijek višestruko vremenski zahtjevnija, izvodi se poput klasične jednodimenzijske kolonske kromatografije s ciljem grupiranja skupina analita u uzorku. Za razliku do jednodimenzijskih sustava, kod kojih je izlaz kolone povezan s detektorom, kod dvodimenzijskih sustava tok pokretne faze iz kromatografske kolone prve dimenzije odvodi se u neki od sustava međudimenzijskog prijenosa analita. Detektor može biti dio sustava prve dimenzije, no ukoliko i jest prisutan, postavlja se u paralelni, najčešće otpadni tok pokretne faze s ciljem orijentacijske analize.

2.4.1.2. Značajke sustava prijenosa analita

Sustavi međudimenzijskog prijenosa analita najrazličitijih su tehničkih izvedbi i mogu se podijeliti u dvije kategorije prema mehanizmu prijenosa:

1. konvencionalni međudimenzijski prijenos¹⁵
2. sveobuhvatni međudimenzijski prijenos¹⁶

U prvoj se varijanti samo dijelovi toka pokretne faze s analitima iz uzorka prenose između dimenzija, dok se veći dio eluata prve dimenzije odvodi u otpadni tok. Eluat može biti

¹⁵ engl. *heart cutting*

¹⁶ engl. *total transfer*

pohranjen u pokretnoj fazi ili pak sorbiran na nekoj prijelaznoj nepokretnoj fazi [76]. Prednost ove metode prijenosa je jednostavnost izvedbe i veća međudimenzijska izoliranost, a mana, kao i kod svih isprekidanih oblika razdvajanja, mogućnost gubitka analita.

Sveobuhvatni međudimenzijski prijenos podrazumijeva potpuni prijenos cjelokupnog toka ili reprezentativnog dijela¹⁷ eluenta iz prve u drugu dimenziju. Izvedbe ovih modulatora razrađene su i zahtjevnije za korištenje, no znatno umanjuju mogućnost gubitka analita [79, 80]. Moduli međudimenzijskog prijenosa ove vrste gotovo u pravilu podrazumijevaju uporabu višeputih kromatografskih ventila. Najčešće su to ventili s 8 ili 10 ulaza te s dvije moguće pozicije kod kromatografije kondenziranim fazama ili jednostavni razdjelni ventili s tri ulaza opremljeni redukcijom toka kod plinske kromatografije. Ovi ventili omogućuju prikupljanje izlaznog toka prve dimenzije u skladišne petlje prije samog uvođenja u drugu dimenziju.

Skladišne petlje najčešće su izvedene na jedan od dva načina:

1. Sorpcijski element koji vezuje analite prve dimenzije.

Pokretna faza prve dimenzije prolazi kroz sorpcijski element na koji se vezuju analiti. Nakon određenog intervala zaustavlja se protok iz prve dimenzije te započinje protok pokretne faze druge dimenzije koja ispire analite i prenosi ih u drugu dimenziju.

2. Prazan volumen, izoliran od druge dimenzije tijekom punjenja.

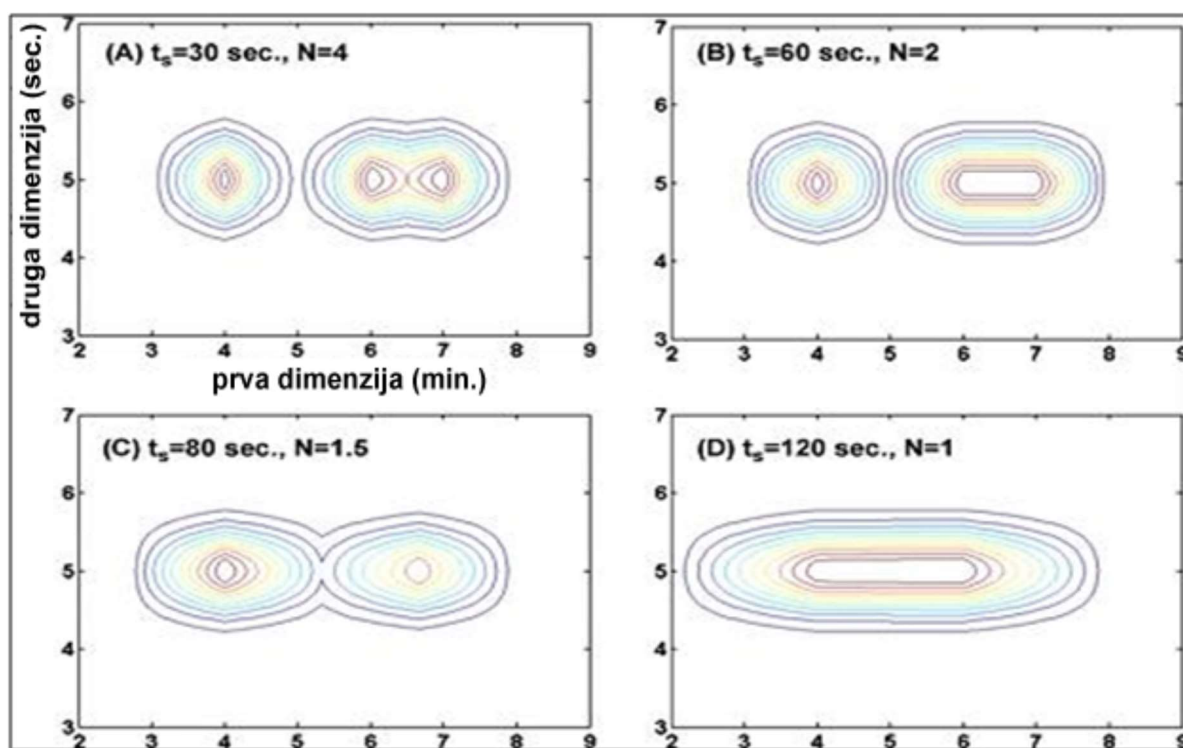
Pokretna faza prve dimenzije uvodi se u praznu petlju, cijev ili spremnik. Nakon određenog intervala ventilom se izolira sadržaj i ispire u drugu dimenziju njenom pokretnom fazom.

Sustav prijenosa analita smatra se sveobuhvatnim ukoliko zadovoljava sljedeće kriterije [77]:

- sve tvari prisutne u uzorku podvrgnute su razdvajanju iz smjese u obje dimenzije kromatografskog sustava
- zastupljenost tvari nakon međudimenzijskog prijenosa mora biti jednaka zastupljenosti u izvornom uzorku i sav tok eluenta po analizi mora biti upućen u detektor
- razlučivost prve dimenzije mora biti zadržana za vrijeme trajanja analize.

¹⁷ engl. *split mode*

Osim nabrojanih karakteristika, sustav prijenosa analita mora omogućiti optimalan broj pojedinačnih uzorkovanja sastava prve dimenzije. Murphy sa suradnicima [81] postavlja matematičke postulate o broju uzorkovanja koji zadržavaju razlučivost prve dimenzije uz kvalitetnu analizu u drugoj dimenziji. Taj «čarobni broj» mora biti 3 do 5 uzorkovanja unutar trajanja izlaza grupa analita iz prve dimenzije. Kvaliteta ovog procesa, nazvanog još i modulacijom, glavni je tehnički čimbenik kvalitete 2D-razdvajanja. Optimalan odabir učestalosti uzorkovanja, to jest perioda modulacije, je stoga od iznimne važnosti. Murphy i sur. dokazuju izravan utjecaj perioda modulacije na 2D-razlučivanje uzoraka.



Slika 11. Učinak učestalosti uzorkovanja na razdvajanje u 2D-kromatografiji, t_s – modulacijski period, N – broj uzorkovanja unutar trajanja jednog pika kromatografske krivulje [81]

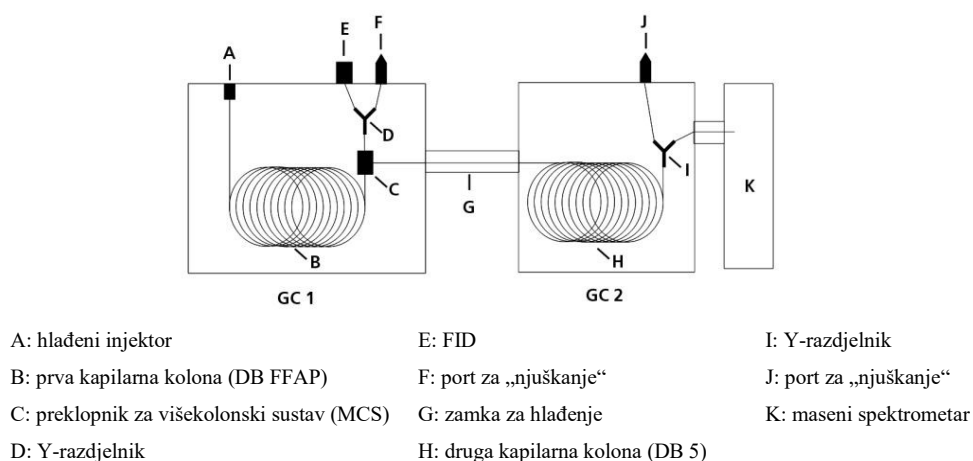
Kao što se može vidjeti na Slici 11., povećanje vremena uzorkovanja (modulacijskog perioda) uzrokuje smanjenje razlučivosti u prvoj dimenziji. Iskustveno je pokazano kako svaki eluat prve dimenzije mora biti uzorkovan 3 do 4 puta u cilju zadržavanja razlučivosti. Opisano pravilo u literaturi se često naziva *Murphyjev kriterij*.

U pravilu, sustav prijenosa analita neprekidno uzorkuje frakcije prve dimenzije (u slučaju izravne 2D-analize to je jedan od uvjeta). Stoga je potrebno analizu u drugoj dimenziji provesti vrlo brzo. Teži se vremenu trajanja analize u drugoj dimenziji jednakom ili kraćem od perioda uzorkovanja prve dimenzije. Ukoliko takvo vrijeme analize nije moguće, velika je

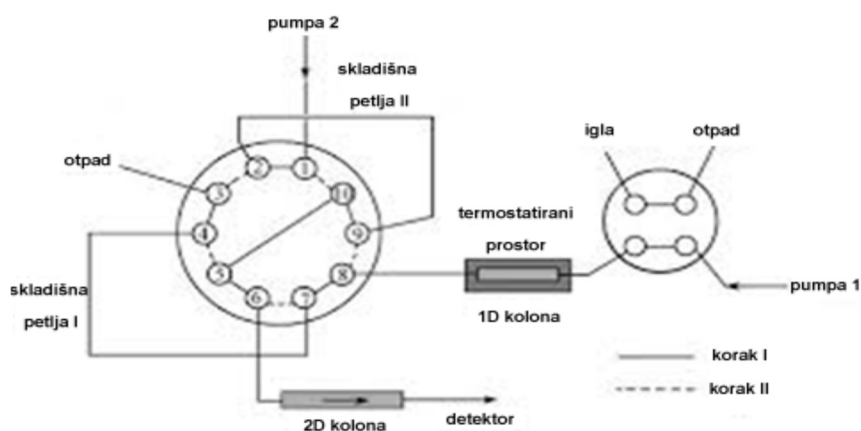
vjerojatnost pojave nedovršenih analiza u drugoj dimenziji – «wrapp around» učinak. Ovaj se fenomen može otkriti relativno lako jer se na kromatogramima pojavljuju signali s vremenom zadržavanja kraćim od vremena prolaza udarnog vala injekcije, što je teorijski nemoguće u slučaju prazne kolone.

2.4.1.3. Značajke razdvajanja u drugoj dimenziji

Analiza u drugoj dimenziji u pravilu je puno kraća od analize prve dimenzije. Mehanizam razdvajanja je najčešće različit od mehanizma razdvajanja prve dimenzije. Razlike se mogu ostvariti kroz temperaturu i tok pokretne faze, što je češći slučaj kod 2D-GC-sustava, ili kroz kemijski sastav pokretne faze kod HPLC-analiza. Osim izmjenama u eluentu, mehanizam se može mijenjati kombinirajući dvije nepokretne faze: primjerice nepolarnu C-18 u jednoj dimenziji i polarnu fenil supstituiranu fazu u drugoj. Često je razlika i drastičnija pa je nepokretna faza jedne dimenzije polarna, a druge nepolarna [80].



Slika 12. Shematski prikaz 2D-GC-sustava



Slika 13. Shematski prikaz 2D-LC-sustava, istaknute su skladišne petlje

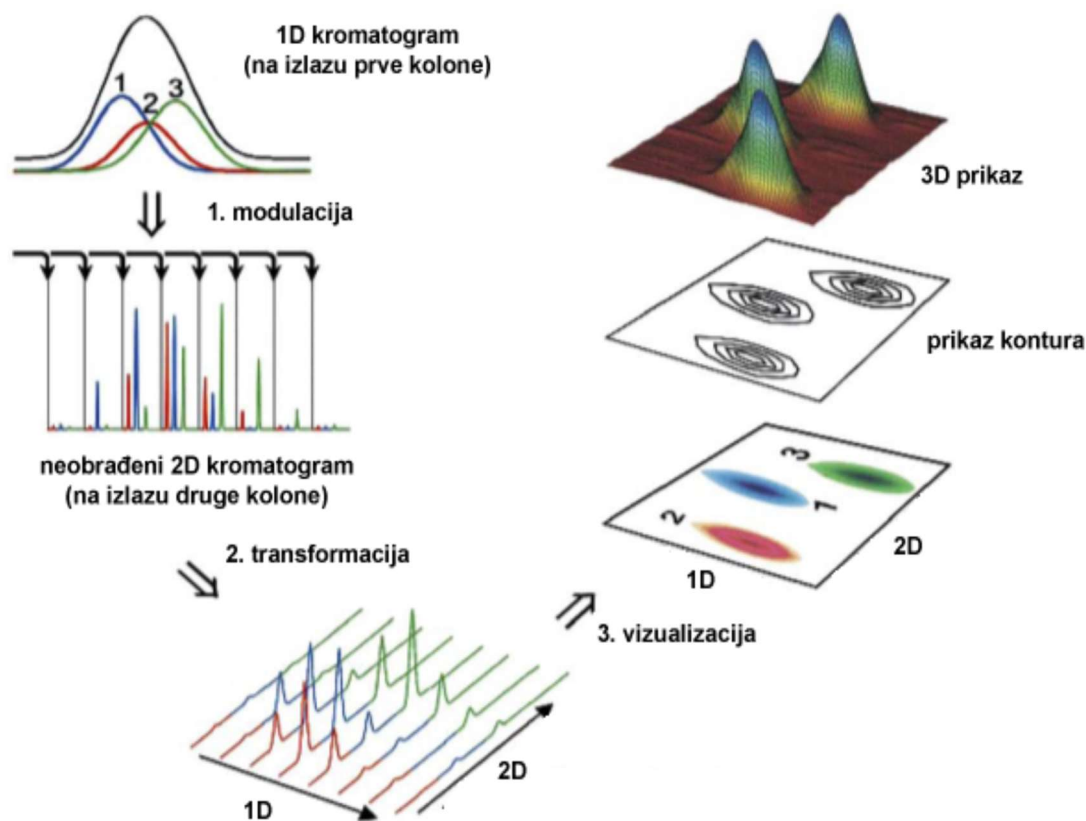
Agregatno stanje pokretne faze također može biti različito. Predstavljani su sljedeći sustavi analize: HPLC \times GC, SFC \times GC te SFC \times HPLC. Svi višedimenzijski kromatografski sustavi mogu biti opremljeni detektorima kompatibilnima s pokretnom fazom druge dimenzije za što se u literaturi može pronaći velik broj primjera [82]. Uz korištenje klasičnih detektora prilagođenih GC- i/ili HPLC-tehnikama, višedimenzijski sustavi uspješno su sprezani i sa spektrometrima mase. Tako dobivene sustave odlikuje visoka kromatografska razlučivost analize koja proizlazi iz povećanja broja teorijskih odsječaka te povećana mogućnost kvalitativne analize uzorka pomoću spektara mase.

2.4.1.4. Pretvorba signala 1D u 2D

Neobrađeni, izravni rezultat 2D-analize ne razlikuje se od uobičajenog kromatograma dobivenog analizom jednodimenzijskim sustavom, niti je to pikova na kromatografskoj krivulji. Kako bi se dobio kromatogram na kome su vidljiva razdvajanja u dvije dimenzije, pristupa se računalnoj obradi. Jednodimenzijski kromatogram razlaže se po osi vremena prolaska analita (os apscise) na jednake manje dijelove. Veličina manjih dijelova odgovara ili vremenu analize u drugoj dimenziji ili vremenu modulacije. Tako dobivene sekcije svode se na isti početni pravac te se ostvaruje 2D-matrica. Jedna od osi matrice predstavlja vrijeme i kromatografske fenomene koji su se odvijali u prvoj dimenziji, dok druga predstavlja isto za drugu dimenziju. Tako dobiveni slog prenosi tri informacije:

- 1 – vrijeme zadržavanja u prvoj dimenziji (praznine nastale pomicanjem sekcija se interpoliraju)
- 2 – vrijeme zadržavanja u drugoj dimenziji
- 3 – intenzitet signala najčešće prikazan spektrom boja.

Cijeli proces pretvorbe signala pojednostavljeno je prikazan na Slici 14.



Slika 14. Pretvorba 1D → 2D kromatogram [83]

Ovako dobiven 2D-kromatogram prenosi kvalitativne podatke. Intenzitet signala u ovom obliku nije moguće kvantificirati. Kvantitativni podatak dobivamo integracijom pikova pojedinih kromatografskih krivulja dobivenih detekcijom na izlazu druge dimenzije. Integracija se može provoditi nakon svake analize pri čemu se dobiveni podaci zbrajaju uzimajući kao referencu vrijeme zadržavanja ili se integracija može za svaki analit provesti samo na kromatografskoj krivulji koja pokazuje najveći intenzitet za pojedni analit. Kvantifikacija analita najčešće se provodi metodom vanjskog standarda ili metodom unutarnje normalizacijom, dok je korištenje unutarnjeg standarda rjeđe [84].

2.4.1.5. Razlučivost i kapacitet 2D-kromatografije

Dvodimenzijaska kromatografija je, u svakom od poznatih oblika, sačinjena od dvaju podsustava, od kojih svaki posjeduje vlastite karakteristike. Karakteristike cjelokupnog sustava nisu samo jednostavni algebarski zbir.

Giddings [77] definira dvodimenzijasku razlučivost R_{S2D} kao Pitagorinu udaljenost (ili Euklidovu apsolutnu vrijednost) razlučivosti dviju dimenzija.

Ako su A i B dva analita, a 1R_s i 2R_s razlučivosti u prvoj i drugoj dimenziji između A i B, ${}^1\omega$ i ${}^2\omega$ širine kromatografskih krivulja na 10% visine u prvoj i drugoj dimenziji te su Δt_r^1 i Δt_r^2 razlike u vremenu zadržavanja tvari A i B u prvoj odnosno drugoj dimenziji, imamo:

$$R_{s_{2D}} = \sqrt{{}^1R_s^2 + {}^2R_s^2} \quad (4)$$

$$R_{s_{2D}} = \sqrt{\left(\frac{2 \cdot \Delta t_r^1}{{}^1\omega_A + {}^1\omega_B}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot \Delta t_r^2}{{}^2\omega_A + {}^2\omega_B}\right)^2} \quad (5)$$

Najčešće korištena vrijednost pri ocijeni rada cjelokupnog 2D-sustava, kao i prijenosa analita, je kapacitet kromatografske krivulje.

Ako slijedimo Giddinsove postavke, kromatografski kapacitet cijelog sustava odgovara umnošku vrijednosti kromatografskog kapaciteta dviju dimenzija. Iz toga proizlazi mogućnost procijene kapaciteta na temelju površina na ravnini 2D-kromatograma i/ili integralom površine pod kromatografskom krivuljom (6,7).

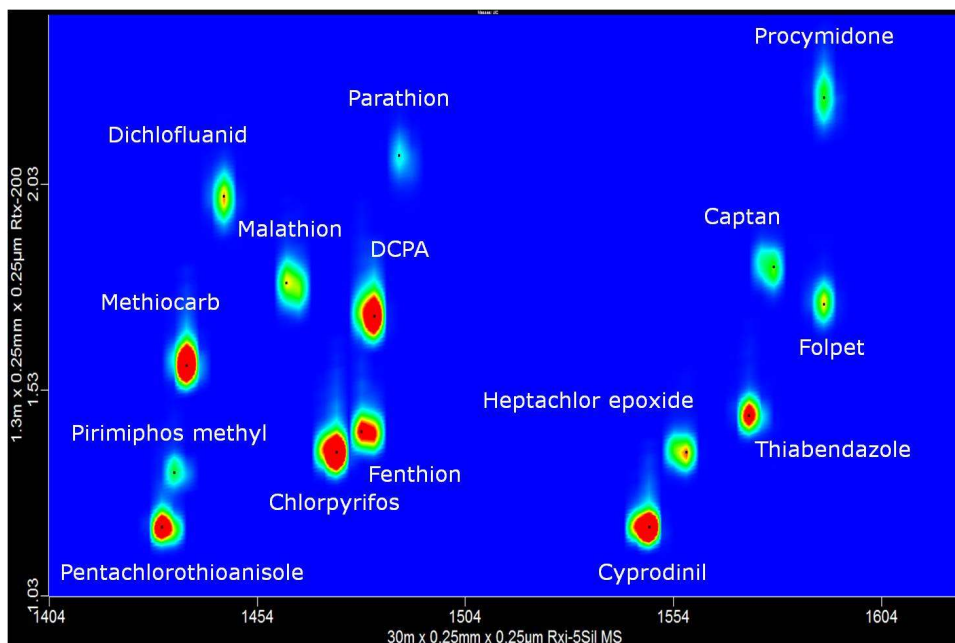
$$n_c = {}^1n_c + {}^2n_c \quad (6)$$

$$n_c = \frac{{}^1t_{r\max} + {}^2t_{r\max}}{{}^1\omega + {}^2\omega} \quad (7)$$

Iako ovaj pristup ne uzima u obzir ortogonalnost 2D-kromatografija (zauzeće prostora na 2D-kromatogramu), dobivene vrijednosti dobar su pokazatelj mogućnosti razdvajanja u 2D-sustavu.

2.5. Pregled izabranih primjera primjene višedimenzijskih kromatografskih sustava

Višedimenzijski sustavi primjenjuju se u širokom području djelovanja, a zbog velike slobode u sprezanjima elemenata raznih kromatografskih tehnika i sustava omogućuju stvaranje potencijalno vrlo moćnih analitičkih oruđa. Prvi sveobuhvatni sustav GC \times GC-analize predstavljaju Liu i Philips te njime analiziraju probnu smjesu ugljikovodika [72]. Analize složenih uzoraka fosilnih goriva čine i danas značajan postotak višedimenzijskih GC-analiza [85]. Ovi sustavi koriste se u analizi produkata rada automobilskih motora [86], pesticida, hlapljivih sastojaka prehrambenih artikala poput vina [87] ili farmaceutskih pripravaka.



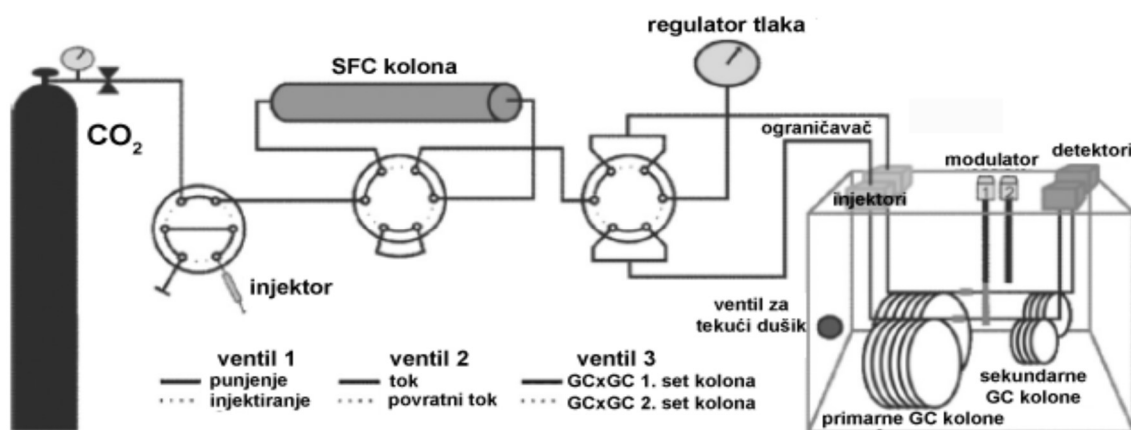
Slika 15. 2D GC-kromatogram uzorka pesticida.

Dvodimenzijske kromatografije HPLC \times HPLC sve su zastupljenije u proteomici, najčešće spregnute s MS-detekcijom. Unger i sur. [75] još 2000. godine uspoređuju kvalitetu razdvajanja proteina 2D-HPLC-tehnikom i 2D-gel elektroforezom. Od početka 21. stoljeća do danas mnoge istraživačke grupe predstavljaju vrlo uspješne sustave i metode razdvajanja peptida, proteina i hormona ekstrahiranih iz raznih matica uzoraka. Uz proteine zanimljiva je primjena dvodimenzijske tekućinske kromatografije u analizi polimera s ciljem boljeg razdvajanja polimernih varijeteta u kopolimerima [88].

Mao i sur. [89] povezuju HPLC u funkciji prve dimenzije s GC-sustavom kao drugom dimenzijom pri analizi složene matice korištenog motornog ulja. Koristeći HPLC-ovu nepokretnu fazu modificiranu srebrom uspijevaju razdvojiti aromatske ugljikovodike od alifatskih homologa te u drugoj dimenziji razdvojiti pojedine predstavnike grupa. Aromatski su ugljikovodici razdvojeni prema broju aromatskih prstenova. Razvijeni sustav međudimenzijski prijenos rješava sveobuhvatnim modelom. Dutriez i sur. [90] detaljno opisuju neizravno sprezanje LC-sustava kao prve fokusirajuće dimenzije s GC \times GC-sustavom. Autori razvijenim sustavom uspijevaju razdvojiti smjese alkana iz teškog destilata sirove nafte, uz ostvareno razdvajanje teških izomera alkana i alkena te polinaftenskih struktura. Sustavom je moguće ostvariti razdvajanja tih struktura te kvantifikaciju uporabom klasičnog FID-detektora. Usporedbe radi, potrebno je naglasiti kako to nije moguće nakon jednodimenzijske kromatografije ili samo GC \times GC-separacije, niti pomoću MS-detektora.

Uz uobičajene pokretne faze u plinskoj ili tekućinskoj kromatografiji, moguće je kao eluent u višedimenzijским kromatografijama koristiti i tvari u superkričnim uvjetima a, kako je već prikazano, daleko najzastupljenija tvar u toj skupini kromatografija je upravo CO₂. Prvi predstavljeni sustavi koristili su CO₂ kao pokretnu fazu u prvoj dimenziji. Liu i sur. [91] još su 1993. godine koristili polarnu kapilarnu kolonu kao nepokretnu fazu prve dimenzije te CO₂ u superkričnom stanju kao pokretnu fazu. Prijenos analita u drugu dimenziju riješen je pomoću restriktora toka kojim su ostvarena dva cilja: sveobuhvatni prijenos i prijelaz iz superkričnog u plinovito stanje CO₂. Promjena stanja omogućila je nastavak korištenja iste tvari kao pokretne faze i u drugoj dimenziji. Sam proces injektiranja u kratku nepolarnu kolonu druge dimenzije izveden je pomoću toplinske desorpcije. Svaki toplinski impuls ekvivalent je injekcije u drugu dimenziju. U prvoj dimenziji analiti su eluirani u grupama prema rastućoj polarnosti, dok su u drugoj dimenziji razdvajani pojedinačni analiti prema rastućoj molarnoj masi. Venter i sur. [92] koriste modificirani uređaj koji, umjesto plinovitog CO₂, u drugoj dimenziji koristi plinoviti vodik kao pokretnu fazu pri razdvajanju. Tom zamjenom povećana je efikasnost razlučivanja analita na nepokretnoj fazi. Osim ugljikovodika, autori uspješno analiziraju i polarne spojeve istim sustavom.

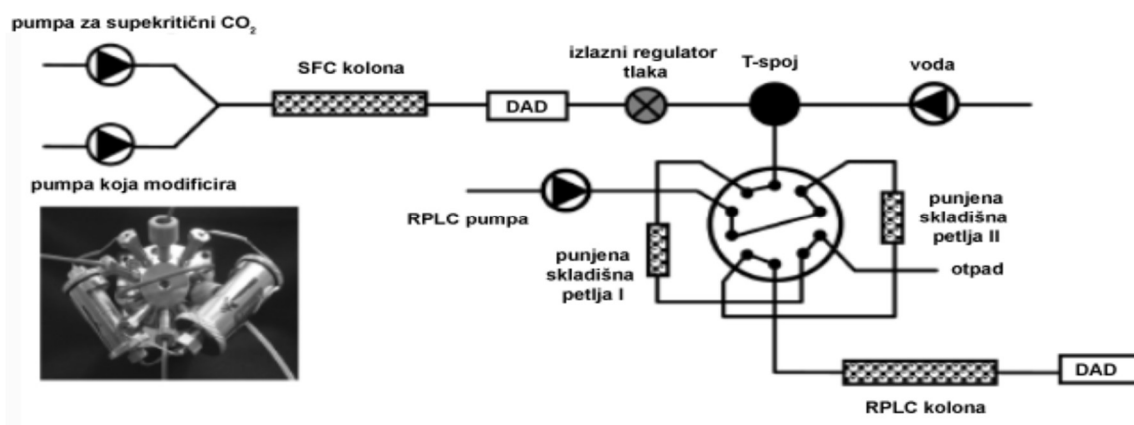
Adam i sur. [93] opisuju sustav SFC × GC × GC, koji je shematski prikazan na Slici 16. U njihovom primjeru analizirani su uzorci iz naftne industrije. Međudimenzijski prijenos izveden je pomoću sabirnih petlji postavljenih na izlazu iz kolone prve dimenzije koje čine elemente ventila broj 3. Autori su potvrdili uporabljivost i povećanu selektivnost ovakvog sustava u usporedbi s GC × GC- sustavima.



Slika 16. Shematski prikaz sustava SFC × GC × GC [93]

Francois i sur. [94] povezuju SFC-ovu prvu dimenziju s HPLC-ovom obrnutofaznom drugom dimenzijom. Analizirani su uzorci ekstrakta eteričnih ulja limuna i masnih kiselina ekstrahiranih iz ribljeg ulja. Međufazni prijelaz, iz SF-a u tekućinu, ostvaren je pomoću sabirnih

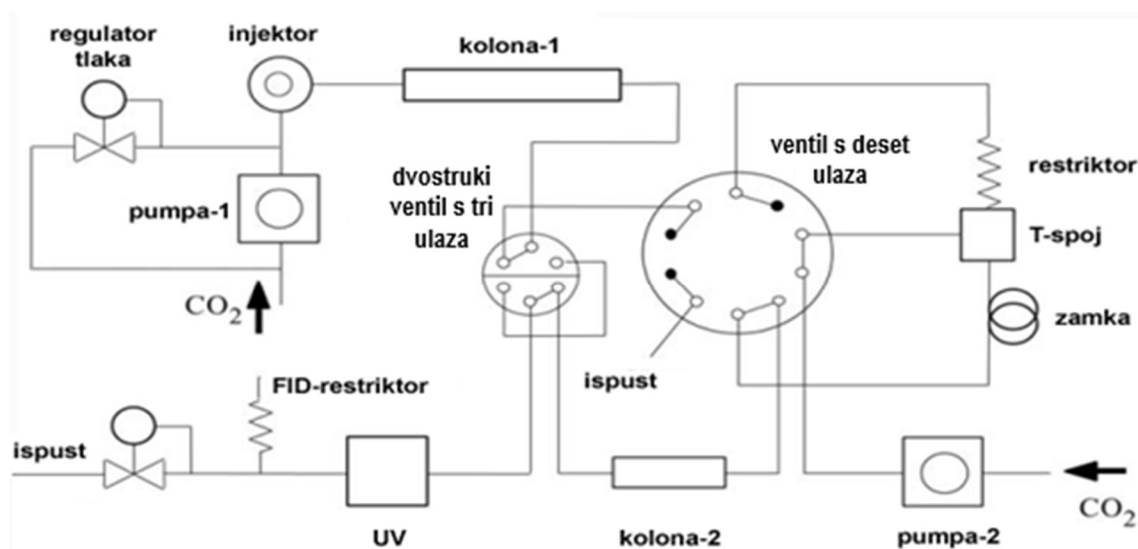
adsorpcijskih kolona. One se u sustav uključuju pomoću prekretnog ventila s deset ulaza. Uloga ventila s deset ulaza i u ovom sustavu je dvostruka, osim prijenosa pokretne faze iz jedne u drugu dimenziju, osigurava i međufazno odvajanje čime se olakšava prijelaz iz superkritične u tekuću fazu.



Slika 17. Shematski prikaz SFC × HPLC- sustava, u kutu fotografija ventila s deset ulaza i dvaju skladišnih kolona [94]

Autori odluku o uvođenju adsorpcijskih C18 kolona temelje na potrebi izoliranja turbulentnih interferencija koje se pojavljuju u slučaju međudjelovanja tekuće faze i superkritičnog fluida. Za primjeren rad sustava vrlo je bitno omogućiti dodatni dotok vode u tok CO₂ kako bi se pospješila adsorpcija analita na C18 skladišne kolone.

Korištenje superkritičnog fluida kao pokretne faze u obje dimenzije 2D-kromatografskog sustava još je u počecima razvoja. Rijetki literaturni navodi ograničavaju se na analize nepolarnih i slabopolarnih spojeva. Hirata i sur. [95] opisuju sustav sveobuhvatne analize koji koristi normalnu nepokretnu fazu u prvoj dimenziji, a nepolarnu C18 u drugoj dimenziji.



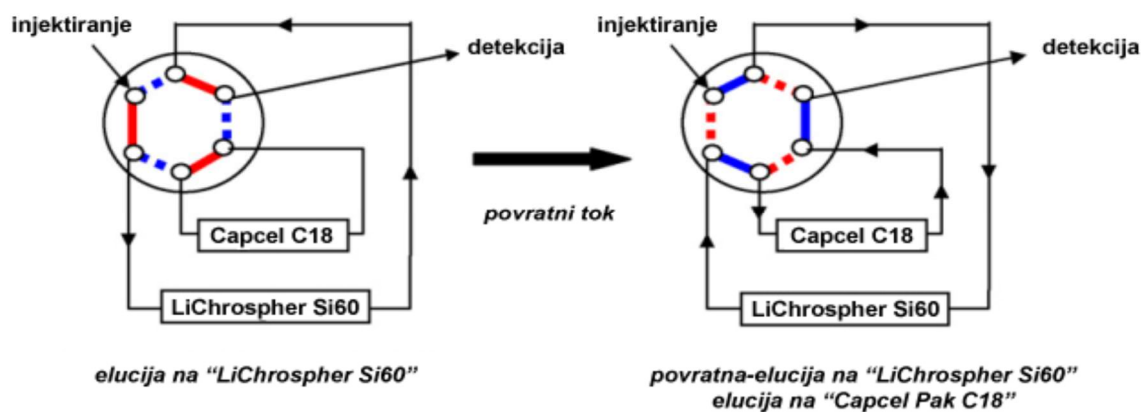
Slika 18. Shematski prikaz sustava SFC × SFC, međudimenzijски prijenos je sveobuhvatan [95]

Superkritični CO₂ u sustav se dovodi iz dva neovisna izvora, uz detekciju pomoću UV- i FID-detektora. Međudimenzijски prijenos odvija se putem dvaju ventila:

1. Dvostruki s tri ulaza – usmjerava tok pokretnih faza prve i druge dimenzije nakon prolaska kroz kromatografsku kolonu. Tok prve dimenzije usmjeren je prema deseteroputom ventilu, a tok druge dimenzije usmjeren je prema detektorima
2. Ventil s deset ulaza – upućuje tok pokretne faze prve dimenzije preko restriktora u sabirnu petlju te istovremeno omogućuje dekompresiju pokretne faze prve dimenzije s ciljem izbjegavanja prijenosa karakteristika toka prve dimenzije u drugu dimenziju. Dekompresija se odvija u okolini.

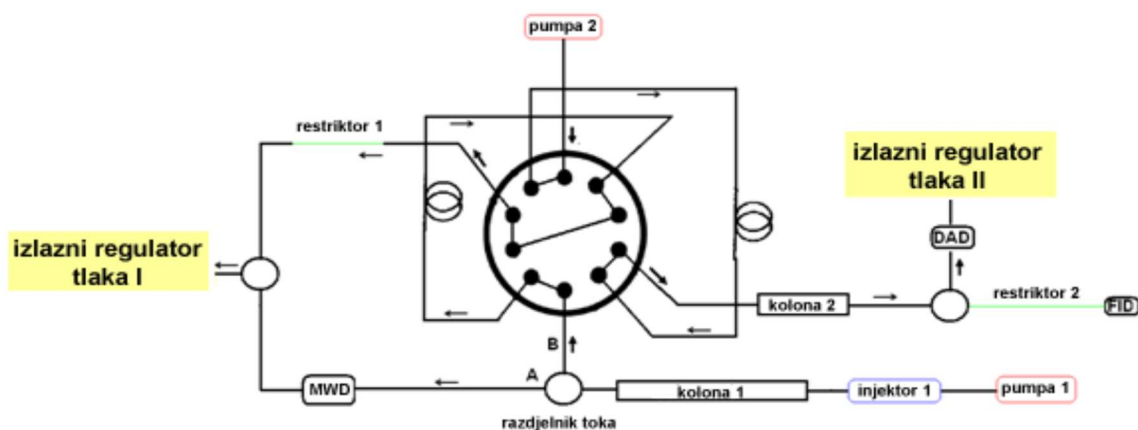
Autori navode vrijeme međudimenzijskog prijenosa od 10 sekundi što je unutar Murphyeva kriterija za analizirane uzorke. Rezultati analize metilnih estera masnih kiselina iz više matica pokazuju uporabljivost ove metode, no zbog potrebe za dekompresijom u prijenosu, ostaje otvorena mogućnost gubitka dijela analita te upitna kvantifikacija koju autori niti ne pokušavaju ostvariti baždarenjem.

Lavison i sur. [96] u analizi polarnih sastojaka matice motornih ulja predlažu korištenje 2D-SFC-sustava s nemodificiranim CO₂ kao pokretnom fazom. Predloženi sustav predviđa promjenu smjera toka pokretne faze tijekom analize u drugoj dimenziji. Autori ga opisuju kao *hibridni* sustav analize. Analitički rezultati, kako kvantitativni tako i kvalitativni, dokazali su mogućnost korištenja ove vrste modulacije.



Slika 19. Shematski prikaz sustava SFC × SFC, polarna nepokretna faza prve dimenzije podvrgnuta je eluciji i povratnoj eluciji dok nepolarna druga faza prolazi samo proces elucije u jednom smjeru [96]

Guibal i sur. [97] 2D-SFC-u pristupaju na drugačiji način. Prilagođavaju sustav međudimenzijskog prijenosa iz dvodimenzijske tekućinske kromatografije, kako bi ostvarili izravnu dvodimenzijsku sveobuhvatnu SFC-analizu pomoću CO₂.



Slika 20. Shematski prikaz sustava sveobuhvatne SFC × SFC-analize [97]

Autori koriste nepolarnu C18 nepokretnu fazu u prvoj dimenziji te polarnu normalnu fazu u drugoj dimenziji, kao i promjenjiva vremena analize u drugoj dimenziji (promjenjivi modulacijski razmaci). Analizirani su uzorci naftnih matica uzoraka, a prikazani rezultati dokazuju uporabnu vrijednost ovog sustava i mogućnost daljnjeg razvoja. Ovaj sustav omogućuje injektiranje uzoraka unutar Murphyeva kriterija. Iz sheme prikazane na Slici 20. vidljivo je da dobavna pumpa pokretne faze druge dimenzije obavlja prijenos analita iz sabirnih petlji u kolonu druge dimenzije te samu brzu analizu u drugoj dimenziji. Predloženi sustav približava se sveobuhvatnosti karakterističnoj za višedimenzijske tekućinske sustave kod kojih, zbog nestlačivosti tekućina, nema gubitaka u prijenosu, niti potrebe za dekompresijom ili

prekidom toka prve dimenzije, što je ostvareno. No, kako su fluidi u superkričnom stanju stlačivi, a o tlaku izravno ovisi i topljivost analita u njima, ostaje problem u parametrima pokretne faze koju dobavlja pumpa druge dimenzije. Vrijednosti protoka i tlaka pokretne faze koje autori koriste kompromis su između potreba sustava za prijenos analita i same analize u drugoj dimenziji. Autori napominju potrebu za dodatnim razvojem modula za prijenos analita koji bi uklonio potrebu za tim kompromisom te omogućio nezavisnost postavki pokretne faze u sva tri dijela sustava.

Proučavanjem brojnih literaturnih referenci dolazi se do zaključka o važnosti načina međudimenzijskog prijenosa analita u višedimenzijskim sustavima te o problemima koji se otkrivaju pri njihovom rješavanju. U nastavku istraživanja pristupilo se pokušaju rješavanja ovog problema.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kromatografski sustav

Kromatografski sustav dizajniran za potrebe ovog istraživanja čine karakteristični elementi dvodimenzijskog kromatografskog sustava, no tehničko rješenje instrumenta u potpunosti je izvedeno u Laboratoriju za kromatografije u superkritičnom stanju Zavoda za analitičke, bioanalitičke znanosti i miniaturizaciju, ESPCI ParisTech u Francuskoj.

Osnovne dijelove sustava čine:

1. pokretna faza sa sustavom dobave
2. sustav uvođenja uzorka
 - pomoćni sustav vremenske modulacije
3. nepokretna faza – kromatografske kolone
 - i. nepokretna faza prve dimenzije
 - ii. nepokretna faza druge dimenzije
4. samostalno razvijen modul prijenosa analita
5. detektori

Pokretnu fazu kromatografskih analiza čini CO₂ čistoće 99,995% dobavljača Messer (Mitry-Mory, Francuska) u klasičnim cilindrima s mogućnošću korištenja plinske i/ili tekuće faze CO₂.

Dobava pokretne faze izvedena je putem triju neovisnih izvora:

1. SFC Aurora A5 / HPLC Agilent 1100 pumpa proizvođača Agilent Technologies France SAS, opremljena linijskim izokratnim sustavom uvođenja modifikatora u tok superkritičnog CO₂ i korištena za dobavu pokretne faze u modul prijenosa analita među dimenzijama; najveći radni tlak je 350 bara
2. Berger SFC FCM-1200 pumpa proizvođača Mettler-Toledo AutoChem, Viroflay, Francuska, korištena za dobavu pokretne faze u sustav uvođenja uzorka i prvu dimenziju, najveći radni tlak je 350 bara

3. Berger SFC FCM-1200 pumpa proizvođača Mettler-Toledo AutoChem, Viroflay, Francuska, korištena za dobavu pokretne faze u drugu dimenziju, najveći radni tlak 350 bar

Sve tri pumpe opremljene su računalno upravljanim sustavom za praćenje i prilagodbu tlaka na izlazu iz kromatografske kolone. Kontrola protoka je posredna putem kontrole tlaka, ali i neposredna pomoću protokomjera postavljenih na izlaz kolone druge dimenzije. Hlađenje glave i čela klipa SFC Aurora A5 / HPLC Agilent 1100 izvedeno je Peltieovim hladnjakom, a Berger SFC FCM-1200 kao vodeno hlađenje vanjske stjenke cilindra (što predstavlja modifikaciju u odnosu na tvorničku postavku).

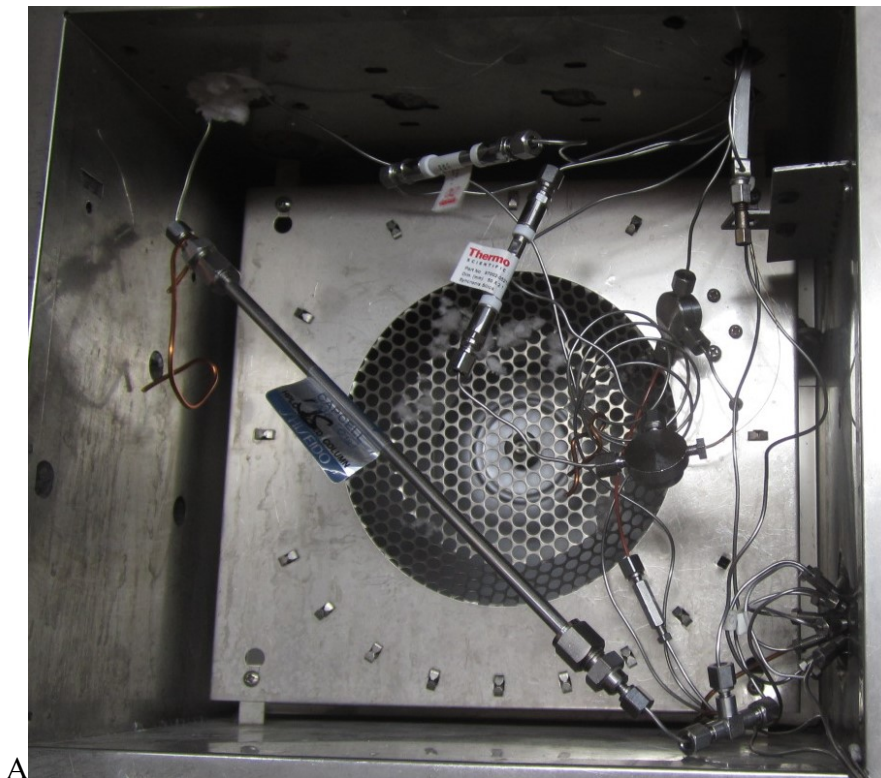
Sustav uvođenja uzorka sastoji se od modificiranog HPLC-injektora proizvođača VALCO, model 06T0107H. Uzorak u tekućem ili plinovitom agregatnom stanju uvodi se u visokotlačni, zrakom upravljani, ventil sa šest ulaza. Ventil je opremljen vanjskom petljom volumena 67 μ L.

Nepokretne faze korištene tijekom razvoja sustava su:

1. Ascentis Express C18 – proizvođača Supelco u dimenziji 150 \times 4,6 mm punjenje 2,7 μ m
2. Sepax silica – proizvođača Sepax Technologies dimenzija 100 \times 4,6 mm punjenje 1,8 μ m
3. Sincronis silica – proizvođača Thermo dimenzija 50 \times 2,1 mm punjenje 2,1 μ m
4. Capcell PAK C18 ACR – proizvođača Shiseido dimenzija 250 \times 4,6 mm punjenje 5 μ m
5. Capcell PAK C18 UG – proizvođača Shiseido dimenzija 250 \times 4,6 mm punjenje 5 μ m

Kromatografske kolone korištene su u prvoj dimenziji normalne i obrnute faze, dok je u drugoj dimenziji korištena kraća kolona s punjenjem normalne faze, u skladu s dosadašnjim iskustvima u 2D-SFC-kromatografiji [50 – 52].

Injektor i svi dijelovi sustava za prijenos analita i nepokretne faze obiju dimenzija postavljene su u prilagođenu termostatirajuću pećnicu HP5890 (Slika 21.).



A



B

Slika 21. Termostatirajuća pećnica HP5890, vidljivi svi dijelovi sustava - A, uvećanje dijela sustava za prijenos analita – vidljiv ventil s 10 ulaza B

Međudimenzijski prijenos analita obavlja se putem novo razvijenog modula. Elementi modula su:

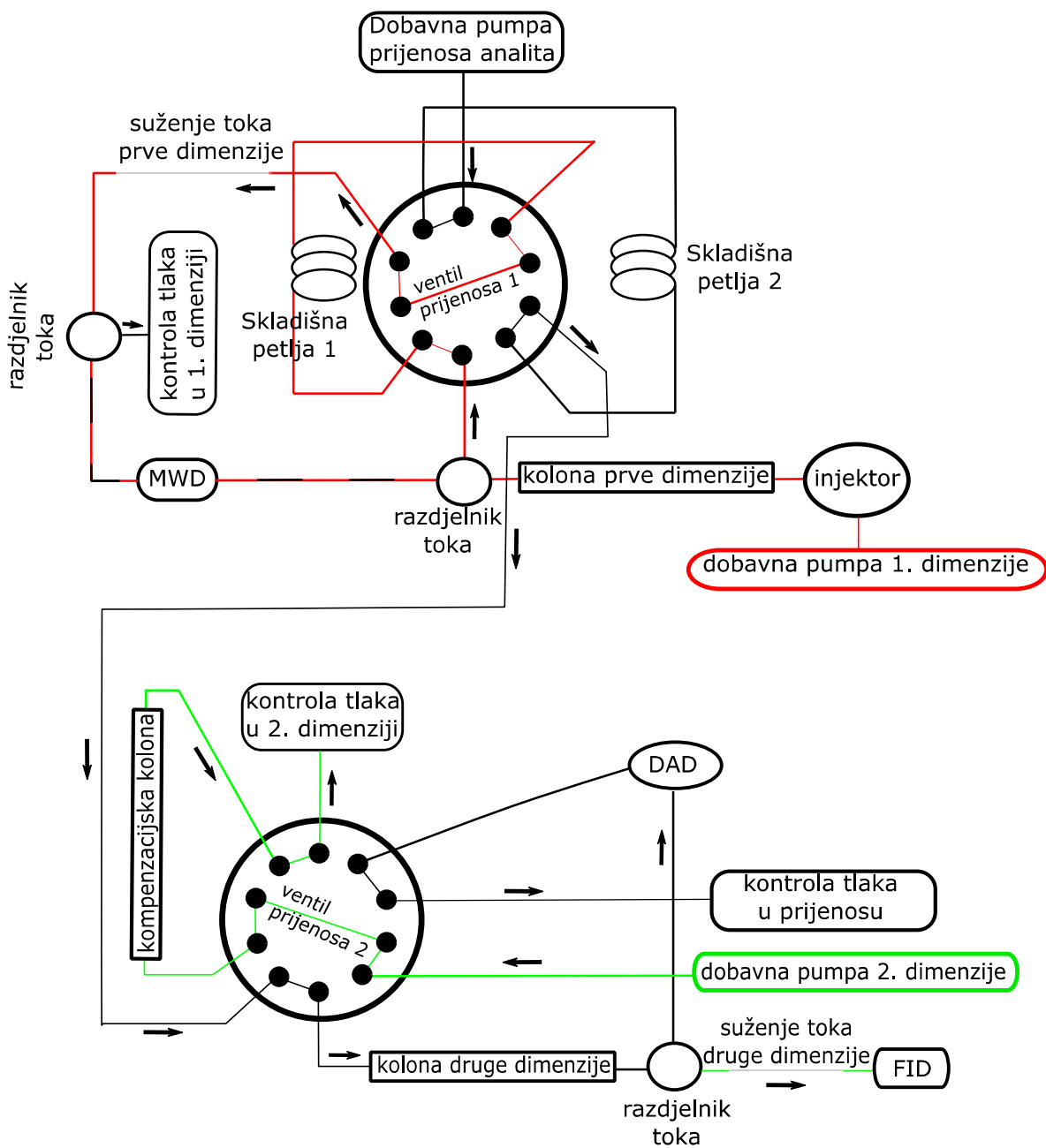
1. dva međusobno povezana *micro-bore* visokotlačna, zračno upravljana, ventila s deset ulaza također proizvođača VALCO model C72-1690ED
2. podsustav za vremensku modulaciju i aktivaciju ventila razvijen u ESPCI ParisTech
3. otpornici toka
4. dvije vanjske petlje za prijenos i kratkotrajno skladištenje analita
5. nadoknadna kolona

Detektori su u sustavu postavljeni na dvije pozicije:

1. Spektrofotometar s mogućnošću praćenja i istovremenog snimanja spektara više valnih duljina, model UV MWD HP 1050 proizvođača Agilent Technologies France SAS, postavljen u paralelni tok u prvoj dimenziji. Uloga ovog detektora je kontrola toka analita kroz prvu dimenziju te procjena vremena ulaza analita u modul za prijenos. Uz informacije o tlaku i protoku pokretne faze omogućuje potpunije upravljanje prvom dimenzijom 2D-kromatografskog sustava
2. Spektrofotometar s nizom dioda, model UV DAD HP 1050 proizvođača Agilent Technologies France SAS, postavljen na izlaz toka druge dimenzije kao jedan od dva završna detektora
3. Plameno-ionizacijski detektor, model HP 1773, postavljen na izlaz toka druge dimenzije kao drugi završni detektor

Svi spojni elementi i cijevi izrađeni su od visokolegiranih čelika prilagođenih korištenju u kromatografskim sustavima u dimenzijama 3/16 i 2/32 inča, dok su kapilarni spojevi i suženja izrađena od PEEKSIL - silikatna kapilara nazivnog unutarnjeg promjera 25 µm ili 50 µm.

Modul za međudimenzijski prijenos analita ključan je dio cijelog novosmišljenog kromatografskog sustava. Na Slici 22. prikazan je shematski prikaz razvijenog 2D-SFC-sustava.



Slika 22. Shematski prikaz 2D-SFC-kromatografskog sustava

Preko injektora u tok pokretne faze uvodi se uzorak. Slijedi analiza u prvoj dimenziji. Izlazni tok dijeli se razdjelnikom stalnog omjera u dva toka, pri čemu se dio toka analizira detektorom s detekcijom više valnih duljina (MWD)¹⁸, a drugi dio toka uvodi se u ventil 1 modula za prijenos putem kojega puni jednu od skladišnih petlji. Izlaz skladišne petlje spojen je preko cijevnog suženja s izlaznim tokom MWD-detektora. Tako spojeni tokovi prve dimenzije izvode se u digestorski odvod kroz sustav kontrole izlaznog tlaka. Za vrijeme punjenja prve skladišne

¹⁸ engl. *Multiwave Detector*

petlje sadržaj druge skladišne petlje ispire se tokom pokretne faze i pomoću drugog deseteroputog ventila dovodi na ulaz kromatografske kolone druge dimenzije. Pokretnu fazu za taj stadij dobavlja pumpa podešena samo za tu svrhu. Ventil 2 omogućuje istovremeni prijenos analita iz skladišne petlje u drugu dimenziju i održavanje radnih parametara (tlak i temperatura) pumpe koja dobavlja pokretnu fazu u drugu dimenziju. Parametri superkritičnog CO₂ u drugoj dimenziji moraju biti stalni i neovisni u odnosu na stanje u sustavu prijenosa analita. Tijekom prijenosa analita tok pokretne faze druge dimenzije usmjerava se kroz kompenzacijsku kolonu. Kompenzacijska kolona je istovjetna koloni druge dimenzije, no kroz nju nije predviđen protok analita, već samo superkritičnog CO₂.

Upravo je ta inovacija instrumentacijski novitet prvi puta predložen, izveden i ispitan u ovom radu. Kako u literaturi do tada nisu bili opisani, pa čak ni natuknuti, sustavi nezavisno upravljanoga prijenosa analita, predložena izvedba nudi rješenje. Omogućuje neprekinuti rad sustava dobave pokretne faze u drugu dimenziju uz parametre pokretne faze prilagođene upravo analizi u toj dimenziji. Takva izvedba otklanja kompromise u postavkama parametara pokretne faze koji su nužni ukoliko se objedini njena dobava u modulu prijenosa i drugoj dimenziji razdvajanja.

Pokretna faza druge dimenzije, tijekom prijenosa analita iz skladišne petlje u drugu dimenziju, mora zadržati analitičke uvjete. To se tijekom razvoja prijenosnog modula pokušalo ostvariti na više načina.

Prvi neuspješan pokušaj bio je zaustavljanje rada pumpe druge dimenzije u tlačnom statusu uz blokadu toka na ventilu 2. Načelno, ovaj bi pristup pojednostavio izvedbu sustava. Nažalost, pri kratkim vremenima analize brzina kojom pumpa nadoknađuje pad protoka i tlaka, do kojih dolazi pri preketu ventila u poziciju punjenja, kompromitira kvalitetu analize što je detaljnije objašnjeno u prikazu rezultata.

Sljedeći pokušaj bio je sličniji konačnom sustavu. Uvodi se stalni rad pumpe druge dimenzije koja dobavlja pokretnu fazu kroz slobodnu petlju ventila 2 te tijekom perioda prijenosa ispušta u okolinu preko otpornika toka.

Kako bi se unaprijedila kontrola protoka, otpornik toka je izmjenjen te se omogućilo njegovo spajanje na povratnu kontrolu tlaka druge dimenzije. Vrijednosti su se ustabilile, no pri preketu ventila 2 dolazilo je do kratkih gubitaka tlaka u sustavu uz vjerojatne povremene gubitke superkritičnosti na ulazu kolone druge dimenzije.

Konačno rješenje, koje je zadovoljilo sve parametre te je i prihvaćeno, koristi kao kompenzacijski element kolonu identičnu analitičkoj koloni druge dimenzije.

Izlazni tok druge dimenzije dijeli se na dva toka u omjeru 99:1. Veći dio toka uvodi se u DAD UV/VIS-spektrofotometrijski detektor, dok se manji dio toka uvodi u FID- detektor. Omjer se toka ograničava pomoću kapilarnog suženja na samom ulazu u FID-detektor. Ovo suženje izrađeno je u laboratoriju. Izlazni tok DAD-detektora koristi se za kontrolu tlaka i protoka, istovjetno kontroli toka prve dimenzije.

Dio sustava za prijenos analita je i podsustav za vremensku modulaciju. Ovaj podsustav je potpuno razvijen u laboratoriju Zavoda za analitičke, bioanalitičke znanosti i miniaturizaciju ESPCI ParisTech, te omogućuje usklađeno djelovanje injektora i dvaju ventila s deset ulaza, a s ciljem održavanja kontroliranih i ponovljivih uvjeta tijekom analiza. Podsustav se sastoji od dvaju vremenski upravljanih, međusobno nezavisnih i samostalno podesivih naponskih releja. Ulazni signal početka analize dolazi kao naponski impuls vrijednosti 5V, generiran prebacivanjem šesteroputog injektorskog ventila iz pozicije punjenje¹⁹ u položaj injektiranja uzorka²⁰. Signal pokreće relej vremenski upravljaniog pneumatskog aktuatora rada ventila 1 koji se postavlja u poziciju punjenja prve petlje (Slika 22) i ispiranja druge petlje. Istovremeno, istovjetni relej aktuatora rada ventila 2 postavlja se u poziciju:

1. pražnjenje druge petlje u kolonu druge dimenzije
2. protok pokretne faze kroz kompenzacijsku kolonu s ciljem postizanja radnih karakteristika u drugoj dimenziji .

Nakon zadanog vremena aktuator ventila 2 prekreće ventil u poziciju analize u drugoj dimenziji, dok se istovremeno prijenosni tok upućuje na stabiliziranje i pripremu kroz kompenzacijsku kolonu.

Prekret ventila 1 iz pozicije punjenja prve petlje u poziciju punjenja druge petlje vremenski je usklađen s povratkom ventila 2 u poziciju prijenosa analita. Povratak ventila 2 u tu poziciju uvjetovan je:

1. završetkom ciklusa stabilizacije parametara sustava prijenosa
2. završetkom analize u drugoj dimenziji.

U ovom se trenutku ciklus ponavlja analizom uzorka skupljenog u skladišnoj petlji 1. Stabilizacijski dio sustava za prijenos, središnji dio kojega je kompenzacijska kolona, omogućuje:

¹⁹ engl. *load*

²⁰ engl. *inject*

1. zadržavanje analita u superkričnoj pokretnoj fazi tijekom čitavog procesa analize
2. održavanje parametara stanja superkričnog CO₂ druge dimenzije u radnom uvjetima tijekom prijenosa analita
3. vrlo kratko vrijeme potrebno za izmjenu tokova superkričnog CO₂ koji djeluju na drugu dimenziju (prijenos – druga dimenzija) bez poremećaja superkričnog stanja.

Ventil 2 u sustavu omogućuje:

1. samostalan i potpuno odvojen rad dobavnog sustava za međudimenzijski prijenos analita i dobavnoga sustava pokretne faze druge dimenzije.
2. brz prijenos analita bez potrebe za dekompresijom i otplinjavanjem superkričnog CO₂ u bilo kojem dijelu sustava analize.

Sustav nadzora i prikupljanja neobrađenih podataka sastoji se od:

1. 3D-SFC Chemstation 3.4 proizvođača HP za nadzor rada i upravljanje Berger pumpama UV/VIS i FID-detektorima
2. Chemstation 4.0 proizvođača HP za nadzor rada i upravljanje SFC Aurora A5 / HPLC Agilent 1100 podsustavom

3.1.2. Uzorci

3.1.2.1. Standardi

1. Smjesa dekana i antracena otopljenih u heksanu: koncentracija matične otopine 0,1 mg/mL za svaki od ugljikovodika.
2. F.A.M.E. – standardna smjesa metilnih estera viših masnih kiselina proizvođača Sigma Aldrich

3.1.2.2. Probne smjese

1. Smjesa ugljikovodika

U Tablici 2. navedeni su sastojci i masena koncentracija ugljikovodika nižeg vrelišta. Ovi su ugljikovodici u raznim kombinacijama korišteni s ciljem ispitivanja rada razvijenoga sustava, praćenja utjecaja protoka i tlaka u dijelovima kromatografskog sustava na kvalitetu analize te usporedbe 2D-SFC i GC × GC-kromatografskih sustava.

Tablica 2. Ugljikovodici i njihove koncentracije korišteni u pripravi probnih smjesa

Spoj	masena koncentracija u otapalu (mg/mL)	grupa spojeva
Alkani C ₉ do C ₂₀	0,25	Alkani
Alkeni C ₁₁ do C ₂₀	0,25	Alkeni
Antracen	0,20	Aromatski ugljikovodici s 3 prstena
Acenaften	0,30	
Acenaftilen	0,30	
Fluoren	0,30	
Fenatren	0,30	
Trifenilen	0,30	
Fluoranten	0,30	Aromatski ugljikovodici s 4 prstena
Benzantracen	0,30	
Benzo(b)fluoranten	0,05	Aromatski ugljikovodici s 5 prstenova
C ₂ , C ₃ , C ₄ alkilbenzeni	0,25	Derivati benzena
Orto-ksilen	0,25	
Meta-ksilen	0,25	
Naftalen	0,25	Derivati naftalena
1-metil naftalen	0,25	
2-etil naftalen	0,25	

Kao otapala korišteni su:

1. heptan – HPLC razine čistoće, proizvođača MERCK
2. ugljikov disulfid – PA razine čistoće, proizvođača MERCK

3.1.2.3. Stvarni uzorci

1. Vakuumski destilat frakcija sirove nafte – dobavljač IFP Energies Nouvelles, koncentracija 50 mg/mL u heptanu
2. Vakuumski destilat frakcija tekućeg ostatka ugljena - dobavljač IFP Energies Nouvelles, koncentracija 53 mg/mL u CS₂
3. Ekstradjevičansko maslinovo ulje miješanih sorti – zemlja podrijetla Hrvatska

3.2. Metoda

3.2.1. Razvoj i provjera rada sustava

Prijenos analita u 2D-SFC-sustavu ovisi o parametrima stanja superkritičnog CO₂. Ponajprije ovisi o tlaku i protoku te, u nešto manjoj mjeri, o temperaturi i dodanim modifikatorima. Osmišljeni kromatografski sustav predviđen je za analize spojeva pri vrijednostima temperature blago većima od kritične temperature CO₂ u svim kromatografskim dimenzijama, a utjecaj temperature promatran je pretpostavljajući jednodimenzijski kromatografski sustav. Taj pristup omogućen je dizajnom koji predviđa istu pripremu i radnu temperaturu svih elemenata sustava, stoga i jednak utjecaj temperature na konstantu razdjeljivanja.

Tlak i protok pokretne faze, u predloženom sustavu 2D-SFC-analize, ključne su vrijednosti u praćenju rada sustava. Kontrolni čimbenici su:

- F_1 – protok superkritičnog CO₂ u prvoj kromatografskoj dimenziji
- p_1 – tlak superkritičnog CO₂ u prvoj kromatografskoj dimenziji
- F_i – protok superkritičnog CO₂ u modulu za prijenos
- p_i – tlak superkritičnog CO₂ u modulu za prijenos
- F_2 – protok superkritičnog CO₂ u drugoj kromatografskoj dimenziji
- p_2 – tlak superkritičnog CO₂ u drugoj kromatografskoj dimenziji

Vrijednost protoka je čimbenik koji izravno utječe na mehanizam analize, mijenjajući konstantu razdjeljenja, i na fizički međudimenzijski prijenos mase tvari – analita. Vrijednost tlaka pokretne faze izravno utječe na njena svojstva što proizlazi iz stlačivosti superkritičnog CO₂.

Kako bi se moglo cjelovito prikazati utjecaj prijenosa na analizu, kao i međudimenzijski utjecaj vrijednosti tlaka i protoka na analizu, pristupilo se odabiru najveće i najmanje vrijednosti tih čimbenika. Odabrane vrijednosti, prikazane u Tablici 3., posljedica su nužnog kompromisa između strukturnih ograničenja dijelova sustava, ponajprije najvećeg radnog tlaka pumpi, i stvarnih kromatografskih ograničenja.

Tablica 3. Granične i srednje vrijednosti protoka i tlaka superkritičnog CO₂ tijekom provjera rada sustava i utjecaja na prijenos analita

	prva dimenzija			prijenos			druga dimenzija		
	max	int	min	max	int	min	max	int	min
<i>F</i> mL/min	2,0	1,6	1,2	2,1	1,7	1,3	1,2	1,0	0,8
<i>P</i> Bar	200	160	120	110	90	70	250	200	150
oznaka u tablici matrice eksperimenta	+	0	-	+	0	-	+	0	-

Da bi odredili koji od čimbenika i kako utječu na odgovor kromatografskog sustava, izrađena je statistička studija njihovih potencijalnih utjecaja u uređaju, odnosno matrica plana ispitivanja²¹. Uzimajući u obzir šest čimbenika i njihova međudjelovanja koja bi mogla utjecati na rad sustava, a s ciljem smanjenja broja probnih analiza u kojima bi rezultati promjene vrijednosti praćenih čimbenika bili istovjetni, odabrana je izvedba 2⁶⁻². Rezultat ovakvog pristupa su dva čimbenika. U Tablici 4. prikazane su oznake vrijednosti praćenih čimbenika u 16 različitih kombinacija koje su rezultat statističke obrade mogućih međudjelovanja. Značenja oznaka su:

p_1 – tlak u prvoj dimenziji

p_i – tlak u modulu prijenosa

p_2 – tlak u drugoj dimenziji

F_1 – protok u prvoj dimenziji

F_i – protoku modulu prijenosa

F_2 – protoku drugoj dimenziji

²¹ engl. *design of experiments*

Tablica 4. Matrica eksperimenta, vrijednosti praćenih čimbenika prikazani kroz poveznicu s Tablicom 2.

Redosljed uzoraka	p_1	F_1	p_i	F_2	p_2	F_2
središnja vrijednost	0	0	0	0	0	0
1	+	+	+	-	+	-
2	+	+	-	-	+	+
3	+	-	+	+	+	-
4	-	+	+	-	+	+
5	-	-	+	-	-	+
6	-	-	-	+	+	-
7	+	-	+	-	-	-
8	+	+	-	+	-	+
središnja vrijednost	0	0	0	0	0	0
9	-	+	-	-	+	-
10	-	-	+	+	+	+
11	+	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-
13	-	+	-	+	-	-
14	-	+	+	+	-	+
15	+	+	+	+	-	-
16	+	-	-	-	-	+
središnja vrijednost	0	0	0	0	0	0

Ove eksperimentalne pretpostavke omogućuju, ne samo određivanje utjecaja šest navedenih čimbenika, već i njihova međudjelovanja prvog reda unutar jedne dimenzije sustava i međudimenzijski.

Poredak izvođenja ovih šesnaest različitih postavki je nasumičan, a s ciljem smanjenja mogućeg međusobnog utjecaja. Analize pri središnjim vrijednostima odabrane su s ciljem praćenja stabilnosti odgovora instrumenta kod promjena vrijednosti čimbenika koji utječu na rad kromatografskog sustava.

Statistička priprema i obrada podataka izrađeni su pomoću računalnih programa:

1. JMP 10.0 (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA) – priprava, obrada
2. Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) – obrada prikupljenih podataka
3. Matlab (Mathworks) – izrada sustava za obradu podataka.

Interpretacija analitičkog rezultata dobivenog UV/VIS i/ili FID-detektorom zahtjeva obradu izravno dobivenog rezultata – jednodimenzijskog kromatograma – u dvodimenzijski kromatogram. Na tržištu postoje računalni programi kojima je svrha upravo ova pretvorba, no oni su prilagođeni pretvorbi rezultata 2D-kromatografskih sustava bez zasebne modulacije prijenosa. Takvi sustavi nemaju mogućnost samostalnog podešavanja vrijednosti vremena analize 1. i 2. dimenzije. Kako bi riješili problem, razvijen je Matlab algoritam koji omogućuje neovisnu obradu kromatografskih podataka, bez obzira na vremenski slijed događaja ili korišteni izvor signala. Programski kod preuzima sadržaj datoteke .cvs ili .txt u kojoj se nalazi niz uređenih parova, odnosno preuzima algebarski prijepis samog 1D-kromatograma. Algoritam omogućuje cijepanje 1D-kromatograma u funkciji trajanja analize druge dimenzije uz oduzimanje vremena potrebnog za međudimenzijski prijenos analita i stabilizaciju samog kromatografskog sustava. Produkt obrade podataka ovim kodom su 2D-kromatogrami prikazani u poglavlju *Rezultati i rasprava*.

3.2.2. Kromatografske postavke

Kromatografske analize stvarnih uzoraka provedene su pri sljedećim vrijednostima:

Za vakuumski destilat frakcija sirove nafte:

Prva dimenzija :

- protok pokretne faze: 1,3 mL/min
- gradijentni porast tlaka: 100 - 250 bar, porast 1,7 bar/min od 9. minute

Modul prijenosa:

- protok pokretne faze: 2,1 ml/min
- tlak pokretne faze: 0,8 bar
-

Druga dimenzija :

- protok pokretne faze: 1 mL/min
- tlak pokretne faze: 200 bar

Temperatura sustava: 50 °C

Vrijeme trajanja analize: 120 min

Modulacijski period: 30 s

Vrijeme trajanja analize u drugoj dimenziji: 18 s

Za vakuumski destilat frakcija tekućeg ostatka parne destilacije ugljena:

Prva dimenzija :

- protok pokretne faze: 1,3 mL/min
- gradijentni porast tlaka: 100 - 250 bar, porast 2,5 bar/min od 7. minute

Modul prijenosa:

- protok pokretne faze: 2,1 mL/min
- tlak pokretne faze: 0,8 bar

Druga dimenzija :

- protok pokretne faze: 1 mL/min
- tlak pokretne faze: 200 bar

Temperatura sustava: 50 °C

Vrijeme trajanja analize: 120 min

Modulacijski period: 30 s

Vrijeme trajanja analize u drugoj dimenziji: 18 s

Za estere viših masnih kiselina dobivene transesterifikacijom ulja:

Prva dimenzija :

- protok pokretne faze: 1,5 mL/min
- tlak pokretne faze: 150 bar

Modul prijenosa:

- protok pokretne faze: 2,1 mL/min
- tlak pokretne faze: 0,8 bar

Druga dimenzija :

- protok pokretne faze: 1 mL/min
- tlak pokretne faze: 200 bar

Temperatura sustava: 50 °C

Vrijeme trajanja analize: 30 min

Modulacijski period: 30 s

Vrijeme trajanja analize u drugoj dimenziji: 60 s

Transesterifikacija uzorka ulja provedena je kako bi se omogućilo razdvajanje pojedinih viših masnih kiselina iz triglicerida. Korištena je metoda transesterifikacije hladnom metanolnom otopinom kalijeva hidroksida. Kako je uzorak ulja bio kvalitete iznad djevičanske, ova se metoda može primjenjivati i preporučena je u *Pravilniku o metodama analize maslinovog ulja* iz 2013. godine. Tako pripremljeni uzorak moguće je usporediti s uzorkom standarda. Postupak je analogan GC-analizi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Provjera rada kromatografskog sustava

4.1.1. Prva dimenzija

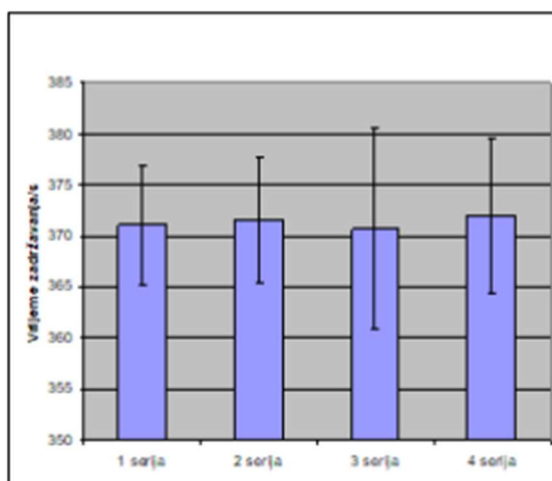
Prvu dimenziju kromatografskog sustava čine dobava pokretne faze, ručni injektor te kromatografska kolona s nepokretnom fazom Capcell PAK C18 ACR – proizvođača Shiseido, dimenzija 250 × 4,6 mm punjenja 5 μm.

Provjera rada prve dimenzije sastojala se od provjere ponovljivosti kvantitativne i kvalitativne analize u prvoj dimenziji. Preciznost je definirana odnosom između brojevnih vrijednosti dvaju ili više ponovljenih mjerenja na istom uzorku ili mjerenja izvršenih na identičan način. Ukoliko metoda pokazuje visoku preciznost, rasap vrijednosti unutar skupine rezultata bit će nizak. Odstupanja pojedinih mjerenja od prosječne vrijednosti pokazuju samo procjenu slučajne pogreške.

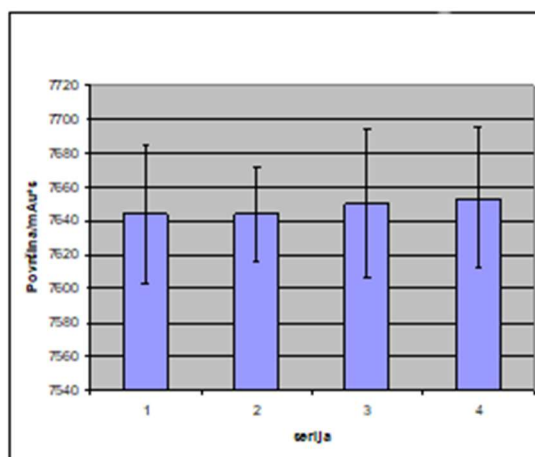
Provedeno je ispitivanje dvaju parametara preciznosti:

- ponovljivost: veličina koja opisuje podudarnost među mjerenjima provedenima na istom uzorku od istog mjeritelja, koji koristi istu instrumentaciju i istu metodu u kratkom vremenskom razdoblju (primjerice unutar istog skupa mjerenja)
- obnovljivost: veličina koja opisuje podudarnost među mjerenjima provedenima na istom uzorku od strane različitih mjeritelja, koji koriste istu metodu u različitim eksperimentalnim uvjetima (primjerice u različitim vremenskim razdobljima ili u različitim laboratorijima).

Uzorak naftalena injektiran je u sustav te je praćen odziv UV-detektora na izlazu prve dimenzije. Radni parametri pokretne faze odgovaraju središnjim vrijednostima matrice eksperimenta. Kvantitativni podatak je površina ispod kromatografske krivulje, a kvalitativni podatak vrijeme zadržavanja analita. Provedena su 4 niza od 25 injektiranja otopine naftalena. Svaki od nizova proveden je unutar jednog dana, dok je razmak među nizovima bio 2 dana.



Slika 23. Prosječno vrijeme zadržavanja naftalena u prvoj dimenziji



Slika 24. Prosječna površina kromatografske krivulje naftalena po analizi u prvoj dimenziji

Rezultati analize u prvoj dimenziji pokazuju visoku ponovljivost i obnovljivost u kvalitativnom i u kvantitativnom dijelu.

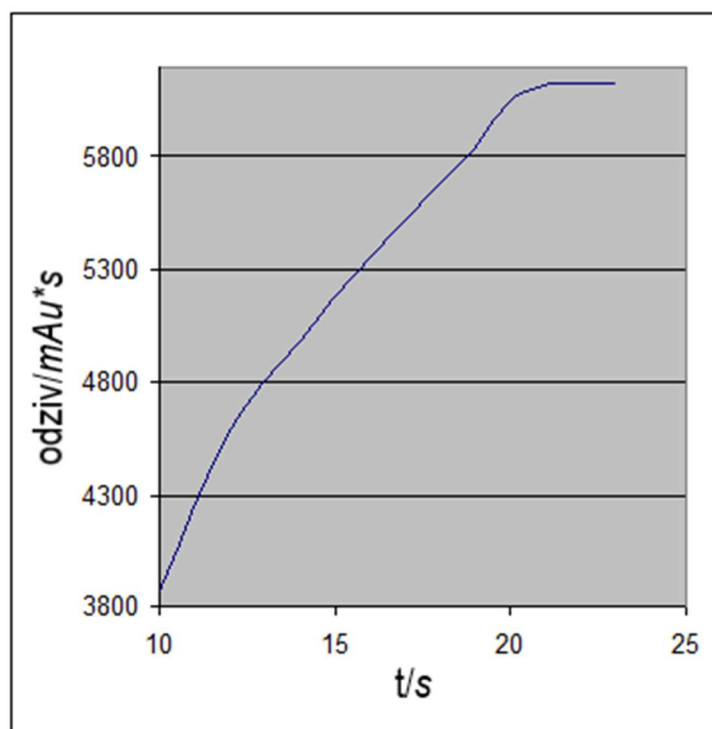
Odstupanja u vremenu zadržavanja, izražena kao standardno odstupanje unutar nizova, iznose od 5,9 s do 9,8 s što su vrijednosti prihvatljive za ovu tehniku. Navedeno je prikazano na Slici 23. Heaton i sur. te Chen i sur. iznose vremena od 5,4 s do 11 s [68, 69]. Standardno odstupanje između prosjeka nizova je izvrsnih 0,6 s što je manje od 1%. Ovi rezultati pokazuju stabilnost raspodjele tvari unutar prve dimenzije.

Odstupanja u površini pod kromatografskom krivuljom, izražena na isti način, iznose od 28,32 do 43,46 mAu*s što je ispod 1%. Time je dokazana nepropusnost sustava s tehničkog stajališta te ponovljivost kvantitativne analize u prvoj dimenziji.

4.1.2. Modul prijenosa analita

Provjera rada modula prijenosa analita primarno se odnosi na provjeru nepropusnosti. Nakon provedene provjere nepropusnosti pristupa se utvrđivanju vremena potrebnog za potpuno punjenje skladišnih petlji. Završni korak čini utvrđivanje najboljeg omjera vremena potrebnoga za prijenosa analita iz skladišne petlje u drugu dimenziju te vremena same analize u drugoj dimenziji. Provjera nepropusnosti izvedena je tlačnom probom oba izlaza iz ventila 1.

Vrijeme potrebno za potpuno punjenje skladišnih petlji analitom utvrđeno je dodatkom 2,5% metanola u tok pokretne faze prve dimenzije. Odziv DAD-detektora u UV-dijelu spektra je veličina koju se prati, a napunjenost petlje postignuta je kod konstantnog odziva detektora. Ovim pristupom odziv je zavisna varijabla vremena uzorkovanja. Detektor je smješten na izlazu iz ventila broj 2. Ova metoda provjere napunjenosti petlji je modifikacija metode koju donose I. François i sur. [94].

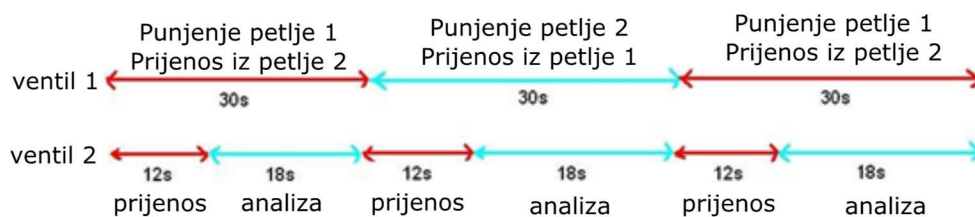


Slika 25. Odziv UV-detektora u funkciji vremena punjenja skladišne petlje

Vrijeme potrebno za punjenje skladišne petlje prve dimenzije je 21 s (Slika 25.) što je u skladu s rezultatima koje su ostvarili Guibal i sur. [92] pri usporedivim uvjetima tlaka i protoka pokretne faze. Ujedno, to je i najkraći ostvarivi period modulacije. Prilikom ovog ispitivanja

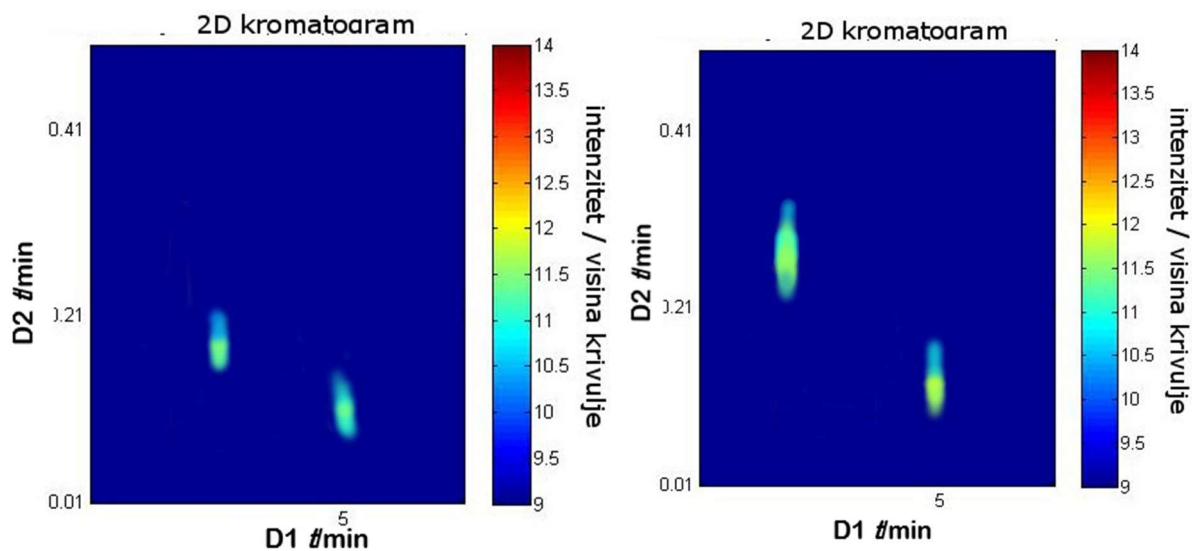
parametri stanja prve pokretne faze prve dimenzije odgovaraju minimalnim vrijednostima protoka i tlaka u matrici eksperimenta (Tablice 3. i 4.).

Vrijeme potrebno za prijenos i analizu u drugoj dimenziji određeno je na sličan način, uz uporabu C20 zasićenog ugljikovodika. Proveden je niz mjerenja uz smanjenje vremena potrebnog za analizu u drugoj dimenziji do pojave «wrap around» učinka. Pojava tog učinka znači nepotpunu eluaciju u drugoj dimenziji i označava donju granicu trajanja analize. Ukupno vrijeme analize u drugoj dimenziji i prijenos analita usklađeno je s vremenom uzorkovanja prve dimenzije te su optimalni odnosi prikazani na grafikonu.



Slika 26. Shematski prikaz odnosa pozicija ventila u sustavu za prijenos analita tijekom analize

Kako je već opisano, dobivene vrijednosti ostvarene su nakon dodatka kompenzacijske kolone. Na Slici 27. prikaz je dvaju kromatograma dobivenih tijekom izrade sustava. Kao analiti korišteni su antracen i dekan.

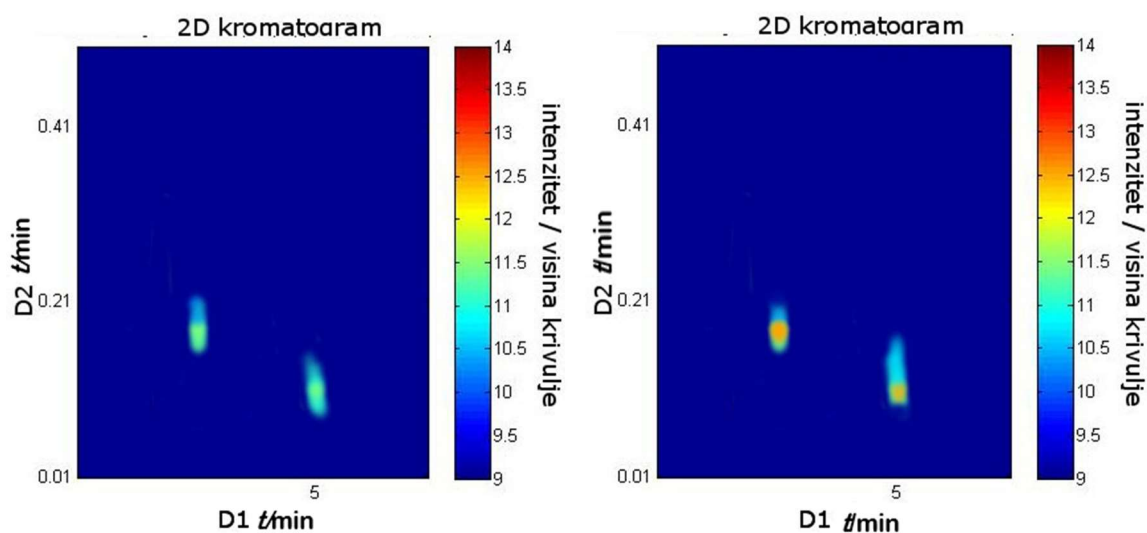


Slika 27. Dva nasumično odabrana kromatograma smjese dekana i antracena analiziranih pri istim uvjetima analize uz zaustavljanje toka druge dimenzije pri prijenosu

Analiti pokazuju potpuno razdvajanje u obje dimenzije, no vidljive su razlike u vremenu zadržavanja u drugoj dimenziji. Za antracen je razlika manja: vrijeme zadržavanja od 6 s u odnosu na 7 s, dok je za dekan je razlika veća: 9 s u odnosu na 14 s. Također postoje jasne

razlike u visini kromatografske krivulje, kao i u širini. Ovaj pristup nije dao zadovoljavajuće rezultate zbog nepostojanja ponovljivosti.

Slika 28. prikazuje dva kromatograma istih tvari analiziranih pri istim uvjetima u dvije dimenzije. Razliku čini korištenje otpornika u toku pokretne faze druge dimenzije tijekom prijenosa analita.



Slika 28. Dva nasumično odabrana kromatograma smjese dekana i antracena analiziranih pri istim uvjetima analize uz korištenje otpornika toku druge dimenzije pri prijenosu

Kromatogrami pokazuju poboljšanje u ponovljivosti vremena zadržavanja. Oblik i visina kromatografskih krivulja nisu stalni pa niti ova postavka nije zadovoljavajuća.

Tek uvođenjem kompenzacijske kolone u sustav dobivamo zadovoljavajuću ponovljivost.

Tablice 5. i 6. prikazuju vrijednosti relativne nesigurnosti mjerenja vremena zadržavanja (t_R), širine kromatografske krivulje (ω) te visine kromatografskog maksimuma (h) u drugoj dimenziji dekana i antracena.

Tablica 5. Vrijednost relativne nesigurnosti prilikom kontrole protoka pokretne faze zaustavljanjem

$N=10$	$R_m(t_R) \%$	$R_m(\omega) \%$	$R_m(h) \%$
Dekan	10,65	14,88	3,18
Antracen	11,15	6,53	3,09

Tablica 6. Vrijednost relativne nesigurnosti prilikom kontrole protoka pokretne faze otpornikom

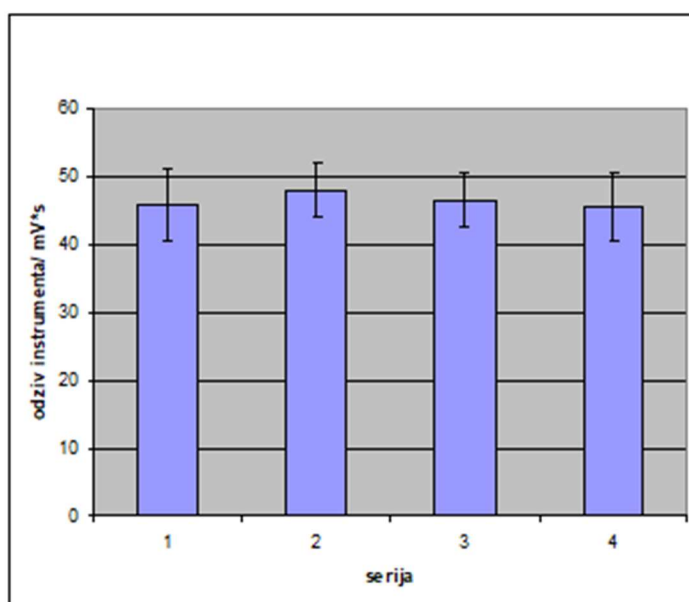
$N=10$	$R_m(t_R) \%$	$R_m(\omega) \%$	$R_m(h) \%$
Dekan	0,98	8,23	4,24
Antraceni	0,83	5,89	4,18

Ove nesigurnosti nisu prihvatljive i više su od opisanih u literaturi vezanoj za sustave GC x GC-analize ugljikovodika koje opisuju Dutriez i sur. [90] kod kojih je $R_m(t_R) \%$ 0,5 za dekan, a 0,37 za antraceni. Venter i sur. [92] opisuju SFC x GC-sustav kod kojeg su $R_m(\omega) \%$ ispod 5% uz napomenu o temperaturi analize iznad 190 °C.

4.1.3. Druga dimenzija

Provjera rada druge dimenzija sastojala se od svakodnevne provjere funkcionalnosti elementa redukcije toka na ulazu u FID-detektor. Mjeren je protok pokretne faze kroz detektor. Ova provjera uobičajena je kod jednodimenzionalnih i dvodimenzionalnih GC-analiza [68, 79]. SF CO₂ u prostoru FID-detektora prelazi u subkrično stanje te je ponašanje eluenta jednako eluentu u GC-u.

Ponovljivost analize provjerena je istim načinom kao i funkcionalnost prve dimenzije te su postignuti zadovoljavajući rezultati. Vrijeme zadržavanja naftalena iznosilo je oko 12 s kod Sincronis silica kolone, dok je kod Sepax silica kolone vrijednost iznosila preko 20 s. To se pokazalo nekompatibilnim s obzirom na brzinu analize kojoj se težilo.



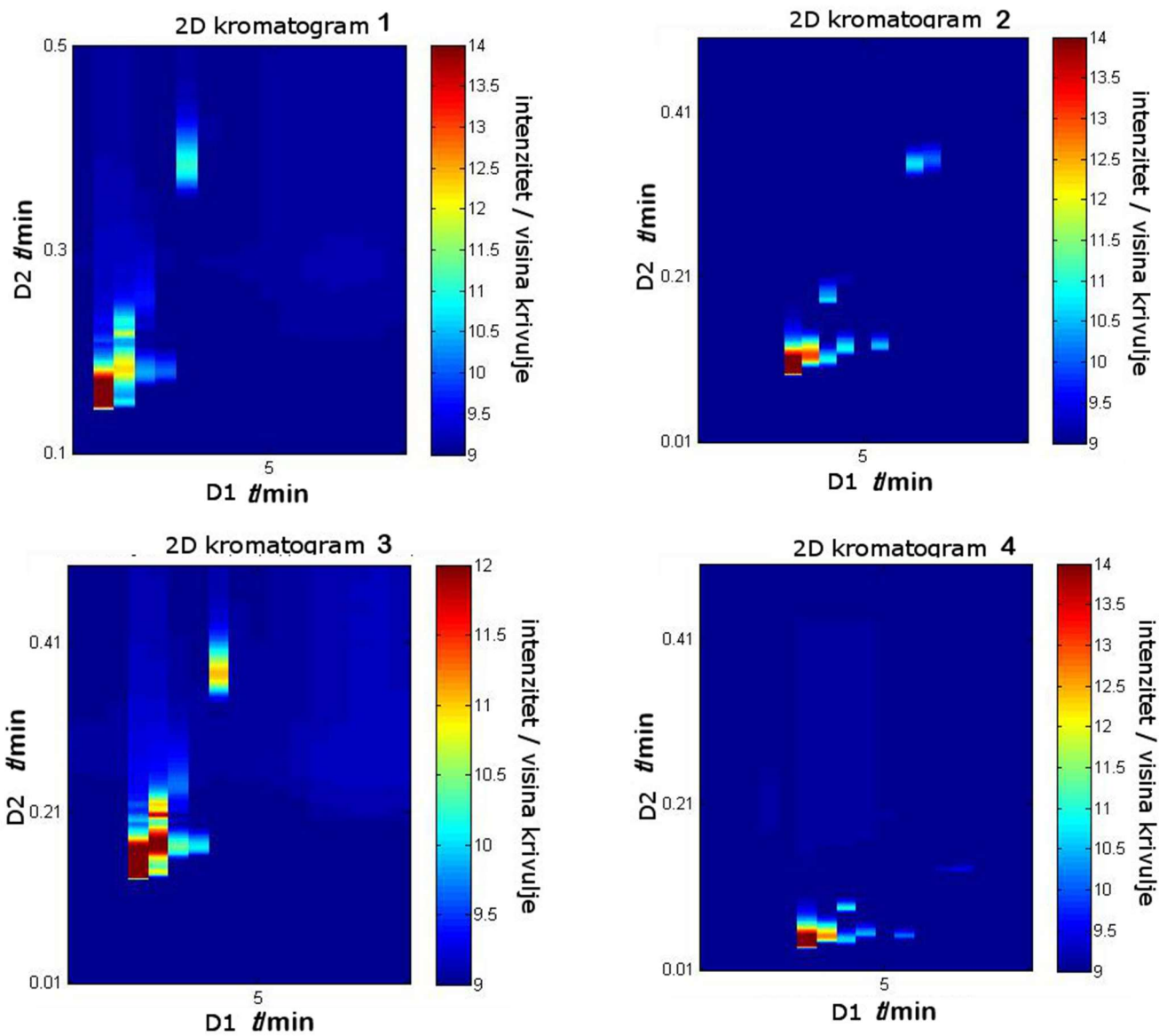
Slika 29. Prosječna površina kromatografske krivulje naftalena po analizi u drugoj dimenziji

Sva mjerenja provedena su pri temperaturi nepokretnih faza i modula za prijenos analita od 50 °C.

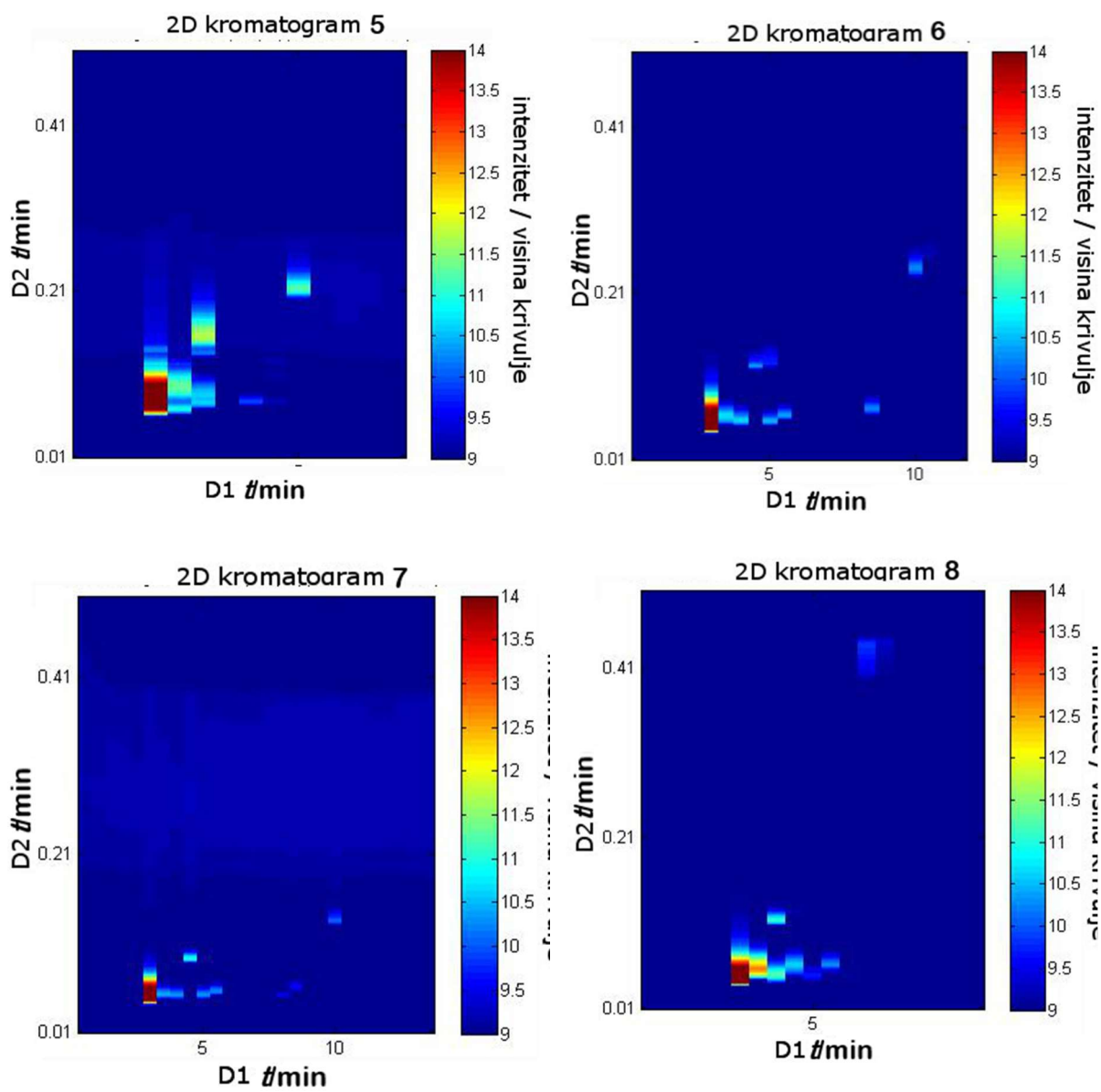
4.2. Utjecaj tlaka i protoka u pojedinim dijelovima sustava na ponašanje analita

4.2.1. Analiza probne smjese lakohlapljivih ugljikovodika

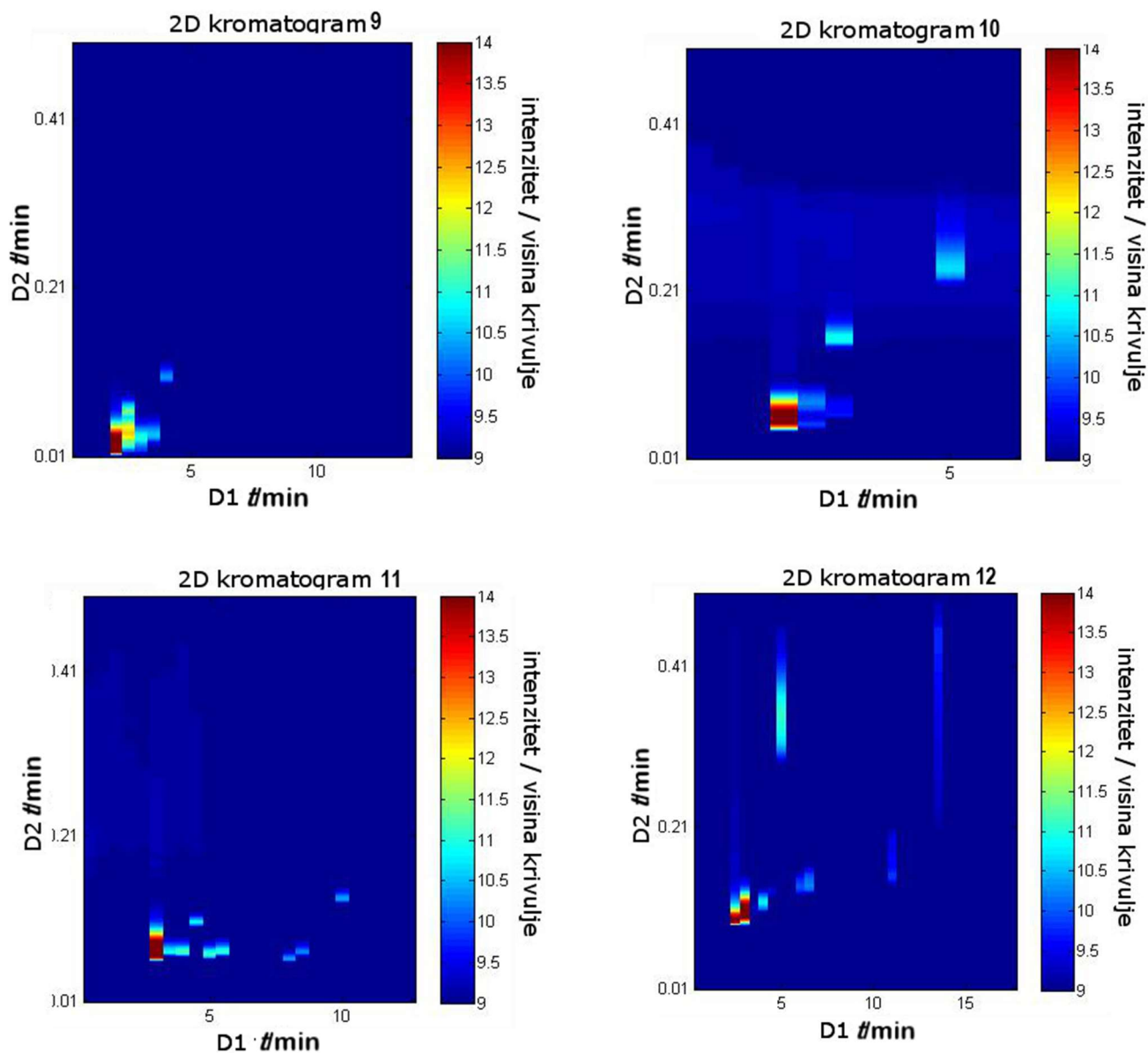
Po provedenim provjerama rada svih faza kromatografskog sustava, pristupilo se analizama probne smjese lakohlapljivih alifatskih ugljikovodika u rasponu duljine lanca od 9 do 20 ugljikovih atoma te naftalena kao predstavnika aromatskih spojeva. Na Slikama 30. do 33. prikazani su 2D-kromatogrami probne smjese dobiveni analizom putem FID-detektora uz 16 različitih postavki sustava prema matrici eksperimenta (Tablice 3. i 4.).



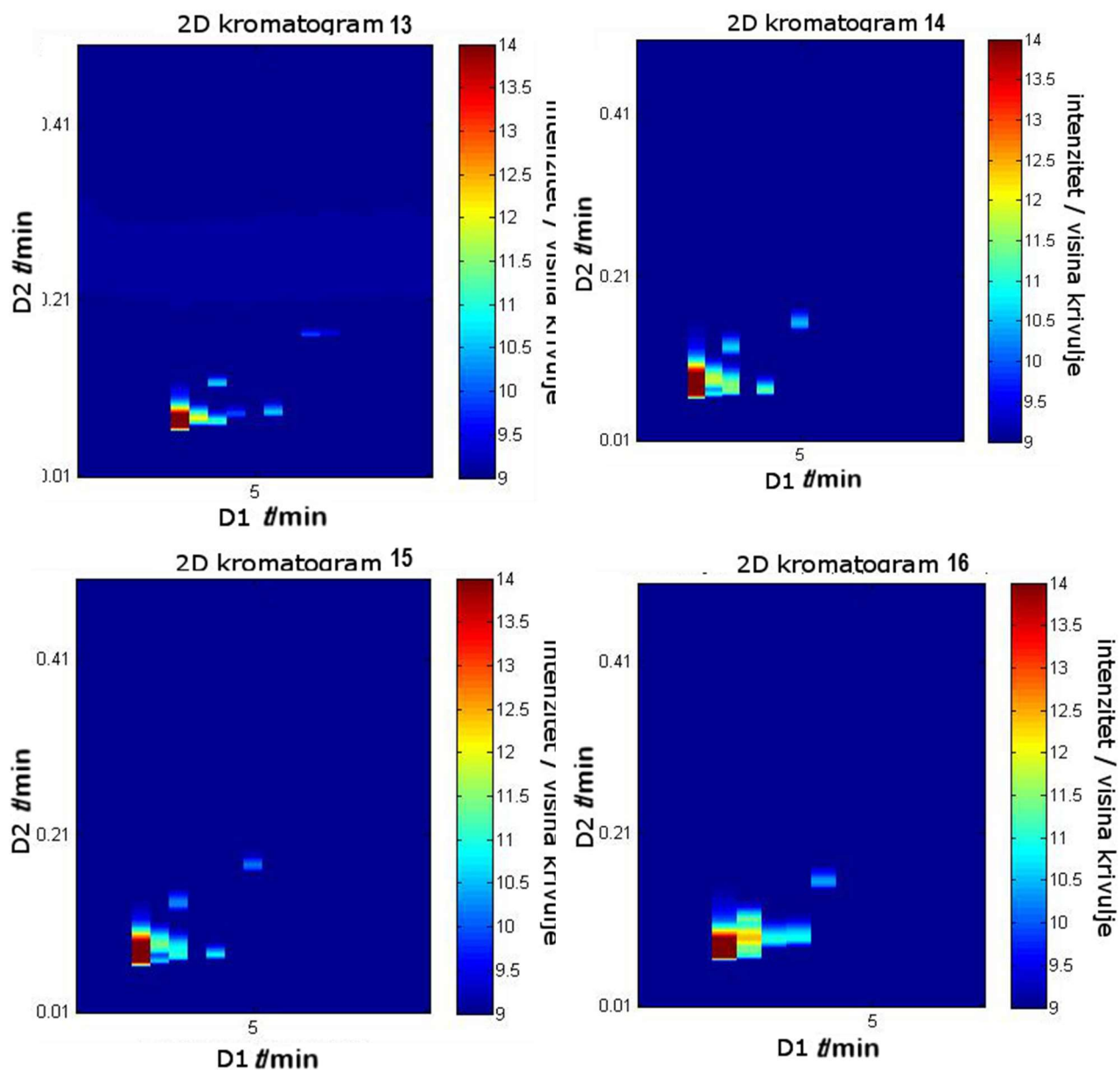
Slika 30. Rezultat analize smjese lakohlapljivih ugljikovodika pri postavkama kromatografskog sustava definiranim u matrici eksperimenta pod 1, 2, 3 i 4



Slika 31. Rezultat analize smjese lakohlapljivih ugljikovodika pri postavkama kromatografskog sustava definiranim u matrici eksperimenta pod 5, 6, 7 i 8



Slika 32. Rezultat analize smjese lakohlapljivih ugljikovodika pri postavkama kromatografskog sustava definiranim u matrici eksperimenta pod 9, 10, 11 i 12



Slika 33. Rezultat analize smjese lakohlapljivih ugljikovodika pri postavkama kromatografskog sustava definiranim i matrici eksperimenta pod 13, 14, 15 i 16

Tijekom provedbe algoritma prijenosa $1D \rightarrow 2D$ integrirana je površina ispod kromatografskih krivulja, izmjerena je širina kromatografske krivulje na 10% visine pika, izmjerena je visina kromatografske krivulje te lokalna simetričnost kromatografske krivulje. Kako je već opisano, integracija se provodi na 1D-kromatogramu, pri najjačem odzivu za određen, izolirani maksimum u drugoj dimenziji. Tako dobiveni podaci iskorišteni su pri određivanju karakteristika kromatografskog sustava kao i pri procjeni utjecaja stanja pokretne faze na pokretljivost analita u sustavu.

Jednostavnim pregledom prikazanih kromatograma vidljiv je utjecaj protoka u prvoj dimenziji na vrijeme trajanja analize. Vrijeme zadržavanja kod analiza odrađenih pri velikom protoku u svim slučajevima je približno 5 minuta, dok je ta vrijednost u slučaju analize pri malom protoku između 8 i 10 minuta.

Rezultati razdvajanja u drugoj dimenziji nisu homogeni te su vidljiva širenja kromatografskih krivulja, uz gubitak visine kod postavki 3 i 12, te kvalitetna razdvajanja kod postavki 4, 16, 17. Navedeno je vidljivo na kromatogramima prikazanim na Slikama 30., 32. i 33. Kako je utjecaj prijenosa analita puno izraženiji u drugoj dimenziji, pristupilo se statističkoj obradi prikupljenih podataka. Korištena matrica analita omogućuje procjenu utjecaja šest parametara, tlaka i protoka, zasebno za svaki od dijelova sustava te njihovih međudjelovanja drugog reda. Prikazana međudjelovanja matematički odgovaraju umnošcima osnovnih šest vrijednosti. Iz razmatranja su izdvojena ona međudjelovanja koja nisu potencijalno ostvariva, bilo zbog same konstrukcije sustava ili su njihovi učinci međusobno istovjetni te se preklapaju.

Prikaz statističke studije međudjelovanja nalazi se u prilogu. Tablica 7. prikazuje praćene parametre.

Tablica 7. Osnovni parametri stanja pokretne faze i promatrana međudjelovanja, odabrani parametri utječu na karakteristike pokretne faze.

F_1	p_1	$p_i * F_1$	P_1	$p_2 * F_2$	p_2	$F_i * F_2$	$p_1 * p_2$
$p_1 * F_i$	$p_i * F_i$	F_2	$p_i * p_2$	$p_1 * F_1$	$F_1 * F_2$	F_i	

4.2.2. Utjecaj parametara sustava na širinu kromatografske krivulje

Širenje kromatografske krivulje izravno utječe na broj teorijskih odsječaka, odnosno na kapacitet kromatografske kolone. Brzina i homogenost uvođenja uzorka u kromatografski sustav čimbenici su koji utječu na širenje kromatografske krivulje. Pri razvoju sustava za prijenos analita upravo je ubrzanje prijenosa iz skladišne petlje do ulaza u kolonu druge dimenzije bio jedan od ciljeva. Cilj je bio ostvariti kvantitativan prijenos analita bez početka same analize. Ukoliko je hipoteza o mogućnosti kompresije analita u stadiju prijenosa točna, tada bi najvažniji faktor trebao biti protok u modulu prijenosa.

Tablica 8. prikazuje koji od parametara imaju statistički važnu ulogu u vrijednosti širine kromatografske krivulje. Pojedinačni utjecaj, kao i utjecaj interakcija za šest praćenih parametara, određen je regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata. Bitnost faktora i

njihovih međudjelovanja određena je pomoću pogreške regresije. Nivo bitnosti od 1% odabran je kako bi u razmatranje bili uzeti samo važni čimbenici.

Tablica 8. Utjecaj parametara stanja pokretne faze na širinu kromatografske krivulje

Parametar	Procjena	Stand. odstup.	t	t grafički prikaz	$P > t $
F_i	-0,0104880	0,000562	-18,67		0,0003*
$F_i * F_2$	0,0070000	0,000562	12,46		0,0011*
F_2	-0,0051500	0,000562	-9,17		0,0027*
$p_i * F_i$	0,0050125	0,000562	8,92		0,0030*
$p_1 * F_1$	0,0039250	0,000562	6,99		0,0060*
$F_1 * F_2$	0,0031250	0,000562	5,56		0,0115
$p_i * p_2$	0,0028625	0,000562	5,10		0,0146
p_1	-0,0025250	0,000562	-4,50		0,0205
$p_2 * F_2$	0,0025250	0,000562	4,50		0,0205
F_1	-0,0022370	0,000562	-3,98		0,0208
$p_1 * p_2$	0,0019000	0,000562	3,38		0,0430
p_i	-0,0016120	0,000562	-2,87		0,0640
$p_1 * F_i$	0,0015000	0,000562	2,67		0,0756
p_2	-0,0013120	0,000562	-2,34		0,1015
$p_i * F_1$	0,0003125	0,000562	0,56		0,6167

Vrijednosti u koloni procjena odgovaraju koeficijentu regresije za utjecaj pridruženog parametra ili međudjelovanja parametara. Standardno odstupanje odnosi se na standardno odstupanje ovog koeficijenta. Vrijednost t je omjer vrijednosti procjene i standardnog odstupanja. Stupac $P > |t|$ je p - vrijednost dobivena provođenjem bilateralnog testa nad t -vrijednošću.

Rezultati ovog testa potvrđuju hipotezu o utjecaju stanja pokretne faze u modulu za prijenos analita na širinu kromatografske krivulje. U procesu međudimenzijskog prijenosa upravo je protok najznačajniji čimbenik. Vrijednost utjecaja protoka ima negativan predznak što kazuje na činjenicu da povećanjem protoka dolazi do smanjenja širine pika kromatografske krivulje. Taj je rezultat u skladu s teorijom uvođenja uzorka u nepokretnu fazu. Sljedeći od parametara koji utječe na širinu pika je protok u drugoj dimenziji. Predznak vrijednosti utjecaja je također negativan, dakle zahtjeva povećanje protoka, no postoji značajno međudjelovanje između protoka u modulu prijenosa i u drugoj dimenziji. Predznak ovog međudjelovanja je

pozitivan, a vrijednost utjecaja na širinu pika je druga po apsolutnoj vrijednosti. Kako je međudjelovanje $F_i * F_2$ važnije od samog F_2 , tok u drugoj fazi mora biti male vrijednosti. Ovi rezultati nedvosmisleno dokazuju ostvarenje kompresije, odnosno suženja kromatografske krivulje.

Tablica 9. Utjecaj parametara stanja pokretne faze na integral kromatografske krivulje

Parametar	Procjena	Stand. odstup.	t	t grafički prikaz	$P > t $
F_i	-36192,180	12792,08	-2,83		0,0662
$p_i * p_2$	20729,925	12792,08	1,62		0,2036
$p_i * F_i$	18671,350	12792,08	1,46		0,2405
$p_i * F_1$	17795,738	12792,08	1,39		0,2584
$p_1 * F_1$	15358,188	12792,08	1,20		0,3161
$F_i * F_2$	14986,075	12792,08	1,17		0,3260
p_i	-11403,260	12792,08	-0,89		0,4384
p_1	-10563,490	12792,08	-0,83		0,4695
$p_2 * F_2$	10552,775	12792,08	0,82		0,4699
F_2	-9619,913	12792,08	-0,75		0,5067
$p_1 * p_2$	8558,600	12792,08	0,67		0,5513
$p_1 * F_i$	4804,750	12792,08	0,38		0,7322
$F_1 * F_2$	4513,3625	12792,08	0,35		0,7476
p_2	-4511,850	12792,08	-0,35		0,7476
F_1	-1930,662	12792,08	-0,15		0,8896

Isti statistički postupak proveden je i nad vrijednostima integrala kromatografske krivulje. Kako je površina krivulje u izravnoj ovisnosti o količini tvari, a sustav je dokazano kvantitativan, nije se očekivao značajan utjecaj parametara pokretne faze na vrijednost površine. Kao što se može vidjeti iz podataka u Tablici 9., promatrani čimbenici ne mijenjaju površinu pod kromatografskom krivuljom, što je još jedan od dokaza primjenjivosti ove vrste statističkog pristupa.

Vrijeme zadržavanja u dvodimenzionalnom kromatografskom sustavu je u prvom redu određeno stanjem u prvoj dimenziji. Konačna je potvrda točnosti konstrukcijskog i statističkog pristupa procjeni utjecaja parametara stanja na kromatografski sustav primjena opisanog modela procjene utjecaja na vrijeme analize (test poznatog ishoda).

Tablica 10. Utjecaj parametara stanja pokretne faze na ukupno vrijeme analize

Parametar	Procjena	Stand. odstup.	<i>t</i>	<i>t</i> grafički prikaz	$P> t $
<i>F1</i>	-1,616875	0,145495	-11,11		0,0016*
<i>p1</i>	-0,764250	0,145495	-5,25		0,0134*
<i>pi*F1</i>	-0,358500	0,145495	-2,46		0,0905
<i>pi</i>	0,351500	0,145495	2,42		0,0945
<i>p2*F2</i>	-0,348250	0,145495	-2,39		0,0964
<i>p2</i>	0,337000	0,145495	2,32		0,1034
<i>Fi*F2</i>	-0,313500	0,145495	-2,15		0,1202
<i>p1*p2</i>	-0,308125	0,145495	-2,12		0,1244
<i>p1*Fi</i>	-0,304625	0,145495	-2,09		0,1273
<i>pi*Fi</i>	-0,299625	0,145495	-2,06		0,1316
<i>F2</i>	0,285875	0,145495	1,96		0,1442
<i>pi*p2</i>	-0,281625	0,145495	-1,94		0,1483
<i>p1*F1</i>	0,278750	0,145495	1,92		0,1513
<i>F1*F2</i>	-0,274125	0,145495	-1,88		0,1561
<i>Fi</i>	0,268250	0,145495	1,84		0,1624

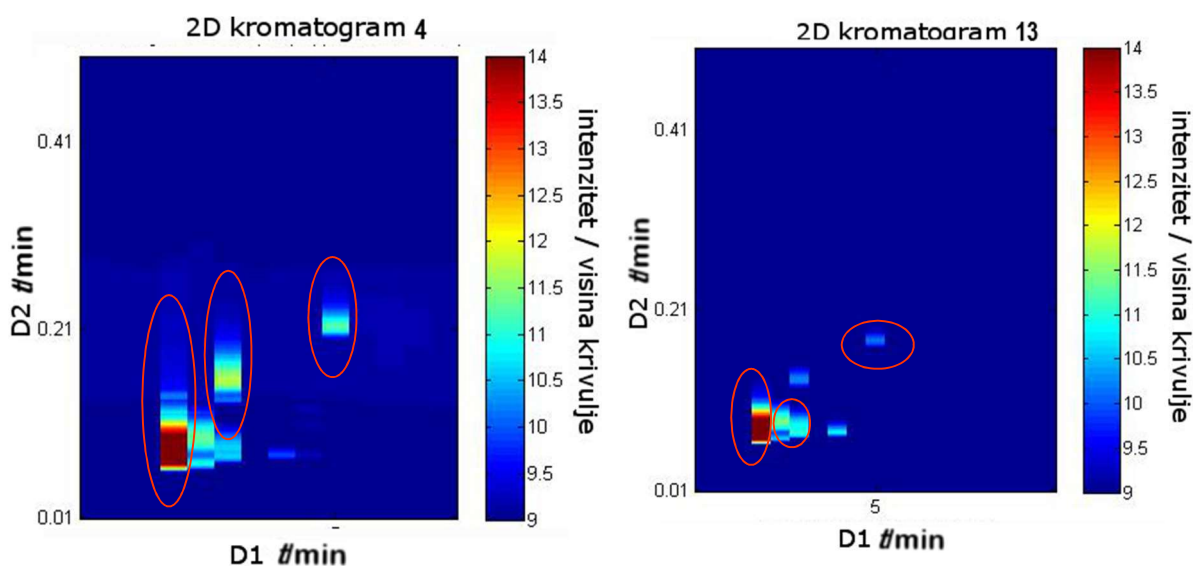
U skladu s predviđanjima, jedini čimbenici koji statistički značajno utječu na vrijeme analize su protok pokretne faze i tlak. Obje vrijednosti utjecaja imaju negativan predznak, odnosno njihovim se porastom vrijeme analize skraćuje. Statistički je potvrđena korelacija vidljiva u 2D-kromatogramima probne smjese.

Visoka vrijednost tlaka povećava gustoću SF CO₂ što izravno utječe na topljivost analita te na mehanizam uvođenja u drugu dimenziju. Prikazani rezultati statističke obrade potvrđuju točnost hipoteze o najboljem mehanizmu međudimenzijskog prijenosa. Velik protok omogućuje brz i potpun prijenos analita te sigurno ispiranje i pripremu skladišnih petlji u ciklusu injektiranja u drugu dimenziju. Također omogućuju gotovo istovremeno uvođenje analita u drugu dimenziju. Nizak tlak SF CO₂ uvjetuje i nisku gustoću te je stoga smanjen kemijski afinitet prema pokretnoj fazi. Ovi uvjeti favoriziraju fluidodinamičku stranu prijenosa tvari, dok je kemijsko međudjelovanje palo u drugi red važnosti tijekom prijenosa tvari.

Sustav modulacije predložen od Hirate i sur. [95] prijenos tvari temelji na dinamičkoj ravnoteži koja se uspostavlja između nepokretne faze skladišne kolone C18 i pokretne faze SF CO₂, i ,kao što je već objašnjeno, ova se ravnoteža pomiče prema sorpcijskom procesu na nepokretnoj fazi parcijalnom dekompresijom pokretne faze. Osim potencijalnog gubitka analita, ovakav pristup otvara i problem brze desorpcije tijekom prijenosa analita. Kako bi se ostvarila

potpuna desorpcija, potrebno je povećati tlak pokretne faze. Time se ostvaruje lakša desorpcija, no nema mogućnosti dovoljno brze prilagodbe parametara pokretne faze uvjetima u drugoj dimenziji. Autori pokušavaju otkloniti ovaj problem produljenim periodom modulacije, no time gube Murphyeu uvjet, a samim time i rezoluciju sustava.

Na slici 34. izdvojena su dva kromatograma probne smjese pri čemu prvi odgovara uvjetima 4 iz matrice eksperimenta (visok tlak i protok u drugoj dimenziji, nizak protok i visok tlak u sustavu prijenosa analita), dok drugi odgovara uvjetima 13 (visok protok u sustavu prijenosa analita, dok su sve ostale vrijednosti u sustavu prijenosa i drugoj dimenziji niske). Postavke analize 4 i 13 imaju jednake uvjete u prvoj dimenziji, stoga su i početna stanja tvari u skladišnim petljama ista.



Slika 34. Usporedba dvaju kromatograma istih sastojaka pri različitim uvjetima prijenosa analita

Pregledom 2D-kromatograma jasno su uočljivi fenomeni širenja i nehomogenog izlaska iz druge dimenzije – nesimetrične linije u drugoj dimenziji. Isti analiti, prikazani unutar crvenih elipsi, pri načelno nepovoljnim uvjetima analize u drugoj dimenziji zbog kvalitetnog prijenosa zadržavaju simetričan, uzak oblik.

Guibal i sur. [97] predlažu sličnu izvedbu prijenosa analita. U skladišnim petljama analiti ostaju čitavo vrijeme solvatizirani, čime nestaje potreba za dugim periodima modulacije te je omogućeno višestruko uzorkovanje eluata prve dimenzije. Iako predloženi sustav zadovoljava Murphyeu kriterij broja uzorkovanja te je dokazana sveobuhvatnost prijenosa analita, jedan izvor dobave pokretne faze nema mogućnost odraditi prijenos analita u najboljim mogućim uvjetima te se dovoljno brzo prilagoditi analizi u drugoj dimenziji.

Guibal i sur. su, koristeći modulacijsko vrijeme od 30 s i protok SF CO₂ od 1.2 mL/min te 200 bara tlaka u drugoj dimenziji, ostvarili rezultate prikazane u Tablici 11.

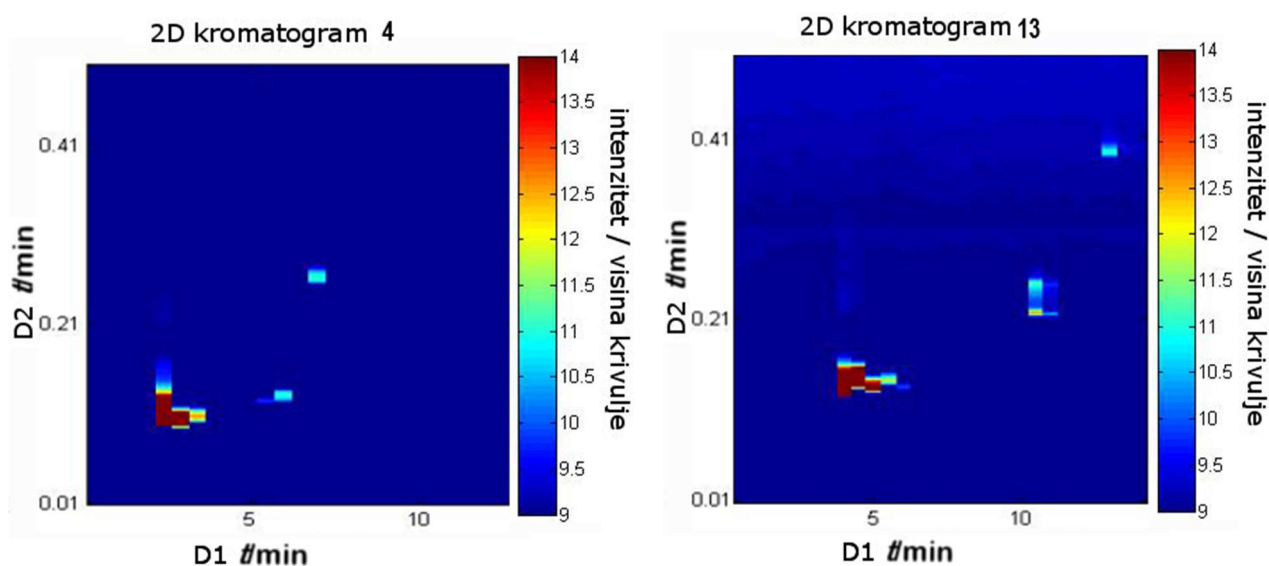
Tablica 11. Utjecaj parametara stanja pokretne faze na ukupno vrijeme analize, gdje je $N(2)$ broj teorijskih odsječaka u drugoj dimenziji, R_{s2D} razlučivost u 2D, a P_c kapacitet kolone.

	$F2$ mL/min	$F1$ mL/min	$N(2)$	R_{s2D}	P_c
Guibal i sur.	1,2	nema podatka	2000	1,08	200
Sustav s nezavisnim modulom za prijenos	0,8	2,1	2700	1,12	280

Autori su ove vrijednosti ostvarili obradom kromatografskih rezultata dobivenih za aromatske ugljikovodike, fluoren, trifenilen i benzantracen, dok su mjerenja na sustavu, koji je novorazvijen, obavljena u odnosu na C20 i C22 ugljikovodike te naftalen. Veća hlapljivost tvari zasigurno je utjecala na nešto kvalitetnije vrijednosti razdvajanja.

4.2.3. Analiza nehlapljivih ugljikovodika

Uz analize probnih smjesa lako i srednje hlapljivih ugljikovodika, analizirana je i probna smjesa nehlapljivih ugljikovodika: fluorantena, benzantracena i eikozena. Pristup ispitivanju je ponovljen, no zbog većeg afiniteta nehlapljivih tvari prema nepokretnoj fazi učinak suženja kromatografske krivulje manje je izražen. Zadržavanje ovih tvari na ulazu u kolonu druge dimenzije je produljeno zbog spomentutog afiniteta. Topljivost analita je manje izražena upravo zbog tog međudjelovanja.



Slika 35. Usporedba dvaju kromatograma nehlapljivih ugljikovodika pri različitim uvjetima prijenosa analita (postavke 4 i 13 matrice eksperimenta)

4.2.4. Parametri kromatografske metode

Budući da je novi sustav osmišljen tijekom ovog rada, bilo je potrebno pristupiti ispitivanju kvalitete njegova rada.

Ispitane su sljedeće vrijednosti:

- i. linearnost odziva
 - ii. preciznost
- ponovljivost
 - obnovljivost

4.2.4.1. Linearnost odziva

Umjerna krivulja može biti korištena pri kvantitativnoj analizi, no izrađena je s ciljem provjere linearnosti odziva detektora sustava. Umjeravanje je provedeno korištenjem smjese dvaju ugljikovodika – dekan i antracena – odabranih zbog različite kemijske strukture.

Kromatografski uvjeti:

Prva dimenzija :

- protok pokretne faze: 1,3 mL/min
- tlak: 130 bar

Modul prijenosa:

- protok pokretne faze: 2,1 mL/min
- tlak pokretne faze: 0,8 bar

Druga dimenzija :

- protok pokretne faze: 1 mL/min
- tlak pokretne faze: 150 bar

Temperatura sustava: 50 °C

Vrijeme trajanja analize: 13 min

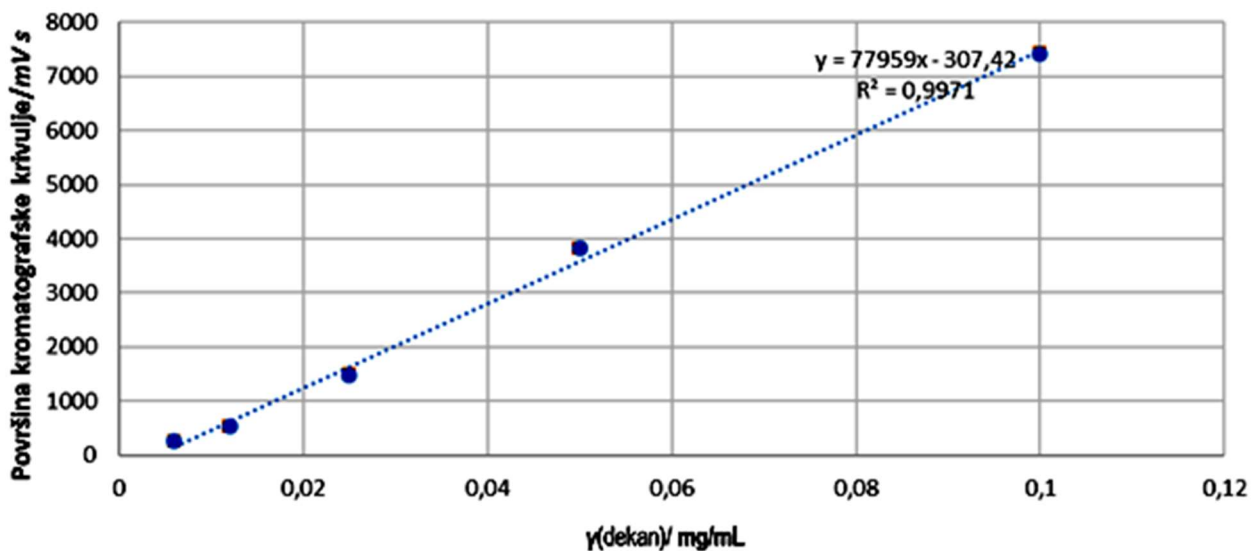
Modulacijski period: 30 s

Vrijeme trajanja analize u drugoj dimenziji: 18 s

Dekan je izabran kao primjer lakšeg linearnog alkana, a antracen kao primjer aromatskog ugljikovodika koji se može detektirati FID – i UV/VIS-detektorom. Navedeni su

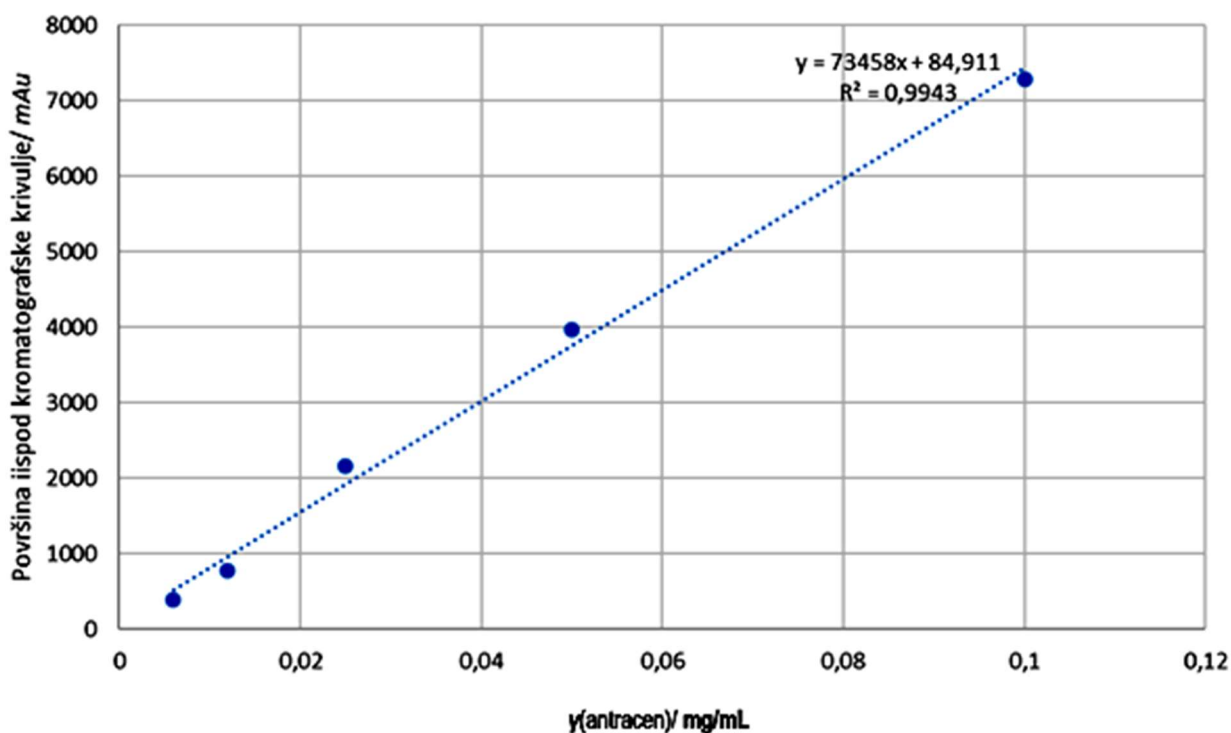
ugljkovodici pripravljeni u pet razina koncentracije u heksanu: 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,012 mg/mL; 0,006 mg/mL. Mjerenja su ponovljena pet puta za svaku razinu koncentracije.

Umjerni je pravac dobiven linearnom regresijom srednjih vrijednosti površina pod kromatografskom krivuljom dobivenom FID-detektorom za dekan. Vrijednost R^2 pokazuje visok stupanj linearnosti odgovora sustava za alkane, što omogućuje kvantitativnu analizu uzoraka.



Slika 36. Umjerni pravac dekana

Antracen je korišten pri provjeri odziva UV/VIS-detektora.



Slika 37. Umjerni pravac antracena

I u ovom slučaju vrijednost R^2 pokazuje zadovoljavajući nivo linearnosti odgovora UV/VIS-detektora te mogućnost kvantifikacije.

4.2.4.2. Provjera ponovljivosti

Ponovljivost metode određena je obradom podataka dobivenih pri izradi umjerne krivulje za dekan i antracen. Ovim se pristupom moglo, uz osnovnu procjenu ponovljivosti koja otkriva instrumentalne pogreške, procijeniti utjecaj koncentracije analita u uzorku na točnost mjerenja. Ponovljivost analiza je potvrđena niskim vrijednostima standardnog odstupanja pojedinačnih mjerenja pri svim koncentracijama standarda. U Tablici 12. prikazane su nesigurnosti mjerenja za svaku od koncentracija, kako dekana tako i antracena, kroz površinu ispod kromatografskih krivulja.

Tablica 12. Nesigurnosti mjerenja pri različitim koncentracijama dekana i antracena

$\gamma(\text{analita})/\text{mg mL}^{-1}$		0,100	0,050	0,025	0,012	0,006
$R_m / \%$	dekan	0,482	0,592	0,729	0,892	1,020
	antracen	0,372	0,487	0,678	0,832	0,986

Nesigurnosti mjerenja su ispod 1%, osim u slučaju niske koncentracije dekana, što je prihvatljivo za dvodimenzijske sustave. Očekivano, nesigurnost je obrnuto proporcionalna koncentraciji što je u skladu s ponašanjem detektora i u klasičnim 1D-sustavima.

Obnovljivost je provjerena korištenjem dekana kao hlapljivijeg elementa. Ukoliko bi došlo do odstupanja, ista bi se lakše odredila. Dva su mjeritelja provela mjerenja tijekom 14 dana, po jedno mjerenje dnevno. Određena je vrijednost standardnog odstupanja koja potvrđuje tezu o stabilnom sustavu pri zadanim čimbenicima. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Vrijednosti površine pri dvije koncentracije te standardno odstupanje rezultata dekanu kroz 14 dana

Prvi tjedan/dani		1	2	3	4	5	6	7
		Površina pod krivuljom/ mV s						
γ (dekan)/ mg	0,100	7430	7438	7440	7432	7442	7439	7439
mL ⁻¹	0,025	1480	1492	1495	1483	1498	1494	1495

Drugi tjedan/dani		1	2	3	4	5	6	7
		Površina pod krivuljom/ mV s						
γ (dekan)/ mg	0,100	7429	7420	7430	7425	7431	7429	7430
mL ⁻¹	0,025	1478	1494	1478	1472	1480	1475	1480

Vrijednost standardnog odstupanja za γ (dekana) = 0,1 mg/mL je 6,321, uz prosječno odstupanje od 0,08% između mjerenja, dok je standardno odstupanje za γ (dekana) = 0,025 mg/mL 8,879 uz odsupanje od 0,5%.

Ove vrijednosti svjedoče o prihvatljivoj obnovljivosti, poboljšanoj u odnosu na preliminarna mjerenja istih čimbenika samo u prvoj dimenziji.

4.3. Analiza realnih uzorka

Završni korak razvoja analitičkog sustava svakako je analiza stvarnih uzoraka. Prethodnici su u ovom području analizirali destilate fosilnih goriva te estere viših masnih kiselina. Heaton i sur. [68] koriste SFC za razdvajanje lakih aromatskih ugljikovodika pri čemu se koriste punjenim kolonama. Bamberg i sur. [84] koriste 2D GC-kromatografski sustav za analizu smjese masnih kiselina i trigliceridnih estera pri čemu postižu kvalitetu analize estera masnih kiselina, no kod slobodnih masnih kiselina kvaliteta opada. Mao i sur. [89] pomoću 2D-sustava analiziraju okolišne matice ugljikovodika i njihovih raspadnih produkata. Autori opisuju sustav 2D- kromatografije spregnut s MS-detektorom. Kvantitativna analiza ostvarena ovim sustavima nije na razini metoda u stalnoj uporabi, ali kvalitativna omogućuje puno dublji uvid u ponašanje otpadnih ugljikovodika u prirodi. Kako autori provode analizu u uvjetima GC-a, temperatura mora biti iznad 180 °C što u novo razvijenom sustavu nije slučaj. Adam i suradnici [93] sprežu SFC i GC-sustav s ciljem analize destilata srednjeg raspona temperatura. Postižu kvalitativne rezultate u skladu s *Murphyevim* kriterijem, no napominju gubitke u kvantifikaciji zbog prijenosa analita iz superkritičnog stanja u plinsku fazu. Do gubitaka dolaza zbog dijelomične dekompresije. Guibal i sur. [97] provode analizu mogućnosti korištenja čistog,

nemodificiranog CO₂ u 2D-SFC-sustavu. Dokazana je funkcionalnost takvog sustava, no gubici onemogućuju prihvatljivu kvantifikaciju. Opisani 2D-SFC-sustav nije u mogućnosti izolirati utjecaj parametara prve dimenzije od parametara druge dimenzije, pri čemu se gubi kvaliteta analize u drugoj dimenziji.

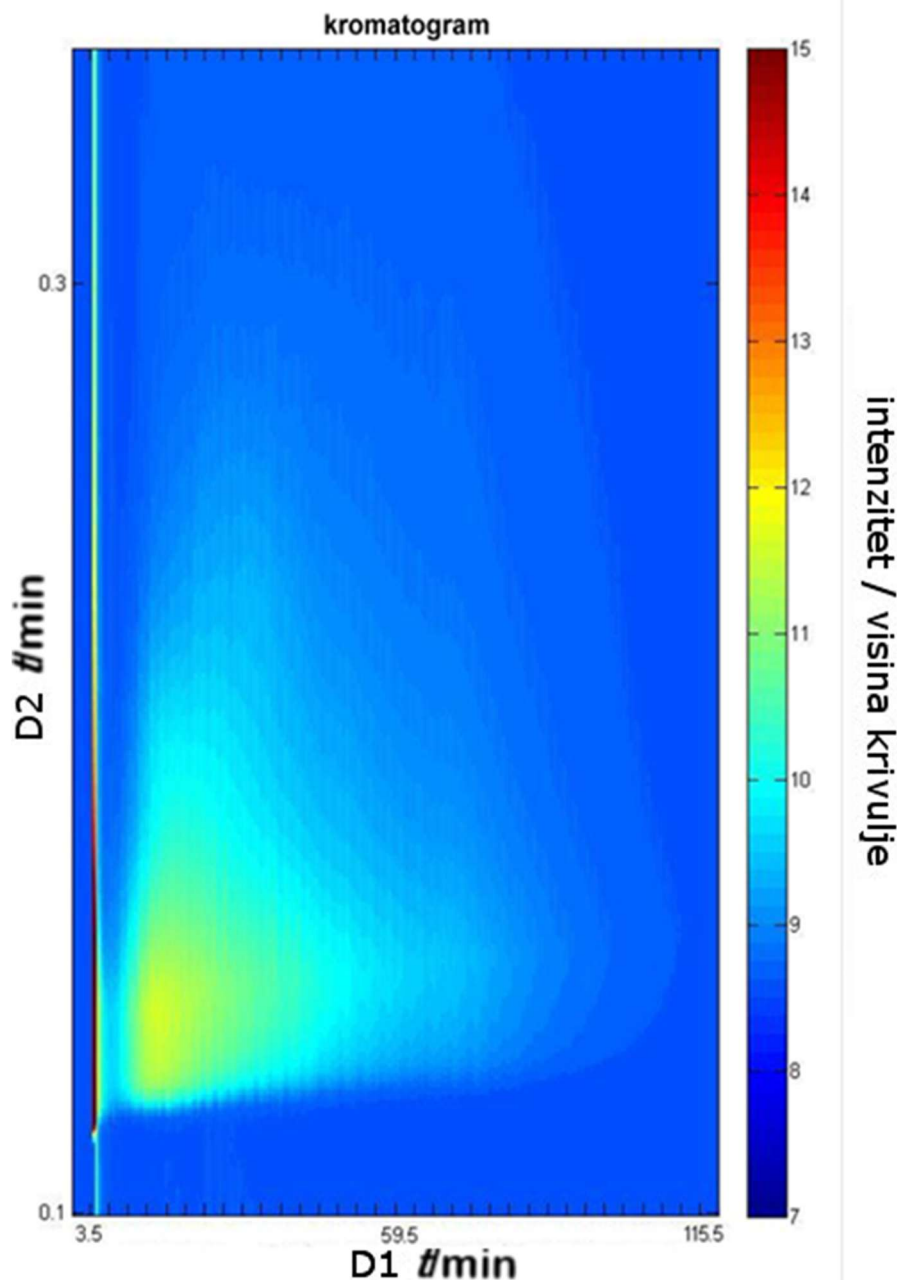
Razvijeni sustav, opremljen modulom za prijenos analita, upotrebljen je za analizu realnih uzoraka odabranih na temelju spomenutih literaturnih navoda, a s ciljem poboljšanja rezultata.

4.3.1. Vakuumski destilat frakcija sirove nafte

Vakuumski destilat frakcija sirove nafte pripremljen je za injektiranje u koncentraciji od 50 mg/mL u heptanu. Analiza je provedena pri uvjetima opisanim u poglavlju 3.2 *Metoda*.

Slika 38. prikazuje kromatogram dobiven pri ovim uvjetima. Sam je uzorak iznimno kompleksan i predstavlja problem u 2D-GC-analizi. Analizom superkritičnim fluidom dobiven je kontinuitet u kromatografskom prikazu te vrlo visok stupanj ortogonalnosti eluiranih sastojaka. Kratko vrijeme zadržavanja teških ugljikovodika u drugoj dimenziji kromatografskog sustava i brz odgovor detektora uz potpuno uravnoteženje manifestira se kroz zadržani intenzitet podražaja detektora kroz obje dimenzije.

Cilj analize ovog uzorka bio je razdvojiti teško hlapljive sastojke pa su i postavke metode prilagođene njihovoj analizi. Posljedično je došlo do gubitka dijela lakohlapljivih analita što se na kromatogramu očitava kroz povećanje intenziteta signala bazne linije u prvih 5 minuta.



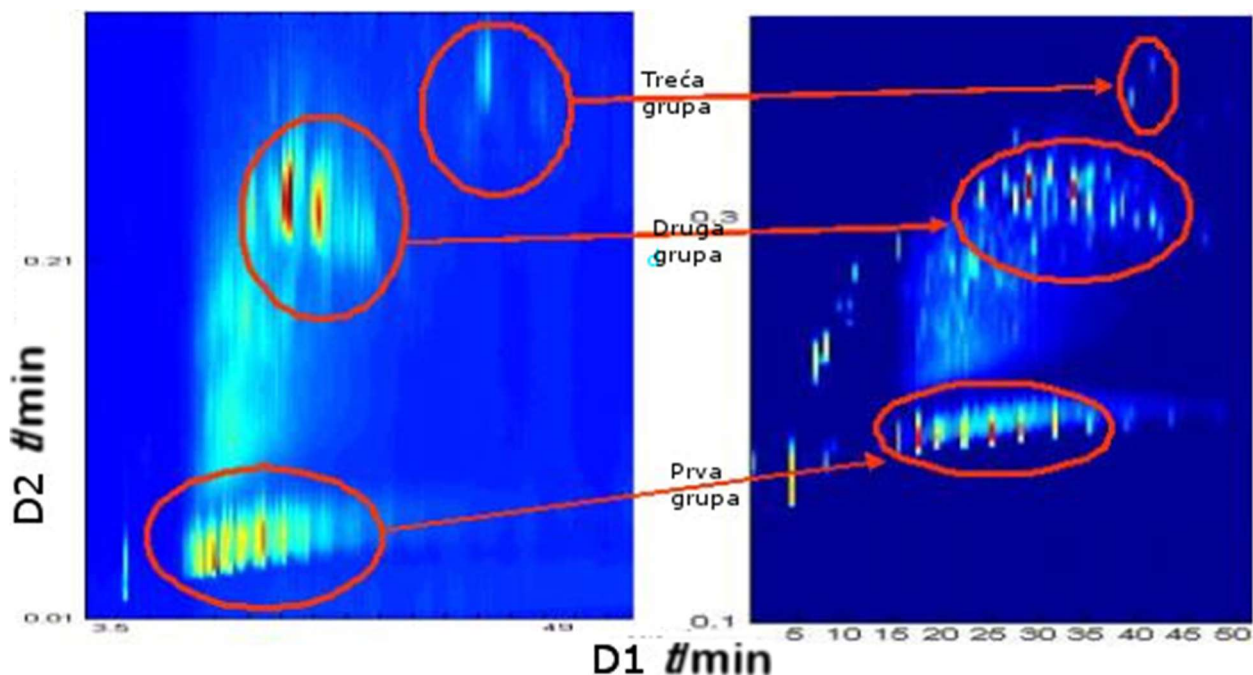
Slika 38. Kromatogram vakuumnog destilata frakcija sirove nafte

4.3.2. Vakuumski destilat frakcija tekućeg ostatka parne destilacije ugljena

Vakuumski destilat tekućeg ostatka parne destilacije ugljena pripremljen je za injektiranje u koncentraciji od 50 mg/mL u ugljikovom disulfidu.

Uvjeti u kromatografskom sustavu su:

Analizirani je uzorak odabran kako bi se omogućila izravna usporedba dobivenih kromatografskih rezultata s rezultatima Guibala i sur. Analizom stvarnog uzorka potvrdili su se rezultati analiza probnih smjesa. Slika 39. prikazuje usporedbu dvaju kromatograma dobivenih analizom, sa i bez nezavisnog modula prijenosa.



Slika 39. Usporedba dviju načina kromatografske analize, lijevi kromatogram dobiven je analizom sustavom bez nezavisne kontrole stanja u modulu prijenosa, dok je desni kromatogram dobiven analizom sustavom s aktivnom kontrolom prijenosa.

Na prikazanim kromatogramima izdvojena su tri područja u kojima je jasno vidljiv učinak sužavanja kromatografske krivulje.

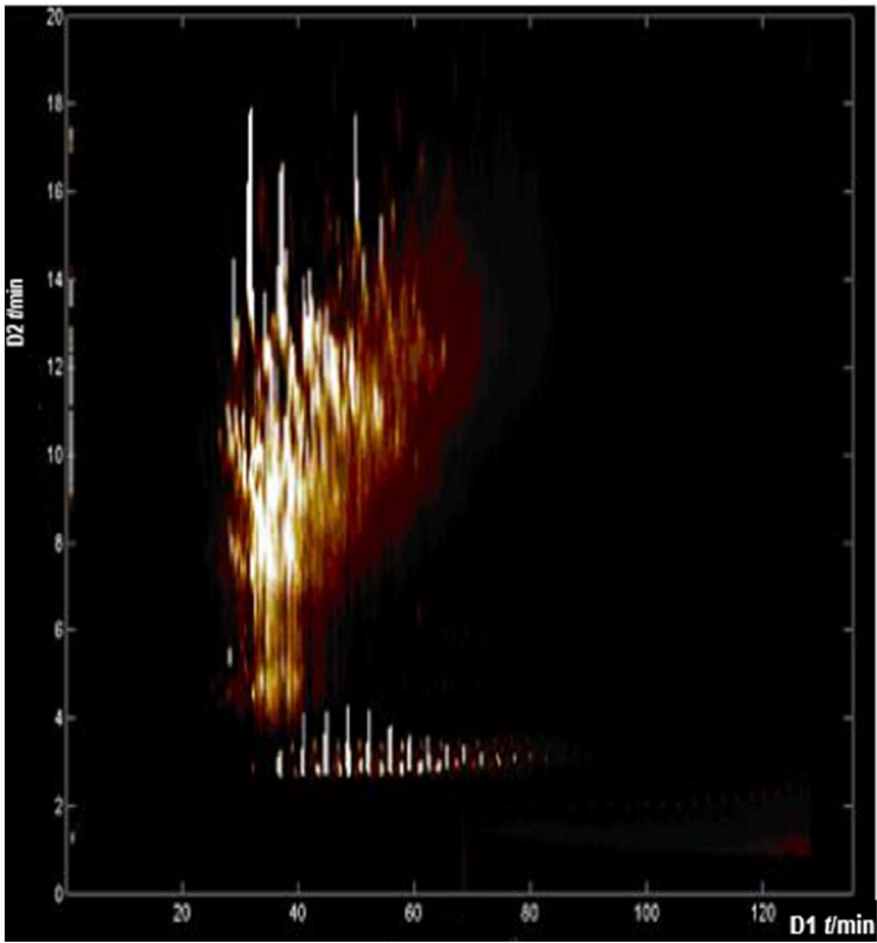
Prva grupa analita, s najkraćim vremenima zadržavanja u drugoj dimenziji, sačinjena je od hlapljivih spojeva niže polarnosti. Smanjena je širina kromatografske krivulje u drugoj dimenziji i povećana visina pika. Prisutno je više izoliranih mrlja tamne boje, za razliku od gotovo kontinuirane široke mrlje bez kontrole prijenosa.

Druga i treća grupa analita pokazuju slično ponašanje.

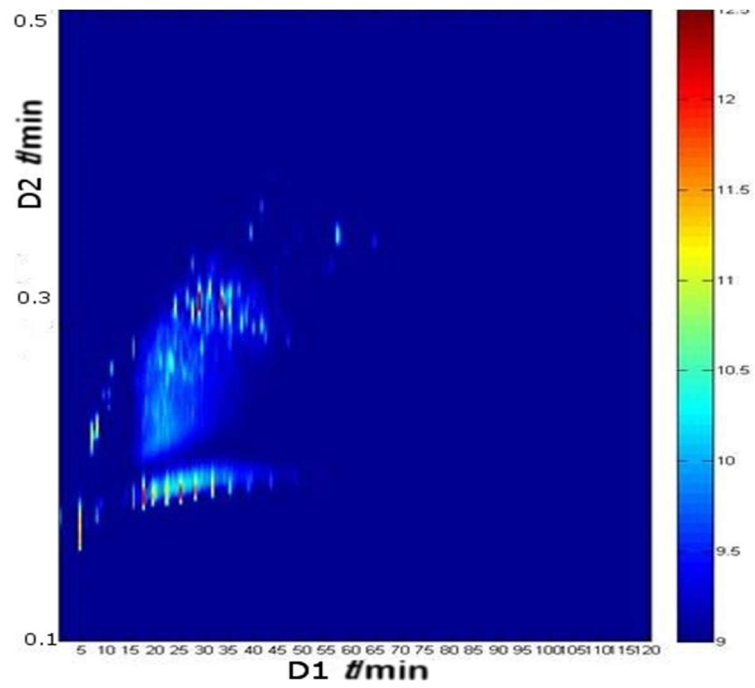
Modificirani sustav zadržava pozitivne karakteristike ortogonalnosti uz bolju razlučivost i veći kromatografski kapacitet nepokretne faze druge dimenzije.

Stupanj ortogonalnosti je vrlo blizu idealnih 90° i iznosi 81° .

Slika 40. prikazuje kromatogram ovog uzorka dobiven 2D-GC-kromatografijom u usporedbi s kromatogramom dobivenim korištenjem predstavljanog sustava 2D-SFC uz aktivnu modulaciju.



A



B

Slika 40. Uzorak analiziran GC x GC- kromatografskim sustavom - A, uzorak analiziran razvijenim sustavom -

B

Ukupno vrijeme analize pri korištenju 2D-SFC-sustava iznosi 65 min, dok je kod 2D-GC-a 82 min.

Stupanj ortogonalnosti dimenzija je usporediv, vidljiva je kompresija kromatografskih krivulja u drugoj dimenziji, uz jasno izraženo grupiranje analita.

Vrijeme analize u drugoj dimenziji je isto i iznosi 18 s.

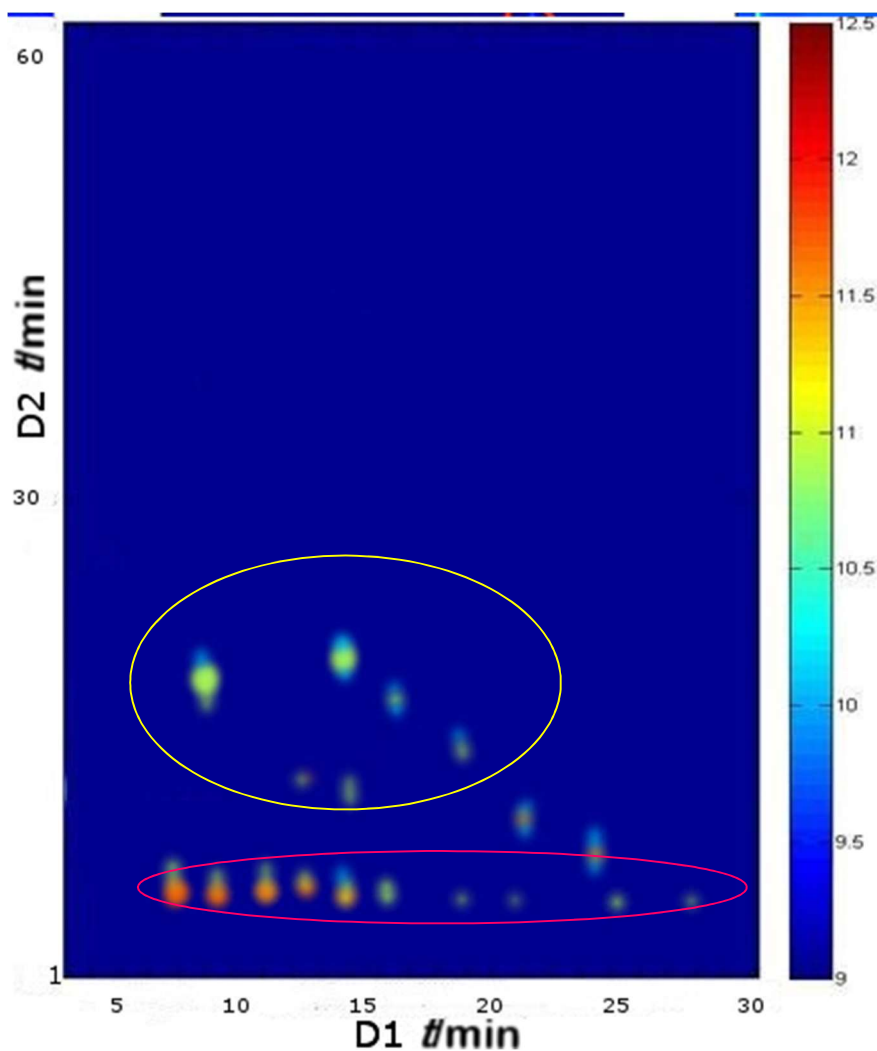
Bitna razlika je u temperaturi pri kojoj se odvija analiza. Kod 2D-GC-sustava temperatura je u svakom trenutku temperaturnog programa viša od 195 °C, dok je kod SFC-sustava 50 °C izotermalno. Niža temperatura dopušta analizu termolabilnih uzoraka.

Usporedba rezultata analiza dobivenih tehnikom koja se rutinski koristi (2D-GC) u petrokemijskoj i naftnoj industriji s rezultatima dobivenim 2D-analizom SFC-sustavom potvrđuju funkcionalnost tehničkog dijela razvijenog sustava i primijenjene metode analize.

4.3.3. Analiza uzorka maslinovog ulja

Treći uzorak analiziran razvijenim sustavom bio je uzorak maslinovog ulja. Uljne matice sadrže većinom trigliceride i standardno se analiziraju GC-kromatografijom čiji su rezultati kvalitativni i kvantitativni. Standardi koji se koriste pri GC-analizi sadrže smjesu estera viših masnih kiselina. Kvantitativna analiza je relativna i normalizirana na ukupni sadržaj metilnih estera. Cilj našeg pokušaja analize bio je utvrditi mogućnost razdvajanja metilnih estera triglicerida, postupak usporediv s postojećim GC-analizama, te pokušati izravno injektirati uzorak maslinovog ulja koji je razrijeđen u heksanu do masene koncentracije 10 mg/mL. Uzorci te vrste nisu do sada bili analizirani višedimenzijском analizom superkritičnim fluidom.

Slika 41. prikazuje kromatogram analize standarda metilnih estera viših masnih kiselina.

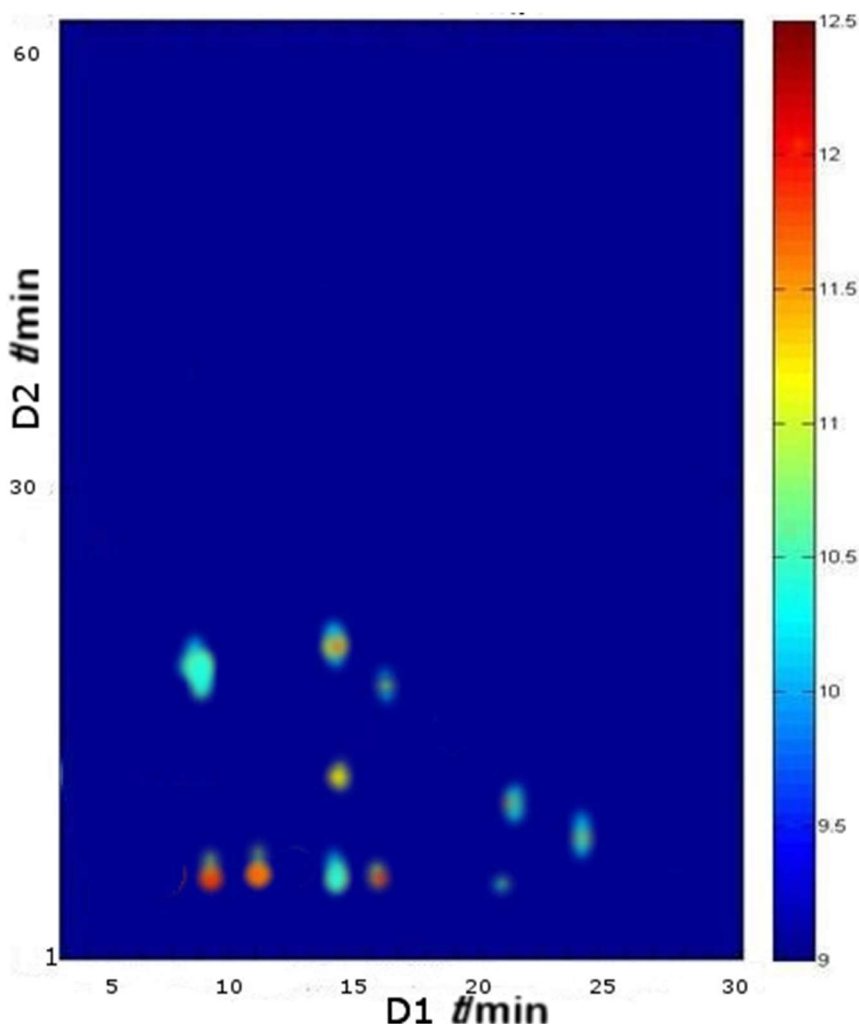


Slika 41. Kromatogram analize standarda F.A.M.E,

Vidljivo je razdvajanje u prvoj dimenziji, što je i očekivano. Metilni esteri zasićenih masnih kiselina razdvojeni su u prvoj dimenziji, dok su im vremena zadržavanja u drugoj dimenziji usporediva te ih lako grupiramo – crveni obrub na kromatogramu. Vidljivo je i razdvajanje metilnih estera koji iz prve dimenzije koeluiraju u drugoj dimenziji. Standard sadrži estere zasićenih i nezasićenih kiselina. Na kromatogramu vidimo signale sa sličnim vremenima zadržavanja u prvoj dimenziji, dok su po drugoj dimenziji razdvojeni. Zaključuje se kako je i ovdje došlo do razdvajanja temeljenog na razlici u polarnosti između zasićenih i nezasićenih viših masnih kiselina. Na kromatogramu nezasićeni metilni esteri nalaze se unutar žutog kruga.

Nakon standarda analiziran je uzorak dobiven transesterifikacijom triglicerida iz realnog uzorka ulja. Sama transesterifikacija ulja provedena je prema literaturnoj metodi [98]. Analizi lipidnih komponenti u GC-u prethodi priprava uzorka transesterifikacijom, a s ciljem povećanja hlapljivosti masnokiselinskog dijela. Tako dobiveni uzorak može biti korišten u GC-analizi bez

bojazni od trajnog oštećenja kolone i odgovara upotrebljenom standardu. Korišten je s ciljem usporedbe razvijenog sustava s GC-sustavima. Dobiveni kromatogram prikazan je na Slici 42.

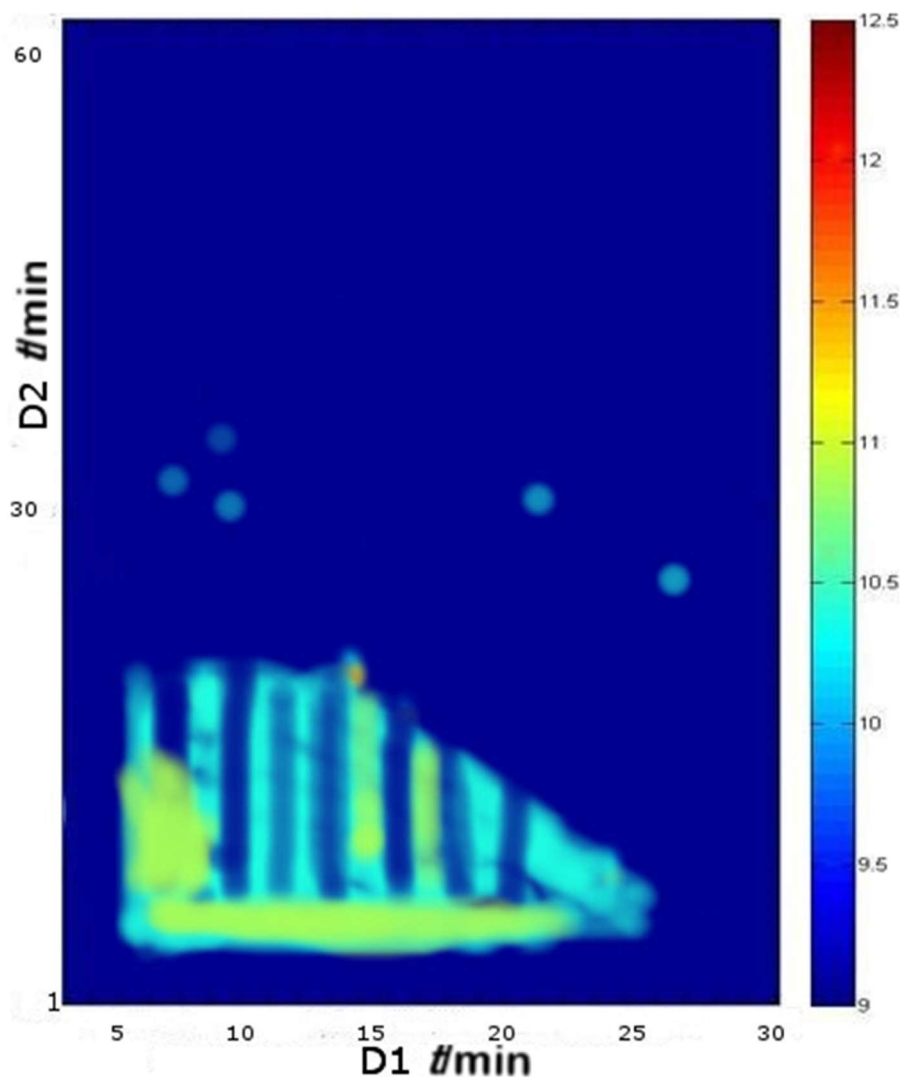


Slika 42. Kromatogram analize realnog uzorka maslinovog ulja

Detekcijom signala pokazana je mogućnost korištenja 2D-sustava kromatografije superkritičnim CO₂ u analizi maslinovog ulja. Usporedbom ovog kromatograma s kromatogramom dobivenim analizom standarda možemo vidjeti poklapanje vremena zadržavanja u prvoj i drugoj dimenziji. Razlika u zabilježenim intenzitetima je očekivana i proizlazi iz razlike udjela pojedinih masnih kiselina u uzorku u odnosu na standard. Rezultat ove analize ulja bio je usporediv s uzorcima analiziranim putem GC-a [99]. Kako cilj ovog istraživanja nije bio razvoj analitičke metode za maslinovo ulje već razvoj tehničkog aspekta uređaja, nismo nastavili s optimizacijom metode.

Posljednji stvarni uzorak podvrgnut analizi bilo je razrijeđeno maslinovo ulje. Trigliceridi u maslinovom ulju usporedive su polarnosti i molarne mase s teškim

ugljikovodicima u matici destilata ugljena koja je uspješno razdvojena. Kako su u literaturi pronađeni navodi [100] koji opisuju analizu α -tokoferola i β -karotena ekstrahiranih iz uljne maticе, pokušana je analiza neobrađenog maslinovog ulja. Cilj je bio odrediti mogućnost razvoja dodatno pojednostavljene analize prehrambenog proizvoda. Uklanjanje koraka pripreme ekstrakcije doprinijelo bi tome. Postavke su kromatografske analize zadržane.



Slika 43. Kromatogram analize razrijeđenog sirovog uzorka maslinovog ulja

Slika 43. prikaz je dobivenog kromatograma. Vidljiv je nedostatak razdvajanja u prvoj dimenziji gotovo do 21 minute. Zanimljivo je primjetiti jasno izdvojene pikove pri vremenima zadržavanja između 7 i 9 minuta u prvoj dimenziji i 30 do 35 s u drugoj dimenziji. Ovi signali pripadaju manje zastupljenim, ali zasigurno polarnim sastojcima maslinovog ulja. Dodatnom modifikacijom razvijenog sustava, dodatkom SFC-ekstraktora prije samog uvođenja uzorka u prvu dimenziju, ovo bi se razdvajanje poboljšalo. Nažalost, rezultat dobiven izravnom analizom ulja nije dao zadovoljavajuće rezultate, niti u ovoj preliminarnoj fazi.

Analiza realnih uzoraka pokazala je neke od mogućnosti primjene ovako upravljanih sustava u naftnoj i prehrambenoj industriji. Uspoređujući rezultate dobivene nekorigiranim sustavima s rezultatima konstruiranog sustava vidimo napredak.

5. ZAKLJUČAK

Kako bi razdvajanja analita sve složenijih matrica bila što potpunija i kvalitetnija, nakon prilagodbi jednodimenzijskih HPLC-kromatografskih sustava radu u superkritičnoj fazi, razvijeni su sustavi dvodimenzijske analize. Jedan od ključnih problema pri tome pokazao se prijenos analita između dviju kromatografskih dimenzija.

Razvijeni sustavi opisani u literaturi nisu u mogućnosti neovisno kontrolirati stanje tlaka i protok u tri dijela 2D-sustava: prvoj dimenziji, modulu prijenosa i drugoj dimenziji. Budući da način prijenosa analita izrazito utječe na kvalitetu kromatografske analize, pristupilo se izradi novog, dosad nepredloženog, modula za prijenos analita s mogućnošću nezavisne kontrole vrijednosti tlaka i protoka pokretne kromatografske faze u svakom od dijelova instrumenta.

Provedena su ispitivanja funkcionalnosti tako dobivenog sustava, a s ciljem provjere upotrebljivosti u analizi nepolarnih i slabopolarnih tvari, u prvom redu ugljikovodika iz naftnih matrica.

Dobiveni kromatogrami kvalitetniji su od dosada prikazanih u dostupnoj literaturi. Dobivene kromatografske krivulje su simetričnije, a kromatografski su pikovi bolje razdvojeni. Ponovljivost kvalitativne i kvantitativne informacije za probne smjese potvrdila je stabilnost razvijenog sustava.

Ispitivanja utjecaja vrijednosti tlaka i protoka u modulu prijenosa na oblik kromatografske krivulje pokazala su razlike u formi kromatograma kad se prijenos obavlja putem pokretne faze druge dimenzije. Najčešće dolazi do gubitka oblika pika širenjem. Također dolazi do smanjenja razlučivosti u drugoj dimenziji što je posljedica prevelikog protoka. Veliki protok u nekontroliranom prijenosu potreban je zbog brzog uvođenja uzorka u drugu dimenziju. Druga dimenzija pak zahtijeva nizak protok. Razvijeni modul rješava taj problem.

Hipoteza o povećanju kvalitete rezultata analize putem nezavisnog upravljanja međudimenzijskom prijenosom pokazala se točnom.

Rezultati analize složenih uzoraka, vakuumskog destilata sirove nafte i tekućeg ostatka parnog destilata ugljena, dokaz su primjenjivosti sustava u područjima naftne industrije. Rezultati ostvareni korištenjem razvijenog sustava pri nižim temperaturama usporedivi su s rezultatima opisanim u literaturi, a ostvarenim pri visokim temperaturama.

Analiza uzorka masnih kiselina dala je rezultate usporedive s rezultatima ostvarenim pomoću plinske kromatografije.

Usporedba rezultata analize stvarnih uzoraka dobivenih razvijenim sustavom s rezultatima analize istih uzoraka pomoću već predstavljenih tehnika kromatografije fluidima u superkritičnoj fazi pokazala je znatno suženje kromatografske krivulje te povećanje efikasnosti kromatografskog sustava. U usporedbi s dvodimenzijском plinskom kromatografijom, kvaliteta analitičkog podatka je zadržana uz znatno nižu temperaturu analize.

Prikazani rezultati dokaz su utjecaja kontroliranog međudimenzijскоg prijenosa analita na kvalitetu analize ugljikovim(IV) oksidom u superkritičnim uvjetima. Razvijeni sustav može biti spregnut i s MS-detektorima te mu se na taj način može povećati analitička moć.

6. LITERATURA

- 1 <https://goldbook.iupac.org/html/C/C01075.html> , pristup 6.5.2015.
- 2 A. J. P. Martin i R. L. M. Synge, Separation of the higher monoamino-acids by counter-current liquid-liquid extraction: the amino-acid composition of wool, *Biochemical Journal* **35** (1941) 91–121.
- 3 K. Klesper, A. H. Corwin, i D. A. Turner, High pressure gas chromatography above critical temperatures, *J. Org. Chem* **27** (1962) 700–706.
- 4 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, i J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 2009.str. 27–58.
- 5 D. A. Skoog i J. J. Leary, *Chimica Analitica Strumentale*, EdiSES, Napoli, 2000.
- 6 www.epa.gov/ttnemc01/promgate/m-107.pdf, Vol. 2015., pristup 3.4.2015.
- 7 W.-C. Lai i C. Song, Temperature-Programmed Retention Indices for GC and GC-MS Analysis of Coal- and Petroleum-derived Liquid Fuels, *Fuel* **74** (1995) 1436–1451.
- 8 L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, i B. Vieth, Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC- MS or LC-MS/MS?, *Mass Spectrom Rev* **25** (2006) 838–865.
- 9 J. G. Kramer, N. Sehat, M. R. Dugan, M. Mossoba, M. Yurawecz, J. G. Roach, K. Eulitz, J. Aalhus, A. Schaefer, i Y. Ku, Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion – high – performance liquid chromatography, *Lipids* **33** (1998) 549–558.
- 10 G. B. Hunsinger, C.A. Tipple, L.A. Stern, Gaseous byproducts from high-temperature thermal conversion elemental analysis of nitrogen and sulfur bearing compounds with considerations for $\delta^{2}\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ analyses., *Rapid Commun Mass Spectrom.* **30**(27) (2013) 1649–1659.
- 11 D. J. Hart, K. J. Scott, Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK, *Food Chem* **54** (1995) 101–111.

- 12 M. D. Mathiesen, A. J. Lubeck, Improving Accuracy in the Determination of Aromatics in Gasoline by Gas Chromatography—Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* **36** (1998) 449–456.
- 13 J. Valinger, *Radni priručnik - održavanje*, DINA petrokemija, Omišalj, 1999
- 14 T. H. M. Noij i M. M. E. van der Kooij, Automated analysis of polar pesticides in water by on-line solid phase extraction and gas chromatography using the co-solvent effect, *J. High Res. Chrom.* **18** (1995) 535–539.
- 15 R. Sanchez, A. Vazquez, J. C. Andini i J. Villan, Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption–desorption interface, *J. Chromatogr. A* **1029** (2004) 167–172.
- 16 A. Salemi, S. I. Lacorte, H. Bagheri i D. Barcela, Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line purge-and-trap–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1136** (2006) 170–175.
- 17 B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer i C. M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS *Anal. Chem.* **75** (2003) 3019–3030.
- 18 V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova i M. A. Sogorb, A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures, *J. Chromatogr. B* **847** (2007) 88–94.
- 19 E. Yashima, Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *J. Chromatogr. A* **906** (2001) 105–125.
- 20 G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1168** (2007) 101–168.
- 21 E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, High Pressure Gas Chromatography above Critical Temperatures, *J. Org. Chem.* **27** (1962) 700–718.
- 22 J. C. Giddings, W. A. Manwaring i M. N. Myers, Turbulent-gas chromatography, *Science* **154** (1966) 146–148.

- 23 J. C. Giddings, M. N. Myers, L. M. McLaren i R. A. Keller, High pressure gas chromatography of nonvolatile species. Compressed gas is used to cause migration of intractable solutes, *Science* **162** (1968) 67–73.
- 24 M. N. Myers i J. C. Giddings, Ultra-High-Pressure Gas Chromatography in Micro Columns to 2000 Atmospheres, *Sep. Sci.* **1** (1966) 761–776.
- 25 S. T. Sie i G. W. A. Rijnders, High-Pressure Gas Chromatography and Chromatography with Supercritical Fluids. III. Fluid-Liquid Chromatography, *Sep. Sci.* **2** (1967) 729–753.
- 26 P. A. Mourier, E. Eliot, M. H. Caude i R. H. Rosset, Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers *Anal. Chem.* **57** (1985) 2819–2823.
- 27 M. Novotny, W. Bertsch i A. Zlatkis, Temperature and pressure effects in supercritical fluid , *J. Chromatogr. Sci.* **61** (1971) 17–28.
- 28 T. H. Gouw i R. E. Jentoft, Supercritical Fluid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **68** (1972) 303–323.
- 29 P. J. Schoenmakers i F. C. C. J. G. Verhoeven, Effect of pressure on retention in supercritical-fluid chromatography with packed columns, *J. Chromatogr. A* **352** (1986) 315–328.
- 30 C. Bouigeon, D. Thiebaut i M. Caude, Long Packed Column Supercritical Fluid Chromatography: Influence of Pressure Drop on Apparent Efficiency, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3622–3630.
- 31 T. A. Berger, Density of methanol-carbon dioxide mixtures at three temperatures: Comparison with vapor liquid equilibria measurements and results obtained from chromatography, *J. Res. Chrom.* **14** (1991) 312–316.
- 32 T. A. Berger i L. M. Blumberg, Efficiency losses caused by gradients in solute velocity in packed column supercritical fluid chromatography, *Chromatographia* **38** (1994) 5–11.
- 33 R. M'Hamdi, D. Thiébaud, M. Caude, E. Robert, i C. Gri, Packed Column SFC of Gas Oils. Part II: Experimental Design Optimization of the Group-Type Analysis using CO₂-SF₆ as the Mobile Phase, *J. Res. Chrom.* **21** (1998) 94–102.

- 34 S. A. Korhammer i A. Bernreuther, Hyphenation of high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFC, GPC, GC, CE) with nuclear magnetic resonance (NMR): A review *Fresenius J Anal Chem* **354** (1996) 131–135.
- 35 A. J. Alexander, L. Zhang, T. F. Hooker i F. P. Tomasella, Comparison of Supercritical Fluid Chromatography and Reverse Phase Liquid Chromatography for the Impurity Profiling of the Antiretroviral Drugs Lamivudine, *J Pharm. and Bio. Anal.* **78** (2013) 243–251
- 36 L. T. Taylor, "Supercritical Fluid Chromatography", *Anal. Chem.* **82**(12) (2010) 4925–4935.
- 37 L. M. Abadie, H.M. Chammoro, European CO₂ prices and carbon capture investments, *Energ. Economics*, **30**(6) (2008) 2992–3015.
- 38 K. Zosel, Separation with Supercritical Gases: Practical Applications, *Ang Chem Edition in English* **17** (1978) 702–709.
- 39 E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *J Supercritical Fluids* **10** (1997) 1–37.
- 40 T. L. Chester, J. D. Pinkston i D. E. Raynie, Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Anal Chem*, **68**(12) (1996) 487–514.
- 41 J. W. King, G. R. List., Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry, American Oil Chemists' Society, 1996. 73–115.
- 42 Y. Chen, P. H. Brown, K. Hu, R. M. Black, R. L. Prior, B. Ou i Y. F. Chu, Supercritical CO₂ decaffeination of unroasted coffee beans produces melanoidins with distinct NF- κ B inhibitory activity. *J Food Sci.* **76** (2011) 182–186.
- 43 T. Fornari, A. Ruiz-Rodriguez, G. Vicente, Erika Vázquez, M. R. García-Risco i G. Reglero, Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from Lamiaceae family, *J Supercritical Fluids* **64** (2012) 1–8.
- 44 N. Imanishi, R. Fukuzato, S. Furuta, i N. Ikawa, *R & D Kobe Eng Rep* **39** (1989) 29–32.

- 45 O. J. Catchpole, J. B. Grey i K. A. Noermark, Solubility of fish oil components in supercritical CO₂ and CO₂ + ethanol mixtures, *J. Chem. Eng. Data* **43** (1998) 1091–1095.
- 46 M. M. Esquível, N. M. Bandarra, I. Fontan, M. G. Bernardo-Gil, I. Batista i M. L. Nunes, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sardine *Sardina pilchardus* Oil, *Food Sci. Tech.* **30** (1997) 715–720.
- 47 A. Staby i J. Mollerup, Separation of constituents of fish oil using supercritical fluids *Fluid Phase Equilibria* **91** (1993) 349–386.
- 48 Ö. Güçlü-Üstündağ i F. Temelli, Correlating the Solubility Behavior of Fatty Acids, Mono-, Di-, and Triglycerides, and Fatty Acid Esters in Supercritical Carbon Dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* **39** (2000) 4756–4766.
- 49 Ö. Güçlü-Üstündağ i F. Temelli, *J Supercritical Fluids* **31** (2004) 235–253.
- 50 M. Novotny, S. R. Springston, P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted i M. L. Lee, Capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* **53** (1981) 407A-414A.
- 51 T. A. Berger i J. F. Deye, Effect of mobile phase density gradients on efficiency in packed column supercritical fluid chromatography, *Chromatographia* **30** (1990) 57–60.
- 52 J. F. Deye, T. A. Berger, i A. G. Anderson, Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids, *Anal. Chem.* **62** (1990) 615–622.
- 53 T. A. Berger i W. H. Wilson, Packed column supercritical fluid chromatography with 220,000 plates, *Anal. Chem.* **65** (1993) 1451–1455.
- 54 G. Lavison-Bompard, D. Thiebaut, J.-F. Beziau, B. Carraze, P. Valette, X. Duteurtre i J.-C. Tabet, Hyphenation of APCI/MS to Supercritical Fluid Chromatography for Polar Car Lubricant Additive Analysis, *J Chromatogr. A* **216** (2009) 837–844.
- 55 K. Taguchi, E. Fukusaki i T. Bamba, Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry in metabolite analysis, *Bioanalysis* **6** (2014) 1679–1689.
- 56 B. Berger, T. Berger, i R.E. Majors, A Review of Column Developments for Supercritical Fluid Chromatography, *LCGC*, **28**(5) (2010) 344-357

- 57 T. Yarita, Development of Environmental Analysis Methods Using Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography, *Chromatography* **29**(1) (2008) 19–23.
- 58 W. Steuer, M. Schindler, G. Schill, i F. Erni, Supercritical fluid chromatography with ion-pairing modifiers Separation of enantiomeric 1,2-aminoalcohols as diastereomeric ion pairs, *J. Chromatogr. A* **447** (1988) 287–296.
- 59 K. W. Phinney, Enantioselective separations by packed column subcritical and supercritical fluid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**(3) (2005) 639–645.
- 60 T. L. Chester i J.D.Pinkston , Supercritical Fluid and Unified Chromatography, *Anal Chem* **76** (2004) 4606–4613.
- 61 L. Siret, N. Bargmann, A. Tambute i M. Caude, Direct enantiomeric separation of β -blockers on ChyRoSine-a by supercritical fluid chromatography: Supercritical carbon dioxide as transient in situ derivatizing agent, *Chirality* **4** (1992) 252–262.
- 62 H. Fischer, O. Gyllenhaal, J. Vessman i K. Albert, Reaction monitoring of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography. *Anal. Chem.* **75**(3) (2003) 622–626.
- 63 K. Desmet, P. Sandra, K. Výzvardi, G. J. Hoornaert i E. V. d. Eycken, Enantioselective packed column SFC for the separation of 2-oxatetracyclo [5.4.0.0^{1,8}.0^{5,11}] undec-9-ene derivatives, *J Microcolumn Sep* **13** (2001) 163–168.
- 64 P. Oswald, K. Desmet, P. Sandra, J. Krupcák, P. Májek i D.W. Armstrong, Determination of the enantiomerization energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical fluid chromatography, *J Chromatogr. B* **779** (2002) 283–95.
- 65 O. Gyllenhaal, Packed column supercritical fluid chromatography of a peroxysome proliferator-activating receptor agonist drug: Achiral and chiral purity of substance, formulation assay and its enantiomeric purity, *J Chromatogr A* **1042** (2004) 173–180.

- 66 M. J. d. Nozal, L. Toribio, J. L. Bernal i N. Castano, Separation of triadimefon and triadimenol enantiomers and diastereoisomers by supercritical fluid chromatography, *J Chromatogr. A* **986** (2003) 135–141.
- 67 K. J. Voorhees, A. A. Gharaibeh i B. Murugaverl, Integrated SFE/SFC/MS System for the Analysis of Pesticides in Animal Tissues, *J Agr. Food Chem.* **46** (1998) 2353–2359.
- 68 D. M. Heaton, K. D. Bartle, A. A. Clifford, P. Myers i B. W. King, Rapid separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by packed column supercritical fluid chromatography, *Chromatographia* **39** (1994) 607–611.
- 69 E. N. Chen, P. D. Cusatis i E. J. Popiel, Validation of the aromatic ring distribution in diesel fuel refinery streams by SFC and MS, *J. Chromatogr. A*, **637** (1987) 181–186.
- 70 A. Venter, E. R. Rohwer i A. E. Laubscher, Analysis of alkane, alkene, aromatic and oxygenated groups in petrochemical mixtures by supercritical fluid chromatography on silica gel., *J. Chromatogr A*, **847** (1999) 309–321.
- 71 <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/column-selection.html>, pristup 2.4.2017.
- 72 L. Mondello, A. C. Lewis i K. D. Bartle, *Multidimensional chromatography*, John Wiley & Sons, 2002. str 135–150.
- 73 M. A. Hawryl, A. Hawryl i E. Soczewilski, Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropyl-bonded polar stationary phase for separation of phenolic compounds from the flowers of *Sambucus nigra* L, *J. Plan. Chrom.* **15** (2002) 4–10.
- 74 T. Tuzimski i E. Soczewinski, Use of a database of plots of pesticide retention (R_F) against mobile-phase composition. *Part I*. Correlation of pesticide retention data in normal- and reversed-phase systems and their use to separate a mixture of ten pesticides by 2D TLC, *Chromatographia* **56** (2002) 219–223.
- 75 K. K. Unger, K. Racaityte, K. Wagner, T. Miliotis, L. E. Edholm, R. Bischoff i G. Marko-Varga, Is Multidimensional High Performance Liquid Chromatography (HPLC) an Alternative in Protein Analysis to 2D Gel Electrophoresis?, *J. High Res. Chrom.* **23** (2000) 259–265.

76. P. Q. Tranchida, D. Sciarrone, P. Dugo i L. Mondello, Heart-cutting multidimensional gas chromatography: A review of recent evolution, applications, and future prospects, *Anal. Chim. Acta* **716** (2012) 66–75.
77. J. C. Giddings, Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J High Res. Chrom.* **10** (1987) 319–323.
78. A. Bakain, I. Rivals, P. Sassiati, D. Thiébaud, M. C. Hennion, G. Euvrard i J. Vial, Comparison of different statistical approaches to evaluate the orthogonality of chromatographic separations: application to reverse phase systems., *J Chromatogr. A.* **1218** (2006) 2963–2975 .
79. M. Adahchour, J. Beens, R. J. J. Vreuls i U. A. T. Brinkman, Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) II. Modulation and detection, *Trends Anal. Chem.* **25** (2006) 540–553.
80. P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo i L. Mondello, Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications., *J Chromatogr. A* **1184** (2008) 353–368.
81. R. E. Murphy, M. R. Schure i J. P. Foley, Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal Chem* **70** (1998) 1585–1594.
82. K. D. Nizio, T. M. McGinitie i J. J. Harynyuk, Comprehensive multidimensional separations for the analysis of petroleum, *J Chromatogr* **1255** (2012) 12–23.
83. M. Adahchour, J. Beens, R. J. J. Vreuls i U. A. T. Brinkman, Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC X GC) I. Introduction and instrumental set-up, *Trends Anal. Chem.* **25** (2006) 438–439.
84. T. Bamberger, J.C. Erickson, C.L. Cooney i S.K.Kumar, Measurement and model prediction of solubilities of pure fatty acids, pure triglycerides, and mixtures of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Data*, **33**(3) (1988) 327–333.
85. J. Blomberg, P. J. Schoenmakers, J. Beens i R. Tijssen, Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and its applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures, *J High Res. Chrom.* **20** (1997) 539–544.

- 86 M. Nakano i K. Okawa, Study of oxygen-containing hydrocarbons in exhaust emission from a spark ignition combustion engine. *Int. J. Engine Res.* **15** (2014) 572–580.
- 87 Y. Shao, P. Marriott i H. Hgel, Solid-phase microextraction on fibre derivatization with comprehensive two dimensional gas chromatography analysis of *trans*-resveratrol in wine, *Chromatographia* **57** (2003) S349–S353.
- 88 <http://www.pss-polymer.com/solutions/copolymer-characterization-and-2d-chromatography>, 07/03/2015.
- 89 D. Mao, R. Lookman, H. Van De Weghe, G. Vanermen, N. De Brucker i L. Diels, Combining HPLC-GCXGC, GCXGC/ToF-MS, and selected ecotoxicity assays for detailed monitoring of petroleum hydrocarbon degradation in soil and leaching water, *J Chromatogr. A* **1216** (2009) 2873–2880.
- 90 T. Dutriez, M. Courtiade, D. Thibaut, H. Dulot, F. Bertoncini, M.C. Hennion, High temperature two-dimensional gas chromatography of hydrocarbons up to nC60 for analysis of vacuum gas oils., *J Chromatogr. A* **1216**(14) (1999) 2905–2912.
- 91 Z. Liu, I. Ostrovsky, P.B. Farnsworth i M. L. Lee, Instrumentation for comprehensive two-dimensional capillary supercritical fluid-gas chromatography, *Chromatographia* **35** (1993) 567–573.
- 92 A. Venter i E. R. Rohwer, Comprehensive Two-Dimensional Supercritical Fluid and Gas Chromatography with Independent Fast Programmed Heating of the Gas Chromatographic Column, *Anal. Chem.* **76** (2004) 3699–3706.
- 93 F. Adam, D. Thiebaut, F. Bertoncini, M. Courtiade i M. C. Hennion, Supercritical fluid chromatography hyphenated with twin comprehensive two-dimensional gas chromatography for ultimate analysis of middle distillates, *J Chromatogr. A* **1217** (2006) 1386–1394.
- 94 I. Franois, A. dos Santos Pereira, F. Lynen i P. Sandra, Construction of a new interface for comprehensive supercritical fluid chromatography×reversed phase liquid chromatography (SFC×RPLC), *J Sep. Sci.* **31** (2008) 3473–3478.
- 95 Y. Hirata, T. Hashiguchi i E. Kawata, Development of comprehensive two-dimensional packed column supercritical fluid chromatography., *J Sep. Sci.*, **26** (2003) 531–535.

- 96 G. Lavisson, F. Bertoncini, D. Thiébaud, J. F. Beziau, B. Carrazé, P. Valette i X. Duteurtre, Supercritical fluid chromatography and two-dimensional supercritical fluid chromatography of polar car lubricant additives with neat CO₂ as mobile phase, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007) 300–307.
- 97 P. Guibal, D. Thiebaut, P. Sassiati, J. Vial, P. Guibal, D. Thiebaut, P. Sassiati i J. Vial, Feasability of neat carbon dioxide packed column comprehensive two dimensional supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1255** (2012) 252–258.
- 98 J. Rupčić, Laboratorijski priručnik - masne kiseline, MedRi, 1986, str 17–24.
- 99 Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Dugo i G. Detailed analysis and group-type separation of natural fats and oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1019** (2003) 187–196.
- 100 G. Purcaro, L. Barp, M. Beccaria i L. S. Conte, Fingerprinting of vegetable oil minor components by multidimensional comprehensive gas chromatography with dual detection *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 309–319.

ŽIVOTOPIS

Orjen Petković [REDACTED] Osnovnu i srednju školu pohađao u Rijeci, gdje je maturirao 2001. godine. Iste godine upisuje studij kemije na Sveučilištu u Padovi te 2007. godine stječe zvanje *Dottore magistrale in scienze e tecnologie chimiche* radnjom iz područja analitičke kemije okoliša.

Od 2007. do 2009. godine zaposlen je u svojstvu inženjera procesa proizvodnje na pogonu VCM u DINA Petrokemiji u Omišlju. Od 2009. do 2015. godine zaposlen je kao asistent na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Tijekom 2012. i 2013. godine boravi u ESPCI, Pariz, Francuska, kao stipendist Vlade Republike Francuske. Od rujna 2015. godine profesor je kemije u Srednjoj talijanskoj školi u Rijeci.

Popis publikacija:

- a. O. Petković, P. Guibal, P. Sassiati, J. Vial, D. Thiébaud, Active modulation in neat carbon dioxide packed column comprehensive two-dimensional, *J. Chromatogr. A* **1536**(9) (2018) 176-184.
- b. D. Broznić, J. Marinić, M. Tota, G. Čanadi Jurešić, O. Petković, Č. Milin, Hysteretic Behavior of Imidacloprid Sorption-Desorption in Soils of Croatian Coastal Regions, *Soil Sediment Contam* **21**(7) (2012) 850-871.