

# **Aromaattisten ja syklisten hiilivety-yhdisteiden kvantitointi GC x GC-MS-FID -laitteistolla**

Pro gradu –tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Soveltavan kemian osasto

2.8.2018

Tuomas Mäkinen



## Tiivistelmä

Yhä enenevässä määrin maailmanlaajuisesti kiinnitetään huomiota ilmanlaatuun ja polttonesteiden aiheuttamiin päästöihin. Hiilidioksidin lisäksi  $\text{NO}_x$  -päästöihin ja aromaattisten hiilivetyjen päästöihin asetetaan rajoituksia ja pyritään mahdollisimman puhtaasti palavaan polttonesteeseen. Tämä vaatii sekä polttonesteen että päästöjen mittaamiseen käytettäviltä analyysilaitteistoilta paljon, sillä näytematriisit ovat erittäin haastavia. Petrokemian teollisuudessa on käytetty valtavasti resursseja uusien polttonesteiden analyysitapojen kehittämiseen ja yksi varteenotettava menetelmä on GC x GC. Tällä laitteistolla voidaan mitata myös äärimmäisen hyvin erittäin pieniä pitoisuuksia esimerkiksi ilmasta ja petrokemian ohella ilmantutkimus on toinen laitteen suurista käyttökohteista.

UPM Pohjois-Euroopan tutkimuskeskukseen hankittiin kyseinen laite. Tämä pro gradu -tutkielma keskittyi laitteelle hankitun uuden ilmaisimen ja tiedonkäsittelyohjelman käyttöönottoon sekä laitteen parhaan mahdollisen käytön varmistamiseen. Lisäksi luotiin mittaussuunnitelmat moninaisen hiilivety-matriisin syklisten ja aromaattisten hiilivetyjen määrän mittaamista varten. Tämän menetelmän pohjalta tulevaisuudessa voidaan pienin muutoksin lisätä laitteen mittauskapasiteettia ja kasvattaa erilaisten näytematriisien määrää.

Analyyttien määrän mittaamisessa ei täysin päästy tavoitteeseen, sillä aromaattisten yhdisteiden määrä oli 2-3 %-yksikköä liian suuri vertailumittauksiin nähden. Tähän oli useita syitä, eikä yksittäisten syiden painoarvoa työhön käytetyssä ajassa voitu määrittää. Laitteen kokoonpano oli erilainen kuin yleisesti käytetyissä GC x GC -sovelluksissa. Helpoimmin havaittavat syyt toimivuuden puutteellisuuteen johtuivat lähinnä tiedonkäsittelyohjelman käyttövalmiuksien puutteellisuuksista, massaspektrometritunnistusten epävarmuuksista ja näytteen eri yhdisteiden pitoisuuseroista.

## Esipuhe

Opinnäytetyön suorittamisen mahdollisti UPM:n tutkimuskeskus ja se tehtiin Lappeenrannassa, niin kirjalliselta kuin kokeelliselta osalta. Työ liittyy Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen soveltavan kemian osastoon. Työn ohjaajana on toiminut professori Raimo Alén. Työn tilasi tohtori Andrea Gutierrez ja se suoritettiin UPM:n analyysipalvelut ja menetelmäkehitys -tiimissä, jossa valvojana toimi vanhempi tutkija Vesa Miikki. Työ aloitettiin kirjallisella osalla toukokuussa 2017 ja kokeellinen osa päätettiin joulukuussa 2017. Työ on viimeistelty kesäkuussa 2018.

Kirjallisuus pohjana on käytetty tieteellisiä julkaisuja, joiden etsimisessä on käytetty internetpohjaisia hakukoneita, kuten Google scholar ja SciFinder. Lisäksi on käytetty analyysilaitteistoihin ja ilmastoanalytiikkaan keskittynyttä kirjallisuutta ja petrokemian ja päästöihin liittyviä lakikokoelmia ja sopimuksia.

Haluan kiittää professori Raimo Alénia työn luottamuksen osoittamisesta, joka mahdollisti työn tekemisen ja työn ohjaamisesta. Suuri kiitos kuuluu myös vanhemmalle tutkijalle Vesa Miikille ja laborantti Satu Nevalaiselle, jotka olivat vastuussa työn kokeellisen osan laboratoriotyöskentelystäni.

Tahdon myös kiittää perhettäni ja puolisoani Hannaa, joiden piikittelynsenkaisen tsemppauksen ansiosta kalkkiviivat vihdoinkin pölähtivät opintourallani.

Lappeenrannassa 14.6.2018

Tuomas Mäkinen

## Sisällysluettelo

Tiivistelmä .....	i
Esipuhe .....	ii
Sisällysluettelo .....	iii
Käytetyt lyhenteet .....	vi
1 Johdanto .....	1
2 Kromatografia .....	2
3 Kaasukromatografia .....	7
3.1 Injektiotavat .....	9
3.1.1 Jakoinjektio .....	10
3.1.2 Suorainjektio .....	11
3.1.3 Kolonniin injektio .....	12
3.1.4 Muut injektiotekniikat .....	12
3.2 Derivatisointi .....	13
3.3 GC-GC -kromatografia ("heart-cut") .....	14
3.4 GC x GC -kromatografia .....	16
3.4.1 Kolonnit .....	19
3.4.2 Kryogeeninen modulaattori .....	20
4 Havainnointi GC x GC-menetelmässä .....	21
4.1 Massaspektrometrit .....	21
4.1.1 Magneettinen sektorimassaspektrometri .....	22
4.1.2 Kvadrupolimassaspektrometri .....	23
4.1.3 Ioniloukkumassaspektrometri .....	24
4.1.4 Lentoaikamassaspektrometri .....	25
4.1.5 Fourier-muunnos-massaspektrometri .....	27
4.2 Liekki-ionisaatioilmaisimien .....	27
4.3 Muut ilmaisimet .....	28
4.3.1 Elektronisieppausilmaisimien .....	28

4.3.2	Liekkifotometrinen ilmaisin.....	29
4.3.3	Alkalil liekki-ionisaatioilmaisin.....	29
5	GC x GC-sovellukset .....	30
5.1	Polttonesteiden analysointi.....	30
5.1.1	Päästörajoitukset .....	30
5.1.2	Muut analyysimenetelmät .....	31
5.1.2.1	1D-kaasukromatografi .....	32
5.1.2.2	Nestekromatografi .....	32
5.2	Ilmansaasteiden analysointi.....	32
5.3	Eteeristen öljyjen analysointi .....	33
6	Menetelmäkehitys kromatografiassa.....	34
	Kokeellinen osa.....	36
7	Käytetyt kemikaalit .....	37
7.1	Kaasut .....	37
7.2	Näytteet .....	38
8	Laitteistot .....	38
8.1	Kaasukromatografi .....	38
8.2	Lämpömodulaattori .....	39
8.3	Ohjelmistot .....	40
9	Ajo-ohjelmat .....	40
10	Työn suoritus.....	43
10.1	Ajo-ohjelmien muodostaminen.....	44
10.2	Kromatogrammin tulkinta.....	45
10.3	Sisäiset standardit .....	47
10.3.1	Pitoisuuden valitseminen .....	48
10.3.2	Sisäisen standardin kalibrointi .....	48
11	Työn tulokset.....	49
12	Yhteenveto .....	50

Kirjallisuusviitteet.....51

## Käytetyt lyhenteet

1D-GC	- 1D-kaasukromatografia (1D-gas chromatography)
2D-GC	- ks. GC x GC
AFID	- alkalinen liekki-ionisaatiotektori (alkaline FID)
CI	- kemiallinen ionisaatio (chemical ionization)
DC	- tasavirta (direct current)
ECD	- elektroninsiieppausdetektori (electron capture detector)
EI	- elektroni-ionisaatio (electron ionization)
EPA	- Ympäristön suojeluvirasto, Yhdysvallat (US Environmental protection agency)
FID	- liekki-ionisaatiotektori (flame ionisation detector)
FPD	- liekkifotometrinen detektori (flame photometric detector)
FT-IR	- Fourier-muunnos infrapuna Fourier transform infrared
FT-MS	- Fourier-muunnos MS (Fourier transfer MS)
GC	- kaasukromatografia (gas chromatography)
GC x GC	- kokonaisvaltainen 2D-kaasukromatografia (comprehensive 2D-gas chromatography)
GC-GC	- "heart-cut"-kaasukromatografia ("heart-cut"-gas chromatography)
GLC	- kaasu-nestekromatografia (gas-liquid chromatography)
GSC	- kiinteän faasin kaasukromatografia (gas-solid chromatography)
HPLC	- korkean erotuskyvyn nestekromatografia (high performance liquid chromatography)
HRGC	- korkean erotuskyvyn GC (high resolution GC)
ICR	- ioni syklotroniresonanssi (ion cyclotron resonance)
LC	- nestekromatografia (liquid chromatography)
MS	- massaspektrometri (mass spectrometer)
PIONA	- parafiinit, isoparafiinit, olefiinit, nafteenit, aromaattit (paraffins, iso-paraffins, olefins, naphthenes, aromatics)
qIT	- kvadrupoli ioniloukku (quadrupole ion trap)
qMS	- kvadrupolimassaspektrometri (quadrupole mass spectrometer)
RF	- radiotaajuus (radio frequency)
SFC	- superkriittinen nestekromatografia (supercritical fluid chromatography)



TLC	- ohutkerroskromatografia (thin layer chromatography)
TID	- terminen ionisaatioilmaisin (thermal ionization detector)
TOF-MS	- lentoaikamassaspektrometri (time-of-flight mass spectrometer)
VOC	- haihtuvat orgaaniset yhdisteet (volatile organic compounds)

# 1 Johdanto

Tietoisuus ilmansaasteiden ja hyönteismyrkköjen vaikutuksista ihmisten hyvinvointiin on 1990-luvulta asti saanut analyttikot kehittämään erilaisia menetelmiä, joilla voidaan tutkia ilmassa olevia pieniä kemikaalipitoisuuksia.<sup>1-3</sup> Tähän tarkoitukseen on yritetty soveltaa analyysiä perinteisellä kaasukromatografialla siinä kuitenkin hyvin onnistumatta. Ongelmana ovat samalla retentioajalla eluoituvat komponentit, jolloin näytteestä ei saada läheskään kaikkia yhdisteitä tunnistettua. Multidimensionaalinen kaasukromatografia on tuonut ratkaisumahdollisuuksia tällaisten näytteiden analysointiin.

Petrokemian teollisuudessa lopputuotteen analysointi on tärkeää laadunvarmistuksen lisäksi erilaisten rajoitusten, kuten aromaattisten hiilivetyjen tai hapen määrän, noudattamisen takia.<sup>3</sup> 1990-luvulla polttonesteanalytiikassa käytettiin analyysseja, jotka vaativat 2-5 kolonnaa, venttiilejä, monia lämpötilavyöhykkeitä ja jopa monia injektioita samalle näytteelle. Hankalista toimenpiteistä huolimatta ongelmana saattoi olla eri kemikaalien samanaikaiset eluoitumiset. Esimerkiksi etanoli ja metanoli vaikuttivat bentseenin määrittelyyn ja hiilivedyt, joiden hiiliketjuissa on yli 12 hiiltä, vaikuttivat yli yhdeksän hiilen aromaattien määrittelyyn. Tästä johtuen suurin osa ensimmäisistä multidimensionaalisten kaasukromatografioiden sovelluksista pyrkivät helpottamaan petrokemian analyyssejä.<sup>4</sup>

Multidimensionaalinen kromatografiteknologia on ollut suuren kiinnostuksen kohteena noin 20 vuotta ja teknologian kehittyminen on ollut nopeaa niin ilma-analyysin kuin petrokemiallisen analyysin osalta. Multidimensionaalisuus ratkaisee monien analyysin ongelmat nostamatta kustannuksia mahdottoman korkealle ja se myös säästää aikaa ja vaivaa.

## 2 Kromatografia

Kromatografia on alun perin kehitetty 1800– ja 1900–luvun taitteessa ja sen alkuperäinen tarkoitus oli erotella kasvien värillisiä pigmenttejä toisistaan. Sanan alkuperä tulee latinan sanoista ”chroma” eli väri ja ”graphein” eli kirjoittaa.<sup>5,6</sup> Nykyään kromatografiaa käytetään monipuolisesti ympäri maailmaa biokemian, kemian, biologian, laaduntarkkailun, tutkimuksen, analyysin, erottelun ja fysiokemikaalisissa mittauksissa ja sitä voidaan käyttää sekä mikro- että makroskaassa. Teollisuudessa kromatografiaa käytetään puhdistamaan erilaisia materiaaleja, kuten hiilihydraatteja, lääkkeitä ja harvinaisia maametalleja. Kromatografia määritellään metodiksi, jota käytetään erottelemaan komponentit näytteestä kahden erillisen faasin avulla, joista toinen on stationaarinen eli liikkumaton ja toinen liikkuu. Stationaarifaasi voi olla kiinteä, kiinteällä aineella tuettu neste tai geeli ja liikkuva faasi voi olla neste tai kaasua.

Kromatografia perustuu analyytin tai analyyttien kulkeutumiseen liikkuvan faasin mukana stationaarifaasin vaikutuksen alaisena.<sup>5</sup> Stationaarifaasi vuorovaikuttaa näytteen kanssa pidättäen molekyylejä, jolloin eri analyytit erottuvat. On olemassa kahden tyyppistä kromatografiaa, joko kolonnikromatografiaa tai levykromatografiaa. Kromatografiassa analyyttien erottumista kuvataan retentioajalla, joka määritellään analyytin matka-ajan suhteena liikkuvan faasin matka-aikaan.

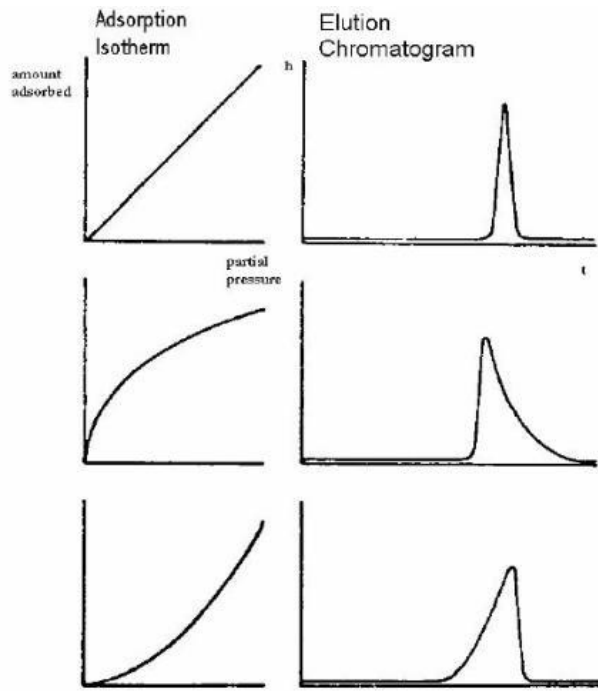
Levykromatografiassa tapahtuu täysin samat asiat kuin kolonnikromatografiassakin, mutta stationaarifaasi on levyn pinnalla, kun kolonnikromatografiassa se on kolonnin sisäpinnalla tai pakattuna kolonnin sisälle.<sup>5</sup> Liikkuva faasi kulkee levyllä stationaarifaasia pitkin ja analyytit vuorovaikuttavat sen kanssa. Analyytit kulkevat tietyn matkan suhteessa liikkuvaan faasiin ja ne tunnistetaan standardien avulla. Tunnistukset varmennetaan käyttämällä liikkuvana faasina eri liuotinsseoksia, joilla on erilainen poolisuus. Levykromatografiaa käytetään varsinkin orgaanisessa kemiassa synteisien edistymistä seurattaessa.

Kolonnikromatografiassa näytteet kulkevat vyöhykkeinä koko kolonnin läpi eli eluoituvat ja lopulta kulkeutuvat ilmaisimelle, joka kerää tiedon analyyteista.<sup>5</sup> Eluoituminen tarkoittaa analyytin poistumista kokonaan kromatografisesta systeemistä, jolloin ilmaisimella kerää tästä muodostuvan tiedon, joka kuvataan kolonnikromatografiassa piikkinä kromatografissa. Kolonnikromatografiassa retentioaika  $t_r$  kuvaa aikaa, joka kuluu analyytin eluoitumiseen syöttöhetkestä alkaen. Retentioaika koostuu kuolleesta

ajasta  $t_m$  ja stationaarifaasin pidättämästä ajasta. Kuollut aika koostuu ajasta, jonka analyytit ovat liikkuvassa faasissa. Käytännössä kuollut aika on sama kuin inertin aineen eluoitumiseen kuluva aika tietyssä systeemissä ja se on sama kaikille analyyteille. Kuollut aika on systeemin ominaisuus ja se on yksilöllinen eri laitteille. Mukautettu retentioaika  $t'_r$  on aika, jonka analyytti on pidättyneenä stationaarifaasiin ja se lasketaan yhtälön (1) mukaan.

$$t'_r = t_r - t_m \quad (1)$$

Kolonnikromatografiassa pyritään tuottamaan symmetrisiä teräviä piikkejä, sillä mitä symmetrisempi piikki on, sitä paremmin piikit erottuvat toisistaan ja havainnointi tehostuu.<sup>5</sup> Piikin terävyys taas kertoo kolonnin tai oikeastaan koko systeemin tehokkuudesta. Piikin muotoon kromatografissa vaikuttavat analyytin vuorovaikutukset stationaarifaasin kanssa suhteessa analyytin sisäisiin vuorovaikutuksiin. Jos analyytin sisäiset vuorovaikutukset ovat suhteessa voimakkaita verrattuna stationaarifaasin vuorovaikutuksiin, muodostuu anti-Langmuir-käyrä ja siitä johtuu piikin maksimin siirtyminen oikealle (kuva 1, alin pari). Päinvastaisessa tilanteessa piikin maksimi siirtyy vasemmalle ja sitä kutsutaan Langmuir-käyräksi (kuva 1, keskimäinen pari). Jos taas kaikki analyytin molekyylit liikkuvat samalla nopeudella koko kolonnin läpi, saadaan Gaussinen piikki (kuva 1, ylin pari). Edellä annetut tapaukset johtuvat analyytin ja stationaarifaasin fysikaalisista ominaisuuksista, mutta on myös mahdollista, että piikin muoto vääristyy kemisorption takia. Tällöin piikin maksimin jälkeinen paluu takaisin intensiteetin pohjaluvun tasolle on erittäin hidasta, jolloin pohjaluku hieman nousee.



Kuva 1. Erimuotoisia piikkejä kromatogrammissa.<sup>7</sup>

Epälineaaristen piikkien suurin ongelma on retentioajan muuttuminen näytemäärän suhteen.<sup>5</sup> Esimerkiksi Langmuirin isotermissä retentioaika kasvaa näytemäärän vähentyessä. Tämä tuottaa ongelmia sekä kvalitatiivisessa että kvantitatiivisessa analyysissä.

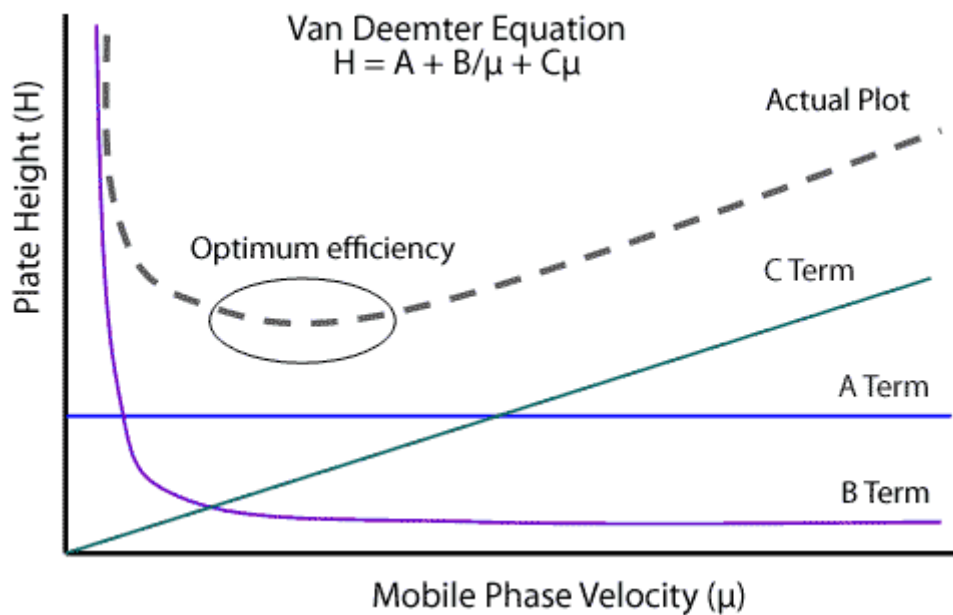
Piikin muotoa voidaan laskea yhtälön 2 avulla.<sup>5</sup> Luvut  $a$  ja  $b$  ovat piikin leveys maksimikorkeuden oikealta ja vasemmalta puolelta. Leveydet mitataan tietyltä korkeudelta, yleensä 10 % piikin maksimikorkeudesta. Vasemman puolen leveyttä kuvaa  $a$  ja oikean puolen  $b$ . Symmetrisessä piikissä luku  $A_s$  saa arvon 1. Jos lukuarvo on suurempi kuin 1, kyseessä on piikin häntiminen (Langmuir), jos taas pienempi kuin 1, piikin maksimi on oikealla (anti-Langmuir). Useimpien vinojen piikkien  $A_s$ -arvot ovat välillä 1,1-2,5. Arvot 0,8-1,2 ovat hyväksyttäviä, sillä tämä ei vielä vaikuta suuresti erotustehokkuuteen tai kvantitatiiviseen tarkkuuteen.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2)$$

Piikin leviämisteoriaa kehittänyt J.J. Van Deemter yhdisti kaikki piikin leviämiseen liittyvät tekijät samaan yhtälöön (3). Yhtälössä  $A$  merkitsee Eddyyn diffuusiota, joka johtuu analyytin mahdollisista kulkureiteistä kolonnin läpi.  $B$  taas kuvaa pituussuuntaista

diffuusiota ja C faasien vuorovaikutusta keskenään. Lisäksi yhtälöön vaikuttaa liikkuvan faasin keskinopeus ( $\mu$ ). Näillä tiedoilla voidaan laskea H, joka on teoreettinen pohjaluku. Kuvassa 2 esitetään eri termien vaikutusta Van Deemter-kuvaajaan. Kuvaaja on kaikille eri kromatografeilla saman muotoinen.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (3)$$

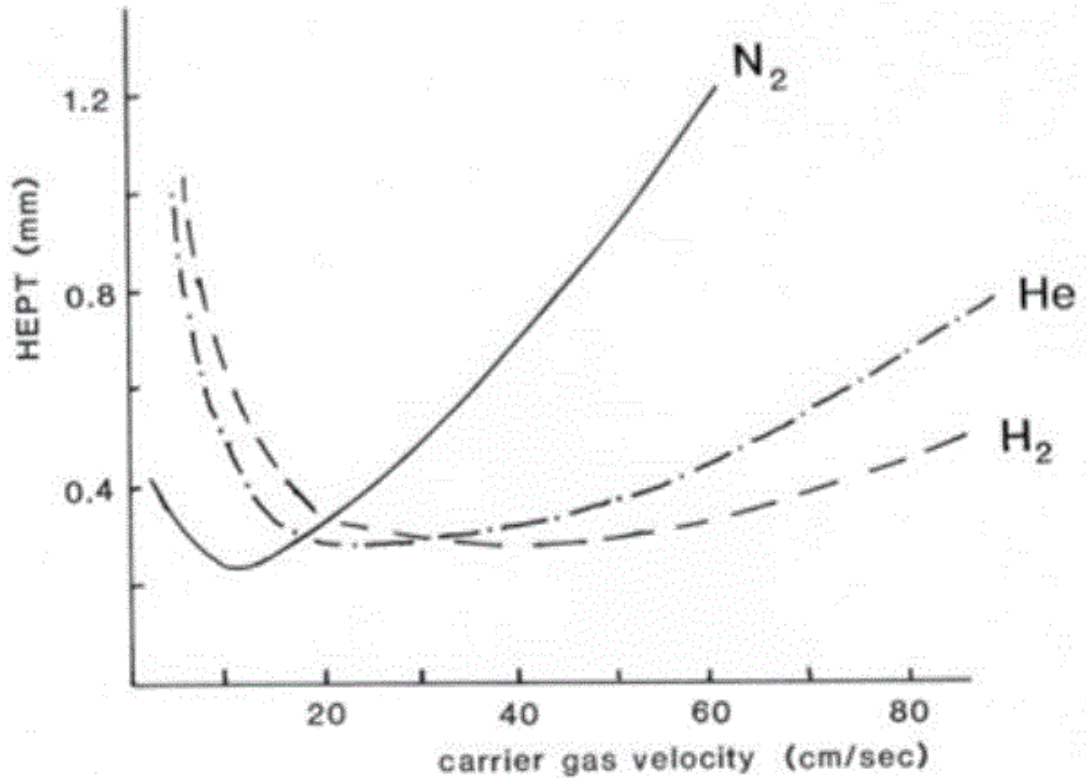


Kuva 2. Van Deemter-kuvaaja.<sup>8</sup>

A:n suuruus kasvaa sen mukaan, mitä pienempiä kolonnin täyteaineena käytetyt partikkelit ovat.<sup>5</sup> Toisaalta  $A=0$ , jos kolonni on avoputkikolonni, kuten yleensä kaasukromatografiassa (GC) on. Pitkittäissuuntainen diffuusio (B) sitä vastoin on erittäin tärkeä tekijä GC:ssa, muttei niin merkittävä nestekromatografiassa (LC), sillä nesteiden diffuusiokerroin on pieni. GC:ssa voidaan pienentää B:n vaikutusta käyttämällä raskaita kantajakaasuja tai lisäämällä virtausnopeutta. Eri kantajakaasujen optimaalisia virtausnopeuksia pohjaluvun suhteen on esitetty kuvassa 3.

Faasien keskinäisestä vuorovaikutuksesta johtuva massansiirron vastustus,  $C\mu$ , on kaikkein eniten vaikuttava tekijä GC:ssa, LC:ssa ja SFC:ssa (ylikriittinen nestekromatografia) erityisesti, jos käytetään normaalia virtausnopeutta.<sup>5</sup> Vuorovaikutuksista johtuva vyöhykkeen leviäminen johtuu faasien välisen tasapainotilan saavuttamisen hitaudesta. Kun vyöhyke etenee kolonnissa ja saavuttaa ”tuoreen” stationaarifaasin, tasapaino ei muodostu välittömästi, vaan osa analyytistä kulkeutuu

pidemmälle kuin täydellisen tasapainon tilassa. Tämä korostuu, jos virtausnopeus on suuri.



Kuva 3. Optimaalisten virtausnopeuksien kuvaajat.<sup>9</sup>

Massansiirron vastustus voidaan jakaa kahteen osaan:<sup>5</sup> vaikutus stationaarifaasissa ja liikkuvassa faasissa. Kiinteän stationaarifaasin tapauksessa voidaan  $C_{\mu}$  lähes sivuuttaa, mutta jos stationaarifaasi on neste, massansiirron vaikutus on suuri. Vaikutus riippuu filmin paksuudesta ja diffuusiokerroimesta. Vähiten vaikutusta on erittäin viskooseilla ja ohuilla stationaarifaasikerroksilla. Toinen puoli massansiirron vastustuksesta tapahtuu liikkuvassa faasissa. Vaikutus riippuu stationaarifaasipartikkeleiden koosta tai avoputkikolonnin sisähalkaisijasta. Molemmissa tapauksissa tulokset paranevat, kun partikkelikoko tai sisähalkaisija pienenevät.

GC:ssa vyöhykkeen laajenemista aiheuttaa myös paine-ero injektio- ja ilmaisinpään välillä.<sup>5</sup> Paine laskee analyytin edetessä kolonnissa ja tästä syystä vyöhyke hajaantuu ilmaisinta kohden.

Yhtälöstä (3) saadaan kuvaaja, joka näyttää teoreettisen pohjaviivan suuruuden.<sup>5</sup> Pohjaviivan korkeus riippuu kolonnin pituudesta ja teoreettisten välipohjien määrästä.

Välipohjateoria kuvaa kolonnin kapeina diskreetteinä paloina, välipohjina, joissa jokaisessa muodostuu tasapainotila analyytin ja faasien kesken. Kolonnin tehokkuus paranee, kun välipohjien määrä kasvaa. H:n arvo poikkeaa kaikilla kromatografeilla, joten tarkat tulokset saadaan kokeilemalla. Yhtälön tuloksista voidaan sen jälkeen tehdä päätöksiä siitä, mitä analyysilta halutaan. Mahdollisimman pieni pohjaluku eli paras resoluutio saavutetaan tietyllä virtausnopeudella. Kääntäen mahdollisimman pienen pohjaluvun tuloksista voidaan päättää se, mikä on hyväksyttävän suuri pohjaluku ja nostaa sen mukaan virtausnopeutta ja lyhentää analyysiaikaa tarkkuuden kustannuksella.

Suuri kolonnista riippumaton tekijä vyöhykkeen laajenemisessa on kuollut tilavuus.<sup>5</sup> Se on määritelty kaikkena sinä tilavuutena, joka on injektiokohdan ja ilmaisimen välillä, jossa näyte ja liikkuva faasi on seoksena, mutta eivät kosketuksissa stationaarifaasin kanssa. Kuolleen tilavuuden vaikutukset korostuvat, kun laitteistojen koot pienenevät. Tämä koskee varsinkin avoputkikolonneja. Kuolleet tilavuuteen vaikuttaminen on vain vähäisessä määrin laitteenkäyttäjän ulottuvilla, mutta laitteiston hyvä tekninen suunnittelu ja valmistus voivat vähentää sitä. Kaasukromatografiassa kolonnin oikeaoppinen asennus injektorin- ja ilmaisinpäässä vähentää kuollutta tilavuutta.

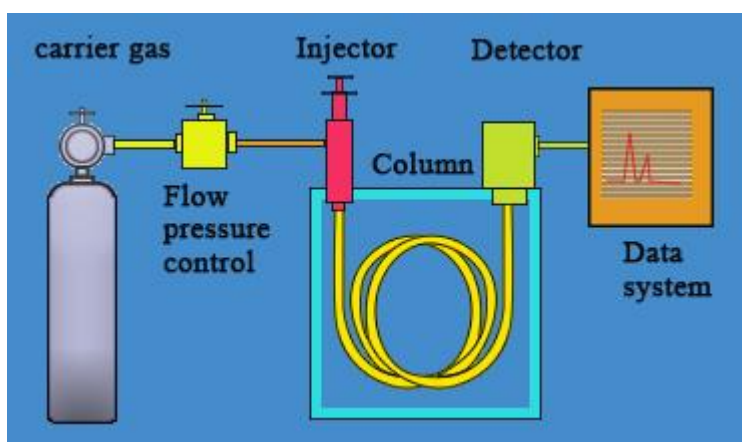
### **3 Kaasukromatografia**

GC käyttää liikkuvana faasina kaasua.<sup>5</sup> Kaasukromatografiaa käytetään rutiinimittauksissa lähes kaikissa teollisuuden laboratorioissa. Ennen korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) kehittämistä GC oli vallalla oleva menetelmä aina 1950-luvulta saakka. GC:ssa voi olla kahdentyyppisiä kolonneja, joko kiinteällä (GSC) tai nestemäisellä (GLC) stationaarifaasilla. Nestemäisen stationaarifaasin neste on sidottuna johonkin kiinteään aineeseen. Lähes kaikki käytettävät kaasukromatografit hyödyntävät GLC:a ja vain joissain erikoistuneissa analyyseissä käytetään GSC:a, kuten epäorgaanisten kaasujen analyyseissä. Näissä tekniikoissa käytettävät kolonnit voivat olla pakattuja tai avoputkikolonneja.

Kaasukromatografi koostuu injektorista, kolonnista, kolonniuunista, ilmaisimesta ja tiedonkäsittelysystemistä (kuva 4).<sup>5</sup> Lisäksi kromatografi vaatii kaasusyöttösystemin ja mahdollisesti ”make up”-kaasun syöttösystemin. Näyte syötetään injektoriin, jossa se höyrystyy. Höyrystynyt näyte johdetaan kantajakaasun avulla uunissa sijaitsevaan kolonniin. Uuni voi olla joko vakioilämpötilassa koko ajan tai sille on voitu määrittää



lämpötilaohjelma, joka nostaa uunin lämpötilaa ajan funktiona. Analyyttien erottuminen tapahtuu kolonnissa, jonka päässä on ilmaisimien, jotka havaitsevat elektronisen signaalin. Tiedonkäsittelyohjelman avulla signaaleista saadaan kromatogrammi. Joskus on tarpeen käyttää ”make up”-kaasua ilmaisimen vaatiessa suurempaa virtausnopeutta. Laitteistossa voi myös olla erillinen näytteensyöttösystemi, kuten ”headspace”, joka syöttää haihtuneita yhdisteitä siirtolinjaa pitkin injektoriin. Analyytit tunnistetaan yhdisteille ominaisen retentioajan avulla. Mikäli kaasukromatografi on kalibroitu ennen analyysia, näytteiden tunnistamisen lisäksi voidaan tehdä kvantitatiivinen analyysi.



Kuva 4. Kaasukromatografian kaaviokuva.<sup>10</sup>

Näytteeltä vaaditaan lämpötilan sietoa ja sopivaa höyrynpainetta uunin lämpötilassa, jotta näyte höyrystyy ja jotta se kulkee kantajakaasun mukana.<sup>5</sup> Rajoituksista huolimatta GC on monipuolinen analyysimenetelmä, sillä uunin lämpötila voidaan nostaa jopa 450 °C:seen, vaikkakin useimmin sitä pidetään enintään lämpötilassa 300 °C. GC:lla voidaan mitata kaikkia kaasumaisia näytteitä, pieniä ja keskikokoisia orgaanisia molekyylejä (C30-kokoisiin yhdisteisiin asti) ja monia organometalleja. Suolojen ja makromolekyylien mittaaminen ei kuitenkaan onnistu. Joissakin tapauksissa haihtumattomia yhdisteitä voidaan derivatisoimalla, eli liittämällä molekyyleihin sopivia ryhmiä, muokata haihtuvammiksi. Esimerkiksi monosakkarideja voidaan silyloid, jolloin ne on mahdollista syöttää kaasukromatografiin.

Liikkuvan faasin tärkeimmät ominaisuudet ovat inerttiys ja palamattomuus.<sup>5</sup> Myös kaasun hinta voi vaikuttaa siihen, mitä kaasua käytetään. Muita huomionarvoisia ominaisuuksia ovat muun muassa kantajakaasun vaikutukset kolonnin tehokkuuteen ja

yhteensopivuus käytettävän ilmaisimen kanssa. Kun otetaan huomioon nämäkin seikat, niin parhaimmat vaihtoehdot kantajakaasuksi ovat helium (He), vety ( $H_2$ ) ja typpi ( $N_2$ ).

Pakatuissa kolonneissa ei voi osoittaa juuri lainkaan eroa kantajakaasujen välillä. Jos kuitenkin esimerkiksi paineen tippuminen kolonnin alkupäästä loppupäähän rajoittaa analyysin tarkkuutta, niin kaasun viskositeetin laskeminen auttaa, eli vedyn käyttö olisi paras vaihtoehto.<sup>5</sup> Avoputkisissa kolonneissa tilanne on toinen. Van Deemterin kuvaajasta (kuva 3) näkee, että typpi antaa pienimmän pohjaluvun, mutta tyypellä optimaalinen virtausnopeus on huomattavan pieni, mikä pidentää analyysiaikaa. Virtausnopeuden kasvattaminen typen optimaalista virtausnopeutta korkeammaksi aiheuttaa pohjaluvun nopeaa nousemista. Verrattuna vedyn pohjaluvun hitaaseen kasvuun voidaan todeta, ettei typpeä käytettäessä kannata ylittää optimia virtausnopeutta. Vetyä käytettäessä voidaan tehdä nopeita analyyseja tarkkuuden silti kärsimättä liikaa. Tämän takia vety on tietyissä analyyseissa houkutteleva vaihtoehto, mutta se voi muodostaa räjähtävän seoksen ilman kanssa. Tästä syystä erityisiä varotoimenpiteitä on otettava käyttöön ja vuotosensori on erittäin suositeltava. Optimaaliset virtausnopeudet eri kantajakaasuille ovat 8-10 cm/s (typpi), 16-20 cm/s (helium) ja 32-40 cm/s (vety).

Näytteensyöttö on ollut aina ongelma GC:ssa monista syistä johtuen.<sup>5</sup> Injektorin tulee syöttää oikea määrä näytettä kolonniin, ettei kolonnin tai ilmaisimen kapasiteetti ylikuormitu. Lisäksi näytteen tulee haihtua nopeasti ja sen tulee siirtyä kolonniin terävänä vyöhykkeenä. Lisäksi kolonniin siirtyvässä näytteessä tulisi olla sama rakenne kuin alkuperäisessä näytteessä, jos ei syötetä koko näytemäärää.

Kaasukromatografiin voidaan periaatteessa syöttää kaasuja, nesteitä ja kiinteitä aineita, mutta yleensä nesteet laimennetaan ja kiinteät näytteet liuotetaan ja laimennetaan sopivalla liuottimella.<sup>5</sup> Näytteensyöttö tapahtuu mikroruiskulla haihdutuskammioon, kumisen septan läpi, joka sulkee injektorin, kun neula vedetään pois kammioista. Kiinteä aine voidaan syöttää myös haihdutuskammioon, mutta hidas haihtuminen saattaa tuottaa ongelmia, joten useimmiten kiinteät näytteet syötetään laimeina liuksina.

### **3.1 Injektiotavat**

Kaasukromatografiin on kehitetty erilaisia injektiotapoja, jotta erityyppiset näytteet voidaan siirtää kolonniin parhaalla mahdollisella tavalla. Lisäksi on huomioitu näytemäärän vähyydestä tai näytteen pienestä pitoisuudesta johtuvia rajoituksia. Tietyissä

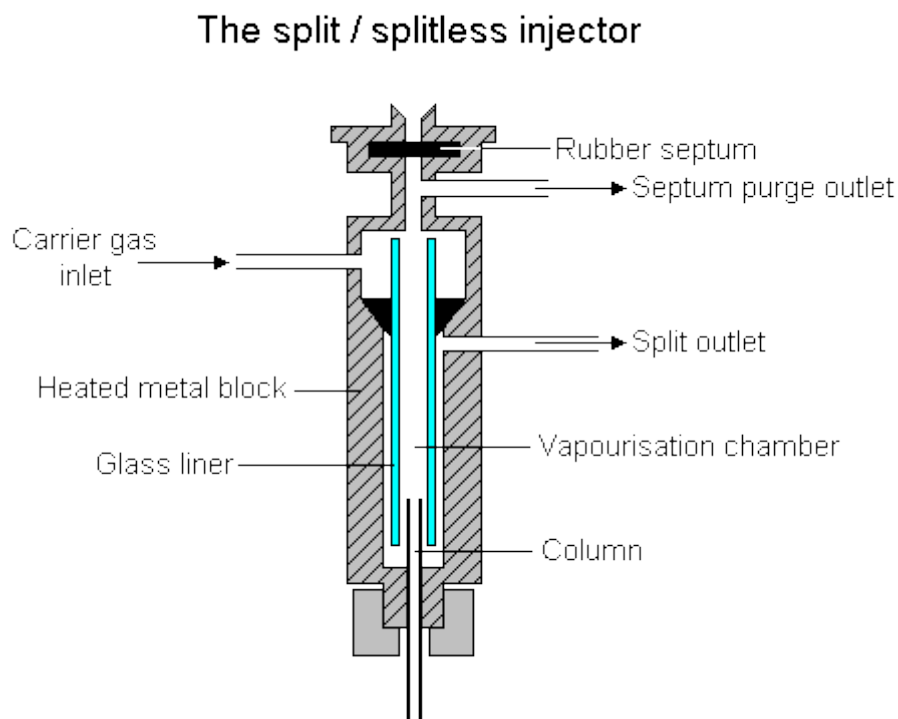
tapauksissa myös injektorissa tai ruiskussa olevan metallin aiheuttamia katalyyttisiä reaktioita pyritään poistamaan erilaisilla ruiskuilla tai erillisen injektorin poistamisella.

### 3.1.1 Jakoinjektio

Jakoinjektio oli ensimmäinen injektiotapa avoputkikolonnille.<sup>5</sup> Se on yksinkertainen injektiotapa ja se soveltuu moneen sovellukseen. Näyte injektoidaan ja höyrystetään, jonka jälkeen se yhdistetään homogeeniseksi seokseksi kantajakaasun kanssa. Tämän jälkeen seos jaetaan kahteen erisuureen osaan, joista pienempi osa johdetaan kolonniin ja toinen ohjataan jätteeseen.

Injektorissa on yleensä kaksi venttiiliä (kuva 5), joista toinen on septumin huuhtelua varten ja siitä kulkee vain vähäinen virtaus (2-5 ml/min).<sup>5</sup> Septumin huuhtelu estää septumin vuodosta johtuvan kontaminoitumisen. Toinen venttiili on ohivirtausventtiili, jonka virtauksella voidaan säätää jakosuhdetta. Jakosuhte voidaan laskea kaavalla (4).

$$\text{jakosuhte} = \frac{\text{ohivirtaus} + \text{kolonniin virtaus}}{\text{kolonniin virtaus}} \quad (4)$$



Kuva 5. Jako-/suorainjektori.<sup>11</sup>

Jakosuhteet vaihtelevat yleensä välillä 10:1 – 500:1 riippuen kolonnista ja analyysistä.<sup>5</sup> Ongelmia jakoinjektion kanssa voi aiheuttaa näytteen ja kantajakaasun huono sekoittuminen, injektorin lämpötila ja näytteen tyyppi, erityisesti liuottimen haihtuvuus. Vaikka näytteen haihtumisen tulee tapahtua nopeasti, niin liian korkea injektorin lämpötila voi aiheuttaa näytteen alkuperäisten analyyttien suhteiden muuttumista kolonniin johdettavassa osassa. Koko injektorin tulisi olla samassa lämpötilassa, jottei esimerkiksi ohivirtausventtiiliin kondensoidu näytettä, jolloin kondensoitunut näyte voi vaikuttaa jakosuhteeseen.

Injektorin sisäputki on tärkeässä asemassa varsinkin, jos näytteessä esiintyy hiilivetyjä, joilla on suuria kiehumispiste-eroja.<sup>5</sup> Tällaisella näytteellä on mahdollista selektiivisyyden kärsiminen ja se pahenee, jos sisäputki on liian kapea.

### **3.1.2 Suorainjektio**

Jakoinjektion huonoin puoli on näytteestä hukkaan menevän osuuden suuruus, jolloin menetelmän herkkyys kärsii.<sup>5</sup> Tämä korostuu, jos tehdään analytiikkaa pienillä pitoisuuksilla tai jos näyte on monimutkainen ja analyyteilla on suuri kiehumispistealue.

Suorainjektiossa kolonnin ylikuormitusta saattaa tapahtua, mutta yleensä se johtuu ennemmin liuottimesta kuin näytteestä.<sup>5</sup> Suorainjektiossa näyte injektoidaan injektoriin, jossa ohivirtausventtiili on suljettu. Suorainjektiossa kantajakaasun virtaus on hitaampi kuin jakoinjektiossa, jolloin näytteen viipymisaika injektorissa on pidempi (1 s verrattuna 15 s aikaan). Suorainjektorin hitaamman kantajakaasuvirtauksen vuoksi injektorin lämpötilaa voidaan laskea ja silti saavuttaa näytteen tehokkaan haihtumisen.

Näytemäärät ovat suorainjektiossa suhteellisen suuria (1-5 µl) ja aika, joka näytteellä kestää siirtyä kolonniin tulee pitää lyhyenä, tulee näyte väkevöidä kolonnin suulle.<sup>5, 12</sup> Tämä onnistuu joko liuotinefektin avulla tai lämpötilan avulla keskittämällä. Suorainjektio on suhteellisen hidas injektointitapa ja se voi kestää jopa 20 s.

Lämpötilan avulla keskittämällä tarkoitetaan sitä, että kolonnin lämpötila pidetään vähintään 100 °C matalampana kuin näytteen kiehumispiste (jopa 150–200 °C).<sup>5</sup> Tämä johtaa siihen, että analyytit väkevöityvät kolonnin alkupäähän, jolloin liuotin ja muut helposti haihtuvat yhdisteet eluotuvat. Kun kolonnin lämpötila kohoaa, analyytit, joiden

kiehumispiste on korkeammalla, alkavat liikkua kolonnissa. Tätä tekniikkaa voidaan soveltaa vain analyyseissa, joissa käytetään lämpötilaohjelmaa.

Liuotinefektiä hyväksi käytettäessä kolonnin lämpötila on 10-30 °C alempi kuin liuottimen kiehumispiste.<sup>5</sup> Tästä johtuen liuotin muodostaa kolonnin sisäpintaan kerroksen, joka toimii stationaarifaasin tavoin, pidättäen näytemolekyylejä. Liuotin haihtuu vähitellen kantajakaasun mukana ja kolonnin pidätysominaisuudet palaavat normaaliksi, jolloin näytemolekyylit voivat lähteä liikkeelle. Tämän tekniikan käyttäminen vaatii tarkasti valittuja liuottimia ja kolonnin lämpötilaa. Esimerkiksi poolinen liuotin ja pooliton stationaarifaasi eivät tuota toivottua tulosta.

### **3.1.3 Kolonniin injektio**

Näyte voidaan myös injektoida suoraan kolonniin.<sup>5</sup> Tällöin näyte ei altistu edes injektoinnin aikana kuumalle metallille, joka voisi aiheuttaa katalysoidun reaktion, eikä analyyttien suhteisiin tule muutoksia injektorissa. Kolonnin lämpötila pidetään injektoinnin ajan liuottimen kymmenen asteen sisällä kiehumispisteessä. Tämän jälkeen sen lämpötila nostetaan halutuksi tai aloitetaan lämpötilaohjelma. Kolonniin injektion hyväksi puoleksi lasketaan septumin puuttuminen, koska se korvataan venttiilillä. Injektiossa voidaan käyttää myös piipohjaista ruiskua. Kolonniin injektio aiheuttaa kolonnin likaantumista huomattavasti enemmän kuin edellä esitellyt menetelmät, sillä koko näytemäärä, myös mahdolliset haihtumattomat yhdisteet, injektoidaan kolonniin. Tästä syystä kolonnin elinikä lyhenee.

### **3.1.4 Muut injektiotekniikat**

Kolonniin injektion huonoin puoli on haihtumattomien yhdisteiden syöttäminen kolonniin ja jako- sekä suorainjektiossa huonoin puoli on näytteen suhteiden muuttuminen ja analyyttien mahdollinen katalyyttinen hajoaminen.<sup>5</sup> Kylmäinjektiossa pyritään selättämään nämä ongelmat, syöttämällä koko näyte kylmään injektoriin, minkä jälkeen injektorin lämmitetään vasta kun injektioneula on vedetty pois sieltä. Siirtyminen kolonniin tapahtuu samalla tavalla kuin suorainjektiossa. Huonona puolena saattaa ilmetä kaksoispiikkejä helposti haihtuvilla yhdisteillä.

Kylmäinjektio sopii lähes kaikille näytetyypeille ja se on usein paras injektiotapa näytteille, joissa analyyttien erottumisessa on ongelmia.<sup>5</sup> Toisaalta monesti yksinkertaisemmat tavat takaavat aivan yhtä hyviä tuloksia. Injektoinnin optimointiin vaikuttaa moni eri tekijä, kuten liuottimet, injektorin osat, lämpötilat, kantajakaasun virtausnopeus, näytteen injektioisuus ja näytteen koko.

### **3.2 Derivatisointi**

Orgaanisista yhdisteistä vain 10–20 % on mahdollista mitata suoraan GC:lla, sillä ne ovat joko haihtumattomia tai termisesti epävakaita.<sup>5</sup> Esimerkkeinä haihtumattomista yhdisteistä ovat monet biologiset näytteet, kuten proteiinit ja hiilihydraatit, jotka voidaan derivatisoida niiden kiehumispisteiden alentamiseksi. Joskus voidaan käyttää myös muita analysointitekniikoita, kuten nestekromatografia, mutta monesti GC on silti suotuisampi paremman herkkyuden takia.

GC:n käyttäminen vaatii kuitenkin esikäsitteilyä oikealla derivatisoinnilla, eli analyyttien muokkaamista GC:lle paremmin soveltuviksi.<sup>5</sup> Derivatisoinnin tekemiseen voi olla useita syitä, kuten haihtuvuuden parantaminen, haihtuvuuden vähentäminen, lämpötilan keston parantaminen, ilmaisinvasteen parantaminen tietyille funktionaalisille ryhmille, esimerkiksi isomeerien erottelun parantaminen ja piikkien muodon parantaminen korvaamalla reaktiivisia vetyatomeja, kuten karboksyylihappojen esteröinnissä.

Haihtuvuuden muutoksilla haetaan mahdollisuutta laskea kolonnilämpötilaa, joka on tärkeää kolonnin eliniän lisäämiseksi tai hidastaa erittäin haihtuvien yhdisteiden eluoitumista ja siirtää piikkiä kauemmas mahdollisesta liuotinpiikistä.<sup>5</sup> Haihtuvuuden heikentäminen voi myös poistaa tarpeen kryogeeniselle jäähdyttimelle.

Derivatisointi ei kuitenkaan ole ongelmaton.<sup>5</sup> Sen tarve lisää esikäsitteilyä ja voi johtaa analyttihäviöön. Lisäksi derivatisointikemikaalin ylijäämä voi vaurioittaa kolonnia, jos sitä ei poisteta ennen injektiota. Tästä syystä derivatisointikemikaalilla on muutamia edellytyksiä. Se ei saa aiheuttaa rakenteellisia muutoksia näytteeseen, mutta sen tulee derivatisoida 95-100 % näytteestä. Derivatisoinnin tulee kestää ajan funktiona, eikä se saa aiheuttaa näytteen vähenemistä. Derivatisoitu näyte ei saa myöskään reagoida kolonnin kanssa.

Yleisesti käytettyjä derivatisointireaktioita ovat asetylointi, alkylointi, oksiimin muodostus, pyrolyyttinen metylaatio, silylointi ja transesteröinti.<sup>5</sup> Näistä silylointi on eniten käytetty ja monipuolisin derivatisointimenetelmä. Siinä aktiivinen vetyatomi korvataan trialkyylisilyyliryhmällä. Silylointi vähentää yhdisteen poolisuutta ja vähentää yhdisteen mahdollisuutta muodostaa vetysidoksia, jolloin haihtuvuus paranee.

### 3.3 GC-GC -kromatografia ("heart-cut")

Yhdellä kolonnilla tehty kaasukromatografia ei aina pysty antamaan halutun kaltaisia tuloksia, joten on pyritty parantamaan erotuskykyä lisäämällä toinen kolonni ensimmäisen perään.<sup>13</sup> Ongelmana kahden kolonnin käyttämisessä on se, että toinen kolonni auttaa joidenkin yhdisteryhmien erottamisessa, mutta saattaa myös yhdistää joitakin ensimmäisen kolonnin erottamia ryhmiä.

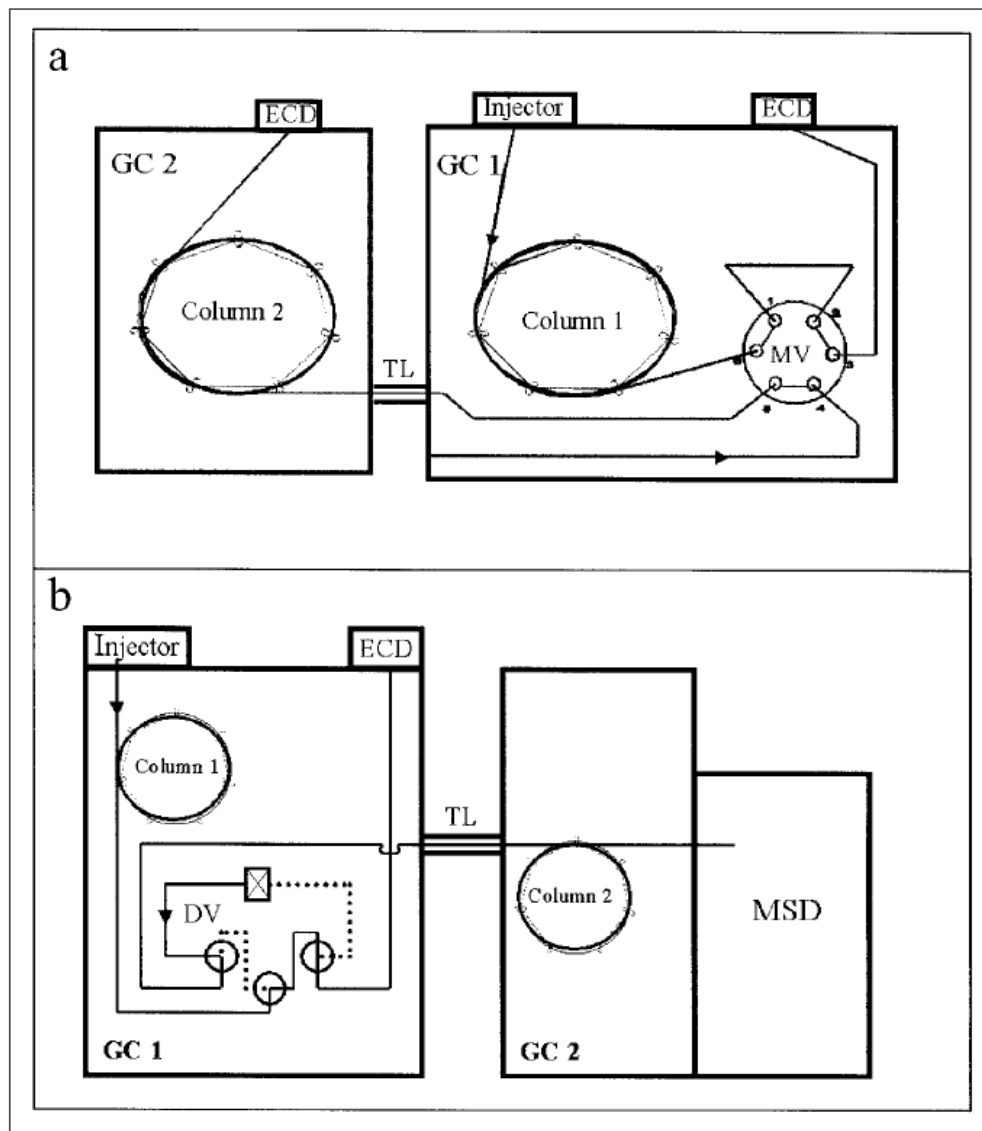
Moniulotteinen kaasukromatografi on määritelmän mukaan mikä tahansa analyysilaitte, joka yhdistää kaksi erillistä erotteluvaihetta, joista ainakin yksi on kaasukromatografi.<sup>13</sup>

"Heart-cut" -GC:ssa yksi tai useampi fraktio johdetaan toiseen kolonniin, jossa on erilainen poolisuus kuin ensimmäisessä kolonnissa.<sup>13</sup> Yleensä ensimmäinen kolonni on pooliton (30-60 m) ja toinen kolonni (30 m) poolisempi kolonni. Fraktio voidaan suoraan johtaa toiseen kolonniin tai säilöä kryogeeneeseen ansaan, eli erittäin matalien lämpötilojen avulla näytettä säilövään laitteeseen, ja syöttää myöhemmin toiseen kolonniin. Tämä mahdollistaa sen, että useammasta injektiosta voidaan kerätä kyseistä fraktiota ja syötetään vasta suurempi määrä näytettä toiseen kolonniin.

Yksinkertaisimmillaan "heart-cut"-GC:n rakenteeseen kuuluu GC-uuni, kaksi kolonnia, kaksi ilmaisinta ja kolonninvaihdivähdinsysteemi.<sup>13</sup> Ongelma tässä rakenteessa on se, että kolonnit ovat samassa uunissa ja niillä on yhteinen lämpötilaohjelma. Tämän voi kiertää ottamalla fraktiot, joita halutaan tutkia kiinni ja ajamalla ne myöhemmin toisen kolonnin läpi erilaisella lämpötilaohjelmalla. Toinen vaihtoehto on käyttää kahta erillistä uunia, jotka on yhdistetty lämmitetyllä siirtolinjalla.

Kahden uunin systeemissä käytetään samaa metodologia kuin injektioinnissa, eli toisen kolonnin lämpötila on alhaisempi kuin siirtolinjan, jolloin se tiivistyy kolonnin alkupäähän, kunnes lämpötilaohjelma alkaa.<sup>13</sup>

Kahden kolonnin välillä on vaihdin, joka määrittää ajan, jolloin ensimmäisestä kolonnista siirtyy näytettä toiseen kolonniin.<sup>13</sup> Vaihdin on tärkein osa systeemiä. Yleisimmin käytetyt vaihtimet ovat mekaanisista venttiileistä koostuva laite tai Deanin painevaihdin. Kuvassa 6 on kaaviokuvat erilaisilla vaihtimilla varustetuista kromatografeista. Venttiileissä voi esiintyä ongelmia, kuten vuotoja lämpötilaeroista johtuen, kuolleen tilavuuden lisääntymistä ja näytteen adsorboitumista, mutta ne ovat helppoja käyttää ja halpoja. Venttiilittömässä Deanin painevaihtimessa samankaltaisia ongelmia ei ole, mutta sen käyttöönotto on aikaa vievää ja haastavaa, sillä virtaussuunta riippuu kolmen t-kappaleen paine-eroista.



Kuva 6. ”Heart-cut”-GC:n kaaviokuva.<sup>13</sup> Ylemmässä mekaaninen venttiilivaihdin ja alemmassa Deanin vaihdin.



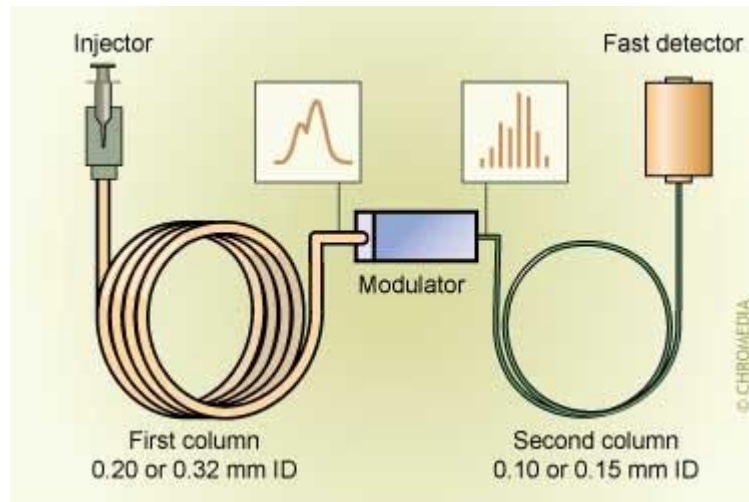
”Heart-cut”-GC:ssa voidaan käyttää samoja ilmaisimia kuin 1D-GC:ssa, kuten liekki-ionisaatioilmaisinta (flame ionization detector, FID), elektronisieppausilmaisinta (electron capture detector, ECD) tai massaspektrometria (mass spectrometer, MS).<sup>13</sup> Näytteiden tulee olla puhtaita, sillä epäpuhtaudet vaikuttavat retentioaikaan, jolloin tietyn fraktion siirtäminen toiseen kolonniin hankaloituu. Sisäisten standardien käyttö auttaa oikean aikaikkunan löytämisessä vaihtimelle.

### 3.4 GC x GC -kromatografia

Kokonaisvaltaisuus menetelmän nimessä johtuu siitä, että koko näytemäärä käy molempien kolonnien erotuksen.<sup>14</sup> Tästä johtuen on mahdollista tunnistaa erittäin suuri määrä erilaisia yhdisteitä verrattuna 1D- tai ”heart-cut”-menetelmiin. Tämä vaatii kuitenkin ortogonaalisuutta kolonneilta, mikä tarkoittaa sitä, että kolonnit ovat täysin erillisiä.

GC x GC-laite koostuu samalla tavalla kahdesta kolonnista kuin laitteessa GC-GC, mutta niiden välissä on vaihtimen sijasta modulaattori (kuva 7).<sup>14</sup> Modulaattori kerää aina pienen fraktion ensimmäisen kolonnin virrasta ja vapauttaa sen toiseen kolonniin. Kolonnit ovat myöskin lyhempiä kuin ”heart-cut”-tekniikassa.

Modulaattorin toimintaintervalli, eli aika, jonka se kerää näytettä ennen kuin se vapauttaa näytefraktion toiseen kolonniin on lyhyt, yleensä 3-6 s.<sup>14</sup> Modulaattoreita on kahdentyyppisiä, kuten ”heart-cut”-vaihtimiakin. Toinen on lämpömodulaattori ja toinen venttiilimodulaattori. Lämpömodulaattoreita on vielä kahden eri tyyppisiä, kryogeenisiä ja lämmitettäviä.



Kuva 7. GC x GC-laitteiston yksinkertaistettu kaaviokuva.<sup>15</sup>

Lämpömodulaattoreiden hyötynä venttiilimodulaattoreihin verrattuna on näytteen keskittyminen pienelle alueelle ennen injektiota toiseen kolonniin.<sup>14</sup> Tästä syystä injektiovyöhyke on erittäin kapea, 10-60 ms. Ilmaisinpäässä vyöhykkeen leveys vaihtelee kymmenistä satoihin millisekunteihin.

Kryogeenisissä modulaattoreissa käytetään joko L-N<sub>2</sub> (nestettyä) tai L-CO<sub>2</sub> (nestämäästä hiilidioksidia) jäähdyttämään kaasuvirtaa.<sup>14</sup> Näissä tapauksissa tarvitaan lämpöä, jotta vangitut molekyylit saadaan takaisin liikkeelle. CO<sub>2</sub>:n tapauksessa uunin lämpötila riittää, mutta N<sub>2</sub>:n tapauksessa lisälämmitys on tarpeen. Kryogeenisten modulaattoreiden ongelmana on jäähdytykseen käytettävän aineen suuri kulutus.

Venttiilimodulaattorit koostuvat useista venttiileistä, jotka toimivat suurella nopeudella.<sup>14</sup> Analyytit eivät väkevöidy yhteen samalla tavalla kuin lämpömodulaattoreissa. Lisäksi venttiilisysteemin takia koko näyte ei kulje toiseen kolonniin. Toisaalta venttiilimodulaattorissa ei ole kuluvia osia ja se on erittäin edullinen ja kestävä. On myös kehitetty venttiilimodulaattori, jolla voidaan siirtää koko näyte toiseen kolonniin.<sup>16</sup>

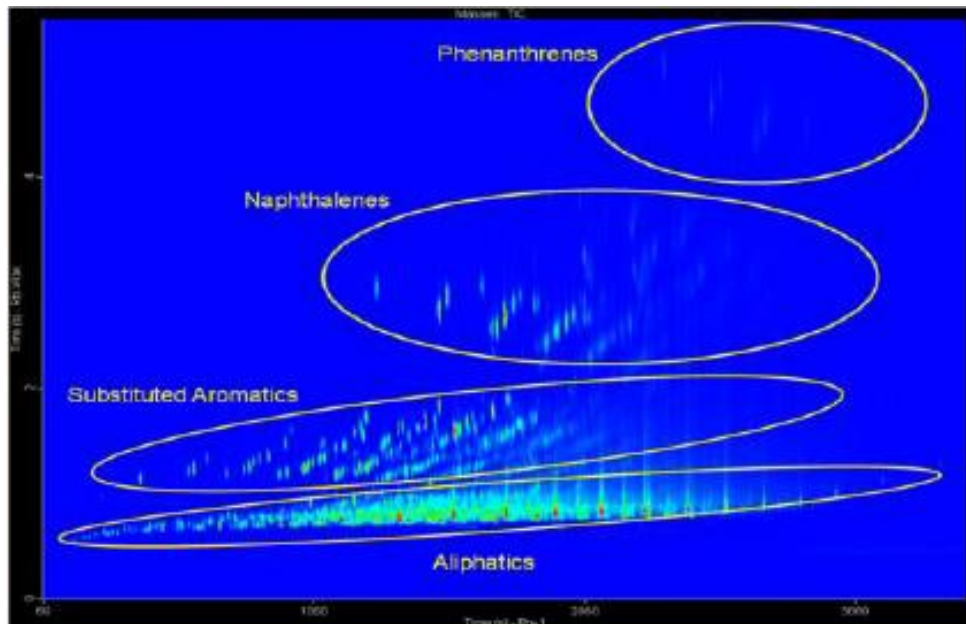
Yleensä ensimmäinen kolonni on pidempi, siinä on suurempi sisähalkaisija, ja stationaarifaasin paksuus on suurempi kuin toisessa kolonnissa.<sup>14</sup> Samoin kuin ”heart-cut”-menetelmässä ensimmäinen kolonni on usein pooliton ja toinen kolonni poolinen tai semipoolinen. Ensimmäisen kolonnin erottelu perustuu kiehumispisteisiin ja toisen kolonnin poolisuuteen. Ensimmäisen kolonnin pituus on yleensä 20-30 m, sisähalkaisija 0,25 mm ja filmin paksuus 0,25 µm. Toisen kolonnin vastaavat mitat ovat 1 m, 0,1 mm ja 0,1 µm.

Jos ortogonaalisuus toteutuu GC x GC-systeemissä, niin erotuskapasiteetti kasvaa kolonnien kapasiteettien tulona.<sup>14</sup> Esimerkiksi normaalin 1D-GC:n kapasiteetti  $n_{c1}$  on noin 200. Toisen kolonnin  $n_{c2} = 20$ , jolloin tulona saadaan 4000. Sama erotuskapasiteetti olisi teoreettisesti mahdollista saavuttaa 1D-GC:lla, kun kolonnin pituus olisi 4 km ja sisähalkaisija 0,25 mm. Maailman pisin GC-kolonne on vain 1321 m pitkä.

Yleensä kolonnit sijaitsevat samassa uunissa, mutta jos niille halutaan erilliset lämpötilaohjelmat, ne voidaan sijoittaa eri uuneihin.<sup>14</sup> Tyypillinen lämpötilaohjelma sisältää alussa ja lopussa isotermiset jaksot ja välissä lämmitys on suhteellisen hidasta, 2-5 °C/min. 1D-GC:ssa lämmitysnopeus on yleensä 10-25 °C/min.

Koska kolonneilla kantajakaasun virtausmäärä on sama, mutta niillä on eri sisähalkaisija, niin toisessa kolonnissa lineaarinen virtausnopeus on korkeampi.<sup>14</sup> Tästä syystä kummankin kolonnin optimaalista virtausnopeutta on mahdoton saavuttaa ja kahden kolonnin virtausnopeuksien välillä tulee tehdä kompromissi. On osoitettu, että toisen kolonnin virtausnopeus kannattaa olla lähellä optimia.<sup>12</sup>

GC x GC-kromatografi tuottaa kromatogrammin (kuva 8), jossa x-akselilla on ensimmäisen dimension erotus, y-akselilla toisen dimension erotus ja z-akselilla ilmaisimen vaste, eli analyytin intensiteetti.<sup>14,17</sup> Usein z-akseli projektoidaan 2D-tasoon ja intensiteetti ilmaistaan värikartan avulla. Kromatogrammissa saman tyyppiset yhdisteet ovat niiden ominaisilla alueilla. Esimerkiksi *n*-alkaanit ja niiden isomeerit muodostavat niin kutsutun kattotiilipatterin. Samoin alkeenit, sykliset yhdisteet ja aromaattisen yhdisteet muodostavat omat luonteenomaiset alueensa. Jos näytteessä on moninaisia yhdisteitä ja yhdisteryhmiä, kromatogrammi ei välttämättä ole kuitenkaan hyvin rakentunut.



Kuva 8. GC x GC-kromatogrammi, missä hiilivetyryhmien sijainnit merkattuna.<sup>18</sup>

### 3.4.1 Kolonnit

Useimmiten GC:ssa käytetään avoputkikolonnieja, jotka koostuvat silikaputkesta, joka on pinnoitettu polyimidillä kestävyuden parantamiseksi.<sup>14</sup> Kolonnin sisäpinnalla on stationaarifaasikerros. Kolonnien järjestyksessä sijoitetaan yleensä pooliton kolonni ensin ja on samanlainen kuin normaalissa 1D-GC:ssa. Toinen kolonni on yleensä semipoolinen tai poolinen ja se on vain 1-3 m pitkä ja sisähalkaisijaltaan pienempi kuin ensimmäinen kolonni. Tästä johtuen lineaarinen virtausnopeus kasvaa noin kymmenkertaiseksi toisessa kolonnissa verrattuna ensimmäiseen kolonniin. Poolittomiin kolonnieihin kuuluu esimerkiksi 100 % dimetyylipolysiloksaanikolonni ja vähäfenyylinen (5 %) kolonni. Semipoolisiin kuuluu korkeafenyylikolonnit (35-50 %) ja vähäsyaaniset (6-14 %) kolonnit. Pooliset kolonnit voivat olla korkeasyaanisia (yli 50 %), trifluoropropyli- tai polyetyleeniglykolikolonnieja.

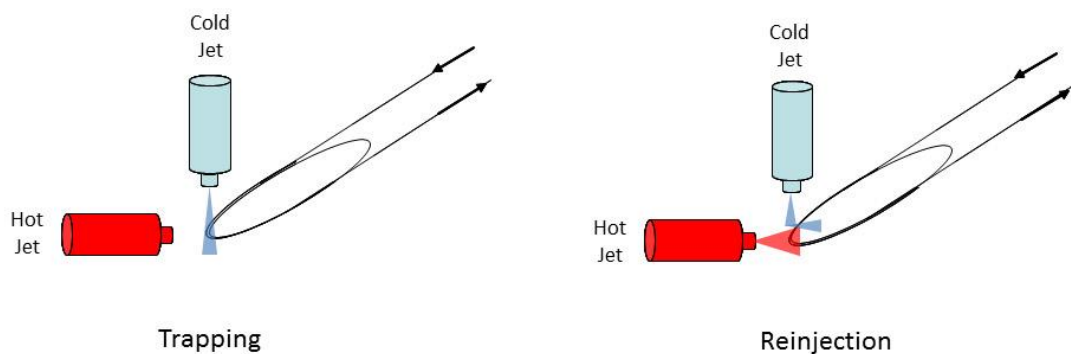
Kolonnit voi myös asettaa päinvastaiseen järjestykseen, jolloin pooliton kolonni on vasta toisena ja poolisempi kolonni ensimmäisenä.<sup>19</sup> Ensimmäisessä vaihtoehdossa kolonnit tekevät erottelun ensin kiehumispisteen mukaan ja toisessa kolonnissa poolisuutensa perusteella

Ensimmäisen kolonnin pidentäminen ja lämpötilaohjelman hidastaminen (pienempi °C/min korotus) aiheuttavat molemmat analyysien keston pitenemistä, mutta

parantavat erottelutehokkuutta.<sup>19</sup> Näistä kolonnin pidentäminen on tehokkaampi ratkaisu. Toisen kolonnin kohdalla erottelutehokkuuden parantamiseen voidaan vaikuttaa kolonnin sisähalkaisijaa pienentämällä tai lämpötilaohjelmaa hidastamalla (vain kahden erillisen uunin tapauksessa). Ensimmäisen kolonnin muokkaaminen on ensisijainen tapa parantaa erottelua ja toisen kolonnin muokkaamisessa tulee olla tarkkana ylikuormituksen varalta.

### 3.4.2 Kryogeeninen modulaattori

Kryogeeninen modulaattori toimii kaksivaiheisesti kuvan 9 mukaisesti. Ensin kylmäilmapuhallus pysäyttää ensimmäisestä kolonnista saapuvan näytevirran modulaatioajaksi paikalleen.<sup>20</sup> Tämän jälkeen lyhyt kuumailmapuhallus vapauttaa pysäytetyn fraktion liikkeelle kolonnin vapaaseen osaan. Näytefraktio saapuu uudestaan kylmäilmapuhalluksen vaikutuspiiriin. Tällöin moduloitu osa näytteestä keskittyy kapeaksi vyöhykkeeksi, sillä kuumennuksen aikana pysäytetyn fraktion lisäksi ensimmäisestä kolonnista saapuu koko kuumennuksen ajan lisää näytettä, joka muodostaa leveän vyöhykkeen. Seuraavan syklin lämmitys päästää uudelleen keskitetyn kapean vyöhykkeen vapaaksi, jolloin toisen kolonnin erottelu voi alkaa. Eli käytännössä toisen dimension kolonnista osa menee modulaattorin käyttöön ja vain modulaation jälkeinen osa kolonnista hoitaa erottelun.



Kuva 9. Kryogeenisen modulaattorin toimintaperiaate.<sup>21</sup>

## 4 Havainnointi GC x GC-menetelmässä

Toisen kolonnin ollessa lyhyt ja lineaarisen virtausnopeuden ollessa suuri, toisesta kolonnista eluoituu vain kapea vyöhyke analyytteja, vain kymmeniä–satoja millisekunteja.<sup>14</sup> Tämä vaatii ilmaisimelta suurta havainnointinopeutta. Tähän tarkoitukseen käytetään 50-200 Hz:n ilmaisimia.

Vaihtoehtoisia ilmaisimia ovat FID, TOF-MS (lentoaikamassaspektrometri), qMS (kvadrupolimassaspektrometri) ja ECD.<sup>14</sup> FID toimii hyvänä kvantitointi-ilmaisimena, mutta sen kvalitatiiviset ominaisuudet eivät yllä MS:n tasolle ja sama toisinpäin. ECD toimii hyvin halogeeneja sisältävien orgaanisten yhdisteiden mittauksessa.

GC x GC-kromatografilla voidaan myös tunnistaa sekoitussuhteita esimerkiksi biodieselin ja fossiilisen dieselin suhdetta voidaan mitata kalibraatiosuoran avulla.<sup>24</sup> Monissa fossiilisissa dieleseissä käytetään biodieseliä lisäaineena ja tämän ilmoitetun suhteen valvonnassa voidaan hyödyntää GC x GC-menetelmää erittäin tarkasti.

### 4.1 Massaspektrometrit

Massaspektrometreja on viittä eri tyyppiä.<sup>25</sup> Magneettisia sektori-, kvadrupoli-, ioniloukku-, lentoaika- ja Fourier-muunnosmassaspektrometreja. 2D-GC:ssa käytetään yleensä joko TOF-MS:a tai nykyään myös qMS:a. TOF-MS-laitteet ovat kalliimpia ja suurempia fyysisesti, mutta niiden havainnointinopeus on huomattavasti suurempi kuin qMS:lla. Kuitenkin qMS-laitteet ovat kehittyneet ja niilläkin pystytään saavuttamaan tarpeeksi suuri havainnointinopeus 2D-GC:tä varten.

Massaspektrometri toimii siten, että kaasumainen näyte ohjataan ionisaatiokammioon, jossa neutraaliin molekyyliin tuodaan lisää energiaa, minkä johdosta se hajoaa erikokoisiksi ionifragmenteiksi.<sup>25</sup> Näiden fragmenttien suhde on yksilöllinen eri molekyylielle. Kuitenkin vain pieni osa näytemolekyyleista ionisoituu, jolloin spektrometrissa esiintyy myös niin kutsuttu massapiikki, joka on suurimmalla massaluvulla ja kertoo näytemolekyylin alkuperäisen massan.

Massaspektrometreissa käytetään erilaisia ionisointitekniikoita sovelluksesta riippuen.<sup>25</sup> Vaihtoehtoisia ionisointitapoja ovat elektronipommitus, sähkökenttäionisaatio, kemiallinen ionisointi, ionisaatio ilmanpaineessa ja desorptioionisaatio. Eri menetelmissä

on muuttuva ionisoiva tekijä, kuten elektronit, kaasumaiset ionit, sähkökenttä tai uv-säteily.

Elektronipommitusionisaatiossa (EI) kuuma filamentti eli hehkulanka emittoi elektroneja (energialtaan 70 eV), jotka törmätessään näytemolekyyleihin aiheuttavat ionisoitumisen.<sup>25</sup> Ionisaatiokammio on korkeassa vakuuissa ( $10^{-5} - 10^{-4}$  mmHg), jotta ilma ei häiritse elektronipommitusta. Elektronipommituksen seurauksena näytemolekyylit pilkkoutuvat ja näin muodostuneet ionit ovat tunnistettavissa hajoamispatteereista.

Kemiallinen ionisaatio (CI) on kevyempi tapa ionisoida ja se ei aiheuta niin paljon molekyylien pilkkoutumista kuin elektronipommitus.<sup>25</sup> Yleensä kemiallisessa ionisaatiossa käytetään hyväksi erillistä kaasua, joka ionisoidaan samaan tapaan kuin EI:ssa. Tällä tavalla muodostuneet ionit johdetaan näytevirtaan. C-C-sidosten katkeamista ei tapahdu juurikaan, joten spektri on erilainen kuin EI:n avulla saatu spektri. Varauksenvaihto ionisaatio on CI:n erikoistapaus, jossa ionisoivana kaasuna käytetään aproottista kaasua. Muut ionisointitavat ovat harvinaisia.

#### 4.1.1 Magneettinen sektorimassaspektrometri

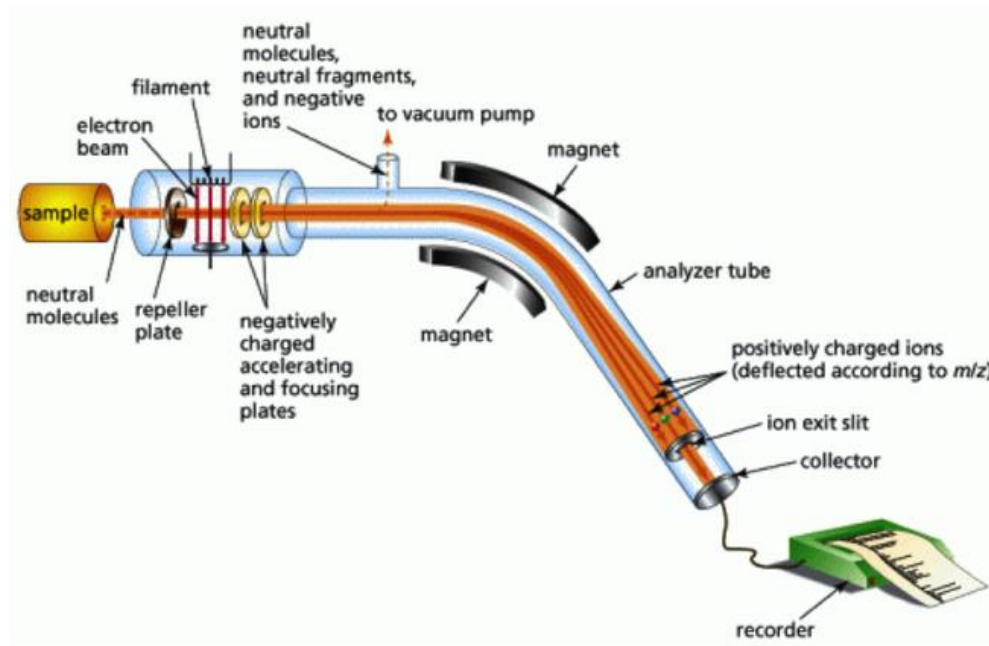
Sektorilaitteet ovat lohkon muotoisia ja niissä on magneettikenttä keskellä taivutettua putkea.<sup>25</sup> Magneettikentän vaikutuksesta heterogeeninen ionisuihku jakautuu eri  $m/z$ -lukujen (massan suhde varauslukuun) mukaan erillisiksi suihkuiksi. Ionisointikammion jälkeen ionisuihku kiihdytetään tietyllä potentiaalilla ja ionien kineettinen energia on yhtälön (5) mukainen.

$$zeV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (5)$$

Yhtälössä  $z$  on varausten määrä ionissa,  $e$  varauksen suuruus,  $m$  ionin massa ja  $v$  ionin nopeus.<sup>25</sup> Lisäksi voidaan johtaa yhtälö (6) magneettikentän vaikutuksesta ionin lentorataan, josta huomataan ionin momentin ( $mv$ ) vaikuttavan sen kaareutumiseen magneettikentässä. Yhtälössä  $B$  on magneettikentän voimakkuus ja  $r$  kaareutumisen säde.

$$r = \frac{mv}{zeB} \quad (6)$$

Tästä johtuen vain tietyllä säteellä kaareutuvat ionit saapuvat ionin poistumisraon kautta ilmaisimelle (kuva 10).<sup>25,26</sup> Jotta koko näyte saadaan havainnoitua, pitää joko kiihdytysjännitettä ( $V$ ) tai magneettikentän voimakkuutta ( $B$ ) säädellä mittauksen ajan.



Kuva 10. Sektorimassaspektrometrin kaaviokuva.<sup>26</sup>

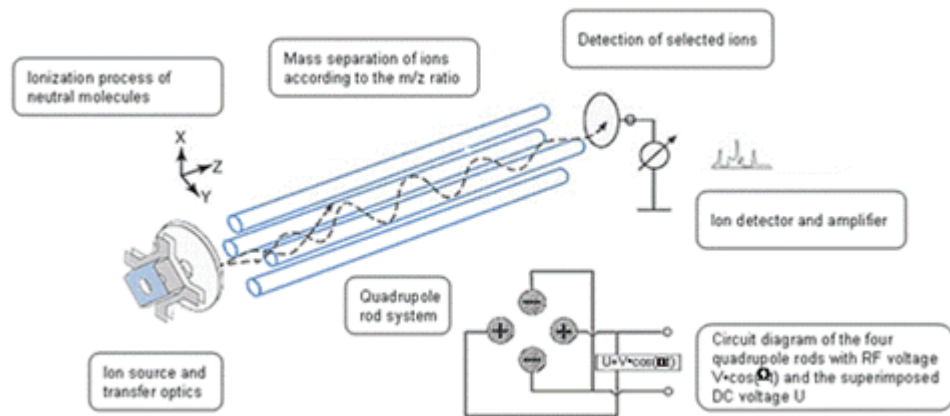
Yleensä on tehokkaampaa säädellä magneettikentän voimakkuutta, sillä kiihdytysjännitteen alentaminen saattaa vaikuttaa ionien siirtymiseen ja havainnointiin.<sup>25</sup> Magneettikentän säätelyssä rajoituksena tulee liian nopea magneettikentän voimakkuuden vaihtelu, jolloin tietty ioni saattaa olla vielä magneettikentässä, kun voimakkuus jo muuttuu, jolloin ionin rata muuttuu. Tämän takia sektorilaite on hidas skannaamaan koko mitattavan massa-alueen.

#### 4.1.2 Kvadrupolimassaspektrometri

qMS:ssa ei ole magneetteja, vaan se käyttää tasavirran (DC) ja radiotaajuuden (RF) yhdistelmää ionien massasuodattamiseen.<sup>25</sup> Nimensä mukaisesti qMS koostuu neljästä samansuuntaisesta sauvasta, jotka ovat aseteltu symmetrisesti (kuva 11). Sauvat ovat hyperbolin mallisia poikkileikkaukseltaan. Vastakkaisissa sauvoissa on sama tasavirran jännite (negatiivinen tai positiivinen) ja oskilloiva radiotaajuus. Ionisointikammiosta ionit kiihdytetään kvadropolien keskelle, jossa massaerottelu tapahtuu.



Riippuen oskilloivan radiotaajuuden vaiheesta osa ioneista törmäävät sauvoihin, eivätkä saavu ilmaisimelle.<sup>25</sup> Tämä riippuu sauvojen jännitteistä. Jotta saataisiin massa-alueen kaikki ionit mitattua, jännitteet tulee skaalata pienimmästä arvosta suurimpaan. DC:n ja RF:n välinen suhde pidetään kuitenkin samana. Maksimijännitteet ovat DC:lle 400 V ja RF:lle 2000 V.

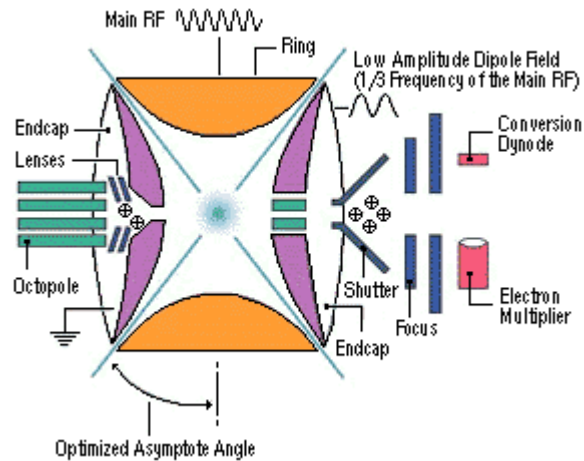


Kuva 11. Kvadrupolimassaspektrometrin kaaviokuva.<sup>27</sup>

Rajoitteena qMS:ssa on, yhtä lailla kuin sektorilaitteissa, ionin matka-aikana tapahtuva jännitteen muutos, mitä ei saisi tapahtua.<sup>25</sup> Esimerkkinä suuruudeltaan 800 u painava ioni, jonka liike-energia on 10 eV vaatii 129  $\mu$ s kvadrupolin, jonka pituus on 20 cm, läpäisemiseen. Jos halutaan, ettei massa muutu lentoajan aikana kuin 0,1 u teoreettinen massa-alue, jota voi mitata on 780 u/s.

#### 4.1.3 Ioniloukkumassaspektrometri

Kvadrupoli-ioniloukkumassaspektrometri (qIT) (kuva 12) perustuu tasavirtaan ja radiotaajuuden avulla luotuun muuttuvaan sähkökenttään kuin qMS.<sup>25,29</sup> Ioniloukku koostuu monopolista, joka on ympyrän mallinen, sekä pohja- ja kansilevyistä ja ne on eristetty sähköisesti toisistaan. Sähkökenttää muuttamalla ohjataan tietty fraktio ilmaisimelle. Myös ionisyklotroniresonanssitekniikkaa (ICR) käyttävät massaspektrometrit ovat ioniloukkuja, mutta ne käyttävät radiotaajuuksien sijasta muuttuvaa magneettikenttää.



Kuva 12. qIT:n kaaviokuva.<sup>28</sup>

Ionit vangitaan pieneen tilavuuteen monopolin keskelle ja päällys- ja aluslevyn väliin.<sup>29</sup> Massaspektrometria käytetään yleensä massaselektiivisellä ohjelmalla, jolloin vangituista ioneista vapautetaan kerrallaan tietyllä  $m/z$ -suhteella olevat ionit ja lähetetään ilmaisimelle. Inertin kaasun, kuten heliumin lisääminen spektrometriin helpottaa ionien säilymistä spektrometrissa, sillä ionien törmäykset kaasun kanssa vähentävät ionien kineettistä energiaa.

Ioniloukun erityispiirteenä siihen voidaan varastoida tiettyjä ioneita siksi aikaa, kunnes niitä on tarpeeksi analyysin suorittamiseen.<sup>29</sup> Tällä tavoin voidaan saavuttaa erittäin suuri analyysiherkkyys. Ongelma tulee liian suuren ionimäärän varastoimisessa, sillä ionien väliset hylkivät vuorovaikutukset suistavat näyteioneja pois loukusta, jolloin niitä ei havaita ilmaisimella.

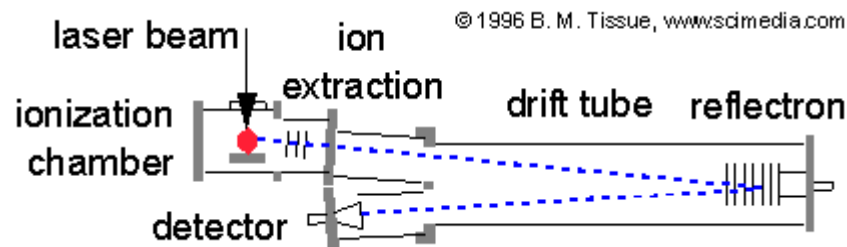
#### 4.1.4 Lentoaikamassaspektrometri

Lentoaikamassaspektrometrin (TOF-MS) toimintaperiaate on yksinkertainen.<sup>25</sup> Tuotetut ionit lähetetään diskreetteinä paketteina kulkemaan ilmaisinta kohti, joka sijaitsee 1-2 m:n päässä ionilähteestä (kuva 13). Ionit kiihdytetään samalla jännitteellä, mutta lentokammio on varaukseton, joten eri massaiset ionit saapuvat eri aikaan ilmaisimelle. Kevyemmät ionit saavuttavat ilmaisimen ensin ja raskaammat myöhemmin, sillä niiden nopeudessa on eroja, jotka voi laskea kaavan (7) mukaan.

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad (7)$$

Nopeuden mittaamisen sijasta mitataan spektrometrin nimen mukaisesti lentoaikaa, josta saadaan tiedetyn lentomatkan avulla nopeus kaavan (8) avulla.<sup>25</sup>

$$TOF = \frac{L}{v} = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} L \quad (8)$$



Kuva 13. Lentoaikamassaspektrometrin kaaviokuva.<sup>30</sup>

Ionisaatio voi olla joko jatkuvaa tai jaksottaista.<sup>25</sup> Jatkuva ionisaatio tarkoittaa 60-80  $\mu$ s:n jaksoa, jonka jälkeen ionisoidut molekyylit lähetetään ilmaisimelle. Jaksottaisessa ionisaatiossa ionisointijakson pituus on vain 1  $\mu$ s. Jatkuvassa ionisaatiossa ionit kerätään potentiaaliansaan, ennen niiden kiihdyttämistä lentokammioon. Jatkuvatoimisessa ionisaatiossa laitteen herkkyys kasvaa, mutta jaksottainen ionisaatio antaa paremman resoluution.

TOF-MS:n erottelukykyyä vaikuttavat lentomatkan pituus, kiihdytysjännite ja kaikkein ratkaisevimpana tekijänä avaruudellinen ja nopeudellinen jakauma tietyssä ioniryppäessä.<sup>25</sup> Teoriassa ioniryppään leveyden tulisi olla häviävän pieni ja kaikilla ioneilla tulisi olla sama energia. Käytännössä kuitenkin ioniryppäs on äärellisen kokoinen ja ioneilla on eri lämpöenergioita, joten ryppäät eivät ole täysin diskreettejä. Näitä efektejä voidaan hillitä optimoimalla elektrodien sijaintia ja jännitteiden suuruuksia. Havainnoinnin helpottamiseksi ja tarpeeksi ison vasteen saamiseksi ionien mittaukseen käytetään elektronivahvistimia ennen ilmaisinta.

#### 4.1.5 Fourier-muunnos-massaspektrometri

Fourier-muunnos-massaspektrometri (FT-MS) perustuu ionisyklotroniresonanssi-tekniikkaan (ICR).<sup>25</sup> ICR:n toiminnassa käytetään hyväksi sitä, että ionit liikkuvat magneettikentässä kaareutuen  $m/z$ -suhteelle ominaisella taajuudella. Jos ioniin tuodaan energiaa prekession taajuudella ja kohtisuorasti sitä vastaan, ioni absorboi energian. FT-MS-laitteistoa käytetään kaasufaasissa tapahtuvien reaktioiden tutkimiseen.

Ionit johdetaan kammioon, jossa on magneettikenttä.<sup>25</sup> Kun ionit ovat kammiossa, niitä viritetään taajuudet skannaavalla signaalilla, jolloin ionien pyörimisrata kasvaa ja yhtenäistyy viritystaajuuden kanssa. Kun ionien ympyräliikkeen säde on vakio, niitä voidaan havainnoida ionien tuottaman virran avulla. Koska virityssignaali käy läpi kaikki taajuudet, saatava RF-signaali on monimutkainen. Signaalille tehdään Fourierin muunnos, jolloin saadaan näytteen eri komponentit eroteltua massaspektriiksi.

Koska ionit oskilloivat loputtomasti ilman virtojen muutoksia on helppo mitata kaikki ionit tarkasti.<sup>25</sup> Tästä johtuen voidaan saavuttaa erittäin suuri resoluutio. Esimerkiksi on mahdollista mitata  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{Cl}^+$  -ionien määrien välinen ero, vaikka kyseisten massojen ero on vain kaksi elektronia.

#### 4.2 Liekki-ionisaatioilmaisin

FID on yleisesti käytetty ilmaisim GC:n yhteydessä.<sup>5</sup> Se koostuu ruostumattomasta teräksestä valmistetusta suutinkappaleesta, jonka läpi kolonnista saapuva kantajakaasuvirta kulkee ja yhdistyy vetyvirran kanssa. Tämä kaasuseos virtaa polttimoon, jota huuhdellaan ilmavirralla, jotta saadaan aikaiseksi palamisreaktio. Vedyn palaminen aiheuttaa näytepartikkeleiden ionisoitumisen ja ne kerätään polarisoidulla elektrodiparilla. Taustavirta, joka saadaan, kun ilmaisimelle virtaa vain kantajakaasua on noin  $10^{-13}$  A –  $10^{-14}$  A ja näytepartikkeleiden ionisoituessa noin  $10^{-12}$  A –  $10^{-6}$  A.

Vaikka liekki-ionisaatio onkin suhteellisen heikko ionisointitapa, FID on erittäin herkkä ja tulokset ovat lineaarisia.<sup>5</sup> FID ei havaitse kuitenkaan epäorgaanisia näytteitä. Orgaanisten aineiden analytiikassa FID tarjoaa erittäin hyvän suhteen havaittujen molekyylien ja näytteen kokonaishiilen ja kokonaisvedyn määrien suhteessa.

Epälinearisuutta on havaittavissa vain alkaanisarjan pienimpien molekyylien ja molekyylien, joissa on suuri osa happea kanssa.

FID tarvitsee toimiakseen kantajakaasua sekä vetyä ja ilmaa palamisen ylläpitämiseksi.<sup>5</sup> Kaasusuhteen on tärkeää olla oikeat, sillä muuten liekki syttyminen ja ylläpitäminen on haastavaa. Lisäksi vedyn ja kantajakaasun optimoidulla suhteella [yleensä 1,2:1 (vety:kantajakaasu)] saadaan paras lineaarisuus ja herkkyys. Ilmavirtaus ei ole niin kriittinen, mutta ilmainvaste kasvaa ilmavirran kasvaessa tiettyyn pisteeseen asti. Tämän pisteen ylittävällä ilmavirralla pitäisi toimia ja suurimmalla osalla laitteista siihen päästään virtauksella 300-600 ml/min.

Jotta saavutetaan optimoitu vety:kantajakaasu-suhde käytetään ”make up”-kaasua, jona voidaan käyttää joko heliumia tai typpeä. Vedyn virtaus tulee olla tarpeeksi korkea (30-40 ml/min), jotta FID:n liekki pysyy hengissä ja on tasainen, jolloin kolonnin virtaus (yleensä noin 1 ml/min) ei riitä virtaussuhteen säilyttämiseen. ”Make up”-kaasua käytetään lisäämään kolonnin virtausnopeutta (25-35 ml/min), jolloin saavutetaan haluttu suhde. Esimerkiksi, jos vedyn virtaus on 40 ml/min, tulee kolonnin ja ”make up”-kaasun virtaus olla yhteensä 33,3 ml/min, jolloin suhde on 1,2 ja FID:n herkkyys on parhaimmillaan.

### **4.3 Muut ilmaisimet**

On myös olemassa selektiivisiä ilmaisimia, joita käytetään vain tietyissä sovelluksissa.<sup>5</sup> Esimerkiksi halogeeneja, rikkiä, typpeä tai fosforia sisältävien näytteen tunnistamiseen. Nämä ilmaisimet ovat erityisen herkkiä kyseisille yhdisteille, joita on vaikea havaita MS- tai FID -laitteistoilla.

#### **4.3.1 Elektronisieppausilmaisin**

ECD-ilmaisinta käytetään organohalogenien mittaukseen ja on eniten käytetty selektiivisistä ilmaisimista.<sup>5</sup> ECD koostuu kammiosta, missä sijaitsee radioaktiivinen elektroninluovuttaja, yleisesti käytetään Ni<sup>63</sup>. Radioaktiivinen lähde ionisoi kantajakaasua, minkä seurauksena syntyy elektroneja. Tästä elektronivirrasta syntyy

ilmaisimen pohjavirta. Kun kammioon eluoituu elektrofiilisiä molekyyliä, ne voivat reagoida muodostuneiden elektronien kanssa joko hajottavasti (9) tai ei hajottavasti (10).



Näiden muodostuneiden ionien nopeus on pienempi kuin niiden kanssa reagoineiden elektronien, jolloin niillä on enemmän aikaa reagoida kantajakaasusta muodostuneiden positiivisten ionien kanssa.<sup>5</sup> Tällöin virrasta ”katoaa” elektroneja ja ilmaisimen pohjavirta putoaa. Tämä havaitaan ja esitetään positiivisena piikkinä mittaustuloksissa.

### 4.3.2 Liekkifotometrinen ilmaisim

Liekkifotometrinen ilmaisim (FPD) perustuu luminesoiviin emissioihin, jotka johtuvat liekissä virittyneistä energiatiloista.<sup>5</sup> Ilmaisim koostuu liekki-ionisaatiokammioista, joka on saman tyyppinen kuin FID:ssa, mutta liekin lämpötila on matalampi. Luminesenssi havaitaan liekistä lämpöeristetyllä optisella systeemillä. Vaikka on osoitettu, että FPD:lla voidaan mitata suurelta alueelta molekyyliä, sitä käytetään yleisesti lähinnä rikkiä tai fosforia sisältävien yhdisteiden havaitsemiseen. Oikeissa olosuhteissa nämä yhdisteet tuottavat kahta virittyntä muotoa,  $HPO^*$  ja  $S_2^*$ , jotka emittoivat aallonpituuksilla 526 nm ja 394 nm.

### 4.3.3 Alkalil liekki-ionisaatioilmaisim

Alkalil liekki-ionisaatioilmaisim (AFID) tunnetaan myös N/P-ilmaisimena eli typpi- ja fosfori-ilmaisimena ja termisenä ionisaatioilmaisimena (TID).<sup>5</sup> AFID eroaa normaalista FID:sta siten, että alkalisuolalla, esimerkiksi rubidiumkloridilla, päällystetty helmi asetetaan liekin ja ionikeräimen väliin. Helmi lämmitetään lämpötilaan 600-800 °C, jolloin se alkaa höyrystyä ja höyry siirtyy liekkiin, jossa ionisaatio tapahtuu. AFID:n käyttökelpoisimmissa sovelluksissa vedyn virtaus on vain 1-2 ml/min (vrt. FID 25-40 ml/min), jolloin liekki ei syty, vaan muodostaa matalan lämpötilan plasman. Fosforin mittaamiseksi vedyn virtaus nostetaan kuitenkin samalle tasolle kuin FID:ssa, mutta tällä tavalla sovellukset ovat erittäin rajatut. Suurin ongelma AFID:ssa on kuitenkin

alkalisuolan kuluminen, mikä näkyy pohjavirran muutoksina. Tästä syystä tulee laitetta jatkuvasti kalibroida. Alkalisuolahelmen käyttöikä vaihtelee 100-1000 tunnin välillä.

## **5 GC x GC-sovellukset**

Koska GC x GC-laitteisto on erittäin monipuolinen, tehokas ja suhteellisen pienillä kustannuksilla toimiva, sillä on monia sovelluksia. Ensimmäiset sovellukset keskittyivät lähinnä tarpeiden täyttämiseen petrokemian teollisuudessa, mutta on kehitetty sovelluksia myös eteeristen öljyjen ja muiden helposti haihtuvien seosten sekä ilmansaasteiden analysointiin.

### **5.1 Polttonesteiden analysointi**

Polttonesteissä ja mineraaliöljyissä tavataan paljon erilaisia hiilivetyjen isomeerejä, jotka eluoituvat 1D-GC:lla samalla retentioajalla.<sup>3</sup> Nämä hiilivedyt kuuluvat muutamaankin yhdisteryhmään, kuten alkaaneihin, alkeeneihin, sykloalkaaneihin ja aromaattisiin hiilivetyihin.

Kokonaisvaltaisella 2D-GC:lla pystytään tunnistamaan kaikki edellämainitut yhdisteryhmät erillisinä vyöhykkeinä kromatogrammista.<sup>3</sup> Usein polttonesteiden analyysissä riittää ryhmien kvalitointi ja kvantitointi. Kuitenkin 2D-GC:lla voidaan tehdä kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen analyysi myös yksittäisistä hiilivedyistä sekä tunnistaa erilaisia rikkiyhdisteitä, kuten C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-alkyyli-substituoituja bentsotiofeenejä.

#### **5.1.1 Päästörajoitukset**

Bentseenin ja sen johdannaisten sekä polyaromaattisten hiilivetyjen määrää säädellään polttonesteissä niiden myrkyllisyyden vuoksi.<sup>4</sup> Tästä syystä niiden analysointi on valmiista lopputuotteesta tärkeää. Myös rikkipäästöjen (SO<sub>x</sub>) aiheuttamien ilmastongelmien (happosateet) ehkäiseminen muodostaa merkittävän ilmastopoliittikan alueen. Edellisten lisäksi typpipäästöt (NO<sub>x</sub>) ovat haitallisia.

Yhdysvalloissa 1990 annettu ”Clean air act” -asetus vaati bensiinin muokkaamista siten, että myrkyllisten ja alailmakehässä otsonia muodostavien yhdisteiden määrä vähenisi.<sup>4</sup> Asetuksessa on määrätty bentseenin, hapen, aromaattien, rikin ja alkeenien määrät bensiinissä. Kemiallisten määräysten lisäksi bensiinin tulee omata tietyt fysikaaliset ominaisuudet, kuten höyrynpaine ja tislusparametrit. Bentseenin määrä on rajoitettu arvoon 1 m-% ja hapen määrän tulee olla vähintään 2 m-% (eettereistä, alkoholista). EPA (Ympäristön suojeluvirasto, Yhdysvallat) vaatii mittaukset kyseisien kemikaalien osalta. Tämän johdosta tuli kehittää entistä tarkempi ja helpompi tapa määrittää bensiinin sisältämät kemikaalit.

Tähän tarkoitukseen on kokeiltu monia erilaisia tekniikoita, esimerkiksi nestekromatografiaa, ylikriittistä kromatografiaa ja monidimensionaalista kromatografiaa.<sup>4</sup> Monidimensionaalinen kromatografia on näistä lupaavin, sillä sen erotuskyky on huomattavasti parempi kuin yksidimensionaalisilla menetelmillä. Esimerkkejä multidimensionaalisista laitteistoista ovat ”heart-cut”-GC, LC/GC, SFC/GC, GC/FT-IR ja GC x GC.

### 5.1.2 Muut analyysimenetelmät

Kuten edellä on mainittu, on myös muita tapoja määrittää polttonesteiden sisältämiä fraktioita, mutta kaikissa tavoissa on omat ongelmansa.<sup>31</sup> Mainittujen multidimensionaalisten laitteistojen lisäksi on käytetty adsorptiokromatografiaa, HPLC:a ja ohutkerroskromatografiaa (TLC).

Mitä suurempiin molekyylipainoihin siirrytään, sitä vaikeammaksi analysointi käy.<sup>32</sup> Kevyen naftan (kp. <130 °C) kemiallinen määrittäminen voidaan tehdä helposti 1D-GC:lla, kun taas raskaamman naftan (kp. 130-220 °C) koostumus on vaikeampaa määrittää vain yhdellä laitteella. Jo raskaamman naftan kanssa PIONA-analyysissa (parafiinit, isoparafiinit, olefiinit, naftaleenit ja aromaattit) havaitaan yhdisteiden sumppuuntumista. Tämä johtaa lähinnä viiden eri ryhmän tunnistamiseen, ei yksittäisten komponenttien. GC/MS-laitteistolla tästä tislusfraktiosta saadaan havaittua vielä kemiallinen koostumus yhdellä analyysilla.

Keskitisleet (kp. 220-345 °C) aiheuttaa GC/MS-laitteistolle jo haasteita, vaikka se yleensä on erittäin tehokas analyysilaitteisto.<sup>32</sup> GC ei enää pysty erottelemaan kaikkia



komponentteja, jolloin MS analysoi eri ryhmien seoksia, eikä yksittäisiä yhdisteitä. Keskitisleiden analysointiin käytetäänkin menetelmiä LC ja SFC.

Korkeammalla kiehuville yhdisteille käytetään HPLC-erotusta ja tarvittaessa useita LC-erotuksia.<sup>32</sup> Kun kiehumispiste nousee tarpeeksi korkealle ja liukoisuus vähenee, analysointi muuttuu todella hankalaksi, jopa mahdottomaksi.

### 5.1.2.1 1D-kaasukromatografi

Simuloitua tislausta käytetään polttonesteiden kiehumispisteiden avulla hiiliketjujen pituuden määrittämiseen.<sup>33</sup> Menetelmä perustuu siihen, että poolittoman kolonnin läpi kulkevat hiilivedyt eluoituvat kiehumispisteen mukaisessa järjestyksessä. Keskitisleiden simuloitu tislauksu suoritetaan kylmään kolonniin (35 °C) injeksiolla ja lämmittämällä kolonniin 390 °C:seen lämpötilaohjelmalla 10 °C/min. Ilmaisimena käytetään FID:a

### 5.1.2.2 Nestekromatografi

Keskitisleiden ryhmäerottu onnistuu LC-laitteistolla silika/alumina kolonnilla.<sup>33</sup> Tyydyttyneet hiilivedyt saadaan näytteestä eluoitua *n*-heptaanilla, kun aromaattit eluoituvat vasta, kun lisätään liikkuvaan matriisiin toluenia 30 %. Tämän analyysin suorittaminen vaatii kuitenkin yli 4 tuntia ja keskitisleet ovat erittäin yksinkertainen tisle, sillä siitä puuttuvat korkeammalla kiehuvat yhdisteet, kuten hartsit ja asfalteeni.

## 5.2 Ilmansaasteiden analysointi

Ilmansaasteita on montaa eri tyyppiä, kuten helposti haihtuvat, alailmakehässä otsonia muodostavat yhdisteet, haihtuvat orgaaniset yhdisteet (VOC), yläilmakehässä otsonia tuhoavat halogeeniset orgaaniset yhdisteet, orgaaniset hapot ja kasvihuonekaasut.<sup>34</sup> Perinteisesti VOC mitataan GC-FID- tai GC-MS -laitteistoilla, mutta näillä tavoilla tapahtuu paljon piikkien päällekkäisyyttä, mikä aiheuttaa ongelmia kvalitatoinnissa ja kvantitoinnin tarkkuudessa. Ongelmaa vaikeuttaa vielä analysoitavien yhdisteiden

pitoisuus näytteessä, joka on pieni. Tästä johtuen pieninä määrinä esiintyvät yhdisteet jäävät helposti samaan aikaan eluoituvien isompien piikkien alle.

Päällekkäin<sup>25,34</sup> eluoituvien piikkien ongelmaa voidaan lievittää käyttämällä GC x GC -laitetta, jolla esimerkiksi Lewis havaitsi 8 minuutin osassa kromatogrammia 110-120 yhdistettä verrattuna 1D-GC:lla havaittuihin 20-30:neen yhdisteeseen.

### 5.3 Eteeristen öljyjen analysointi

Eteeriset öljyt ovat erittäin monimuotoisia näytteitä, jotka koostuvat helposti haihtuvista (alle 100 u) ja kohtalaisen helposti haihtuvista yhdisteistä (300 u).<sup>35</sup> Yleensä yhdisteet koostuvat terpenoideista, jotka sisältävät paljon isomeerisia syklisiä tai lineaarisia osia, joiden massaspektrit ovat samanlaisia tai samankaltaisia. Nämä yhdisteet ovat normaalisti määriteltäviä vaikeasti määriteltäviksi, joilla on erittäin lyhyt retentioaikaikkuna.

Korkean erotuskyvyn GC (HRGC) yhdistettynä FT-IR-spektrometriin on erittäin hyvä tunnistustyökalu eteerisille öljyille, mutta se vaatii erittäin väkeviä näytteitä ja kvantitatiivisen komponenttien erottumisen, jotta tuloksena olisi riittävän hyvä spektri.<sup>35</sup> Toinen vaihtoehto on HRGC-MS, joka on suosituin menetelmä vaikeiden haihtuvien yhdisteiden tunnistamisessa. Vaikka GC:n ja MS:n kehitys menee koko ajan eteenpäin, eteeristen öljyjen kaikkien komponenttien erotteleminen on joko erittäin epäkäytännöllistä tai jopa mahdotonta, sillä näytteet ovat hyvin monimuotoisia. Monimuotoisuudella tarkoitetaan suurta määrää yhdisteitä, joilla on paljon rakenteellisia samankaltaisuuksia, isomeerejä ja suuria väkevyyseroja.

Eteeristen öljyjen analysointia on tehty myös "heart-cut"-GC:lla, mutta sen toiminnalliset rajoitukset, kuten analyysien kesto, ovat heikosti soveltuvia rutiinianalyysiin.<sup>35</sup> Lisäksi usean kapean vyöhykkeen peräkkäinen siirtäminen toiseen kolonniin ei ole suositeltavaa, sillä se nostaa samanaikaisen eluaation mahdollisuutta. Vaikka MS-kirjastot laajenevat koko ajan ja ne ovat tarkkoja, eteeristen öljyjen tapauksessa vaaditaan täydellinen aromaattien erottelu, jotta tunnistus onnistuisi.

## 6 Menetelmäkehitys kromatografiassa

Syitä menetelmän kehittämiseen voi olla useita.<sup>36,37</sup> Ei välttämättä ole olemassa hyvää menetelmää yksittäisen analyysin havaitsemiseksi tietyssä näytematriisissa, olemassa olevat menetelmät ovat liian herkkiä virheille tai kontaminaatiolle, menetelmät voivat olla liian epävarmoja tai epätarkkoja, vanhat menetelmät kuluttavat liikaa aikaa ja rahaa tai ne on vaikea automatisoida. Lisäksi uudet laitteistohankinnat voivat lisätä mahdollisuuksia mittaustarkkuuden tai -herkkyyden lisääntyessä tai tunnistettavien analyttien lisääntyessä, jolloin menetelmää mahdollisesti joudutaan muokkaamaan.

On tärkeää määrittää se, mitkä ovat analyysin tavoitteet ja keskittyä niiden saavuttamiseen.<sup>36</sup> Kun aletaan kehittää uutta analyysimenetelmää, tulee olla selvitettyinä monia asioita, kuten halutaanko analyysin olevan kvantitatiivinen vai kvalitatiivinen, halutaanko sen olevan helposti automatisoitavissa tai vähentää analyysikohtaista rahankulutusta vai halutaanko vähentää vaivaa näytteenkäsittelyssä tai tulosten käsittelyssä.

Jos lähdetään kehittämään täysin uutta menetelmää, siihen tarvitaan kokemusta, näkemystä ja taitoa.<sup>38</sup> Näytteen tuntemus on tärkeässä asemassa ja siihen pitää perehtyä tarkasti. Tärkeitä asioita mitä näytteen taustamatriisista ja sen sisältämistä analyyteista pitää tuntea, ovat oletetut näytteestä löytyvät yhdisteet ja mitkä näistä yhdisteistä ovat kiinnostuksen kohteena. Muita huomionarvoisia ja selvitettäviä seikkoja menetelmää kehitettäessä ovat näytteen haihtuvuus, sopiva liuotin, näytteen sisältämät hapot ja emäkset sekä näytteen synteesisireitit.

Uutta menetelmää ei kannata resurssien säästämiseksi alkaa tehdä aivan alusta, mikäli kirjallisuudesta tai standardoiduista menetelmistä löytyy käyttökelpoinen menetelmä näytteen analysoimiseksi.<sup>36,38</sup> Nykypäivänä menetelmän kehitys perustuu useimmiten kirjallisuuden tutkimiseen ja olemassa olevan metodin muokkaamiseen. Harvoin tehdään menetelmiä, jotka eivät osittain vastaa tai vertaile johonkin vanhaan menetelmään. Menetelmänkehitys vaatii yleensä menetelmäparametrien ja laitteiston valitsemisen. Esimerkiksi kolonnikromatografiassa pitää ottaa huomioon kolonnin, liikkuvan faasin ja ilmaisimen valinnat.

Vaikka kirjallisuudesta saattaa löytyä samantapainen menetelmä, usein vaaditaan menetelmän optimointia ja soveltamista.<sup>38</sup> Jos valmista menetelmää ei löydy, tulee menetelmänkehityksen perustua näytteen sisältämien komponenttien tuntemiseen.

Näytteen ominaisuudet vaikuttavat muun muassa siihen, mitä analyysimenetelmää käytetään (GC, LC vai SCF) tai minkä tyyppisiä faaseja käytetään.

Parhaan mahdollisen erottelun saavuttamiseksi voidaan parantaa kolmea osatekijää.<sup>38</sup> Retentiovakion ( $k'$ ) asettaminen mittaukselle parhaalle alueelle 1-10, teoreettisten välipohjien lisääminen tai selektiivisyyden parantaminen. Retentiovakio riippuu liikkuvan faasin kolonnin läpi kulkemiseen käyttämästä ajasta ja analyytin retentioajasta yhtälön (11) mukaan, jolloin  $R_A$  on analyytin retentioaika ja  $R_f$  liikkuvan faasin retentioaika.

$$k' = \frac{R_A - R_f}{R_f} \quad (11)$$

Teoreettisten välipohjien lisääminen on erittäin kallista, ei vain laite- ja kolonnikustannuksien, vaan myös ajankäytön suhteen. Yleensä välipohjien lisääminen on viimeinen vaihtoehto, kun piikkien muoto ja pohjaviiva ovat kunnossa.

## **Kokeellinen osa**

Kokeellisen osan tarkoituksena oli ottaa käyttöön yhdisteiden pitoisuuden mittaamiseen tarkoitettu FID, automatisoida tietojenkäsittelyä ja varmentaa sekä lisätä laitteen kapasiteetin hyödyntämistä. Mahdollistettiin lisäksi uusille näytematriiseille tehtävien ajo-ohjelmien entistä helpompi laatiminen ja käyttöönotto.

Työssä suoritettiin FID:n käyttöönotto, menetelmien laadinta tarvittaville näytematriiseille, sisäisten standardien kokeilu ja valinta sopimaan haluttuun analyysiin. Lisäksi suoritettiin uuden tiedonhallintaohjelman käyttöönotto ja sen käytön ohjeistaminen sekä pyrittiin luomaan edellytykset yhdisteiden pitoisuuden mittaukseen. Laiteteknisten haasteiden ja ajanpuutteen takia menetelmän validointi jäi suorittamatta.

## 7 Käytetyt kemikaalit

Taulukossa 1 on lueteltu kemikaalit, joita kokeiltiin sisäisenä standardina ja niiden liuottamiseen käytetyt liuottimet. Liuottimista *n*-heksaania ja tetrahydrofuraania käytettiin myös GC:n pesuliuoksina.

Taulukko 1. Sisäisten standardien yritelmäkemikaalit ja liuottimet.

Kemikaali	Valmistaja	Puhtaus (%)
deuteroitu naftaleeni (s)	Supelco	98
fenantreeni (s)	Sigma Aldrich	99
fluoreeni (s)	Sigma Aldrich	99
<i>o</i> -ksyleeni (l)	Sigma Aldrich	99
1-klooritetradekaani (l)	Sigma Aldrich	98
naftaleeni (s)	Merck	99
<i>n</i> -heptaani (l)	J.T. Baker	99
<i>n</i> -heksaani (l)	J.T. Baker	99
tetrahydrofuraani (l)	Merck	99,5

Lisäksi käytettiin UPM:n valmistamaa vetykäsittelyn avulla valmistettua hiilivetyjen seosta (UPM X), jonka sisältämien aromaattisten ja syklisten komponenttien määrä pyrittiin mittaamaan. UPM X:ää käytettiin sekä liuottimena että näytteenä.

### 7.1 Kaasut

Laitteistossa käytetyt kaasut on esitetty taulukossa 2. Vetyä käytettiin FID-ilmaisimella ja heliumia sekä GC:n kantajakaasuna, että FID-ilmaisimella ”make-up”-kaasuna. GC:n moduloinnissa käytettiin nestemäistä tyypeä ja generaattorilla tuotettua tyypeä.

Taulukko 2. Laitteistossa käytetyt kaasut ja niiden valmistajat sekä puhtaus.

Kaasu	Valmistaja	Puhtaus (%)
H <sub>2</sub>	Oy Woikoski Ab	99,99
He	Oy Woikoski Ab	99,996
Neste-N <sub>2</sub>	Oy Woikoski Ab	100
N <sub>2</sub>	Peak Scientific NM32LA -generaattori	-

## 7.2 Näytteet

Näytteinä käytettiin kahden eri tyyppistä hiilivetyseosta. Molempien seoksien pääkomponentit olivat suoraketjuisia hiilivetyjä ja molemmissa oli lisäksi sykliisiä sekä aromaattisia hiilivetyrakenteita. Toinen näytetyypeistä oli matalammassa lämpötilassa haihtuva jae ja toinen korkeammassa lämpötilassa haihtuva jae UPM X:stä.

## 8 Laitteistot

Työn tärkein laitteisto oli 2D-GC-MS/FID. Lisäksi käytettiin Sartoriuksen analyysivaakaa ja Sartoriuksen (100-5000 µl) sekä Biohitin (10-250 µl) automaattipipettejä.

### 8.1 Kaasukromatografi

Kaasukromatografina (kuva 14) käytettiin Shimadzun GC-2010 plus -mallia jonka ilmaisimina käytettiin Shimadzun GCMS-QP2010 massaspektrometria ja FID-2010 PLUS -liekki-ionisaatiodetektoria. Ensimmäisen ulottuvuuden kolonni oli 30 m pitkä Restekin Rxi®-1ms ja toisen ulottuvuuden kolonni Restekin Rxi®-17Sil MS, jonka pituus oli 2,6 m. Toisen ulottuvuuden kolonni päättyi y-haaraan, jonka jälkeiset ilmaisimille johtavat deaktivoitavat kolonnit olivat Agilent Technologiesin FS, Deactivated - .100mm kolonnista pituudeltaan 25 cm (FID) ja 70 cm (MS) leikatut palat.



Kuva 14. Työssä käytetty kaasukromatografi. Kuvassa vasemmalla on qMS ja autosampler. Keskellä uunin päällä sijaitsee injektori, modulointitypen tuontiputki ja FID.

Ensimmäisen ja toisen kolonnin yhdistävä osa oli Agilent Technologiesin deaktivoitu Ultimate union.

Injektioruiskun tilavuus oli 10  $\mu$ l ja injektointi tapahtui Shimadzun deaktivoitua lasivillaa sisältävään SPL Liner:iin.

## 8.2 Lämpömodulaattori

Toisen ulottuvuuden moduloinnissa käytettiin ZOEX ZX1-lämpömodulaattoria, johon kuuluu dewar-astia (kuva 15) ja nestetyypen korkeuden säätämiseen astiassa tarkoitettu ZOEX Model 186 -yksikkö (kuva 16). Erillinen nestetyypisäiliö ja Peak Scientific NM32LA -tyypigeneraattori kuuluivat myös modulointikoneistoon.





Kuva 15. Dewar astia, jossa nestetyypellä jäädytetään moduloinnissa käytettävää typpivirtaa.



Kuva 16. Nestetyypen korkeuden säätämiseen käytetty ohjain.

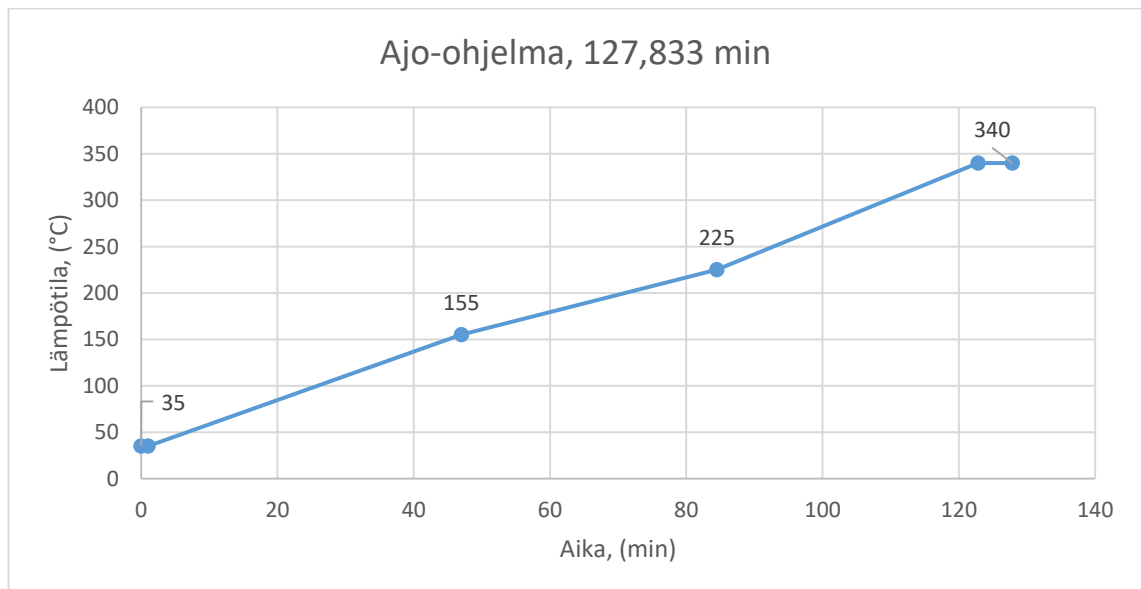
### 8.3 Ohjelmistot

Mittaustulosten käsittelyyn käytettyjä ohjelmistoja olivat GCImage v. 2.6 ja v.2.7r1, GCProject v. 2.6 ja 2.7 sekä ChromSquare v. 2.2. Laitteen hallintaan käytettiin GCMSsolution-ohjelmaa.

## 9 Ajo-ohjelmat

Työn aikana luotiin ja testattiin yhdeksän eri menetelmää, joista kahden kehitys saatiin vietyä loppuun. Seuraavassa tarkastelussa käydään näistä läpi vain pidemmän ja parhaiten toimivan ajo-ohjelmien tiedot.

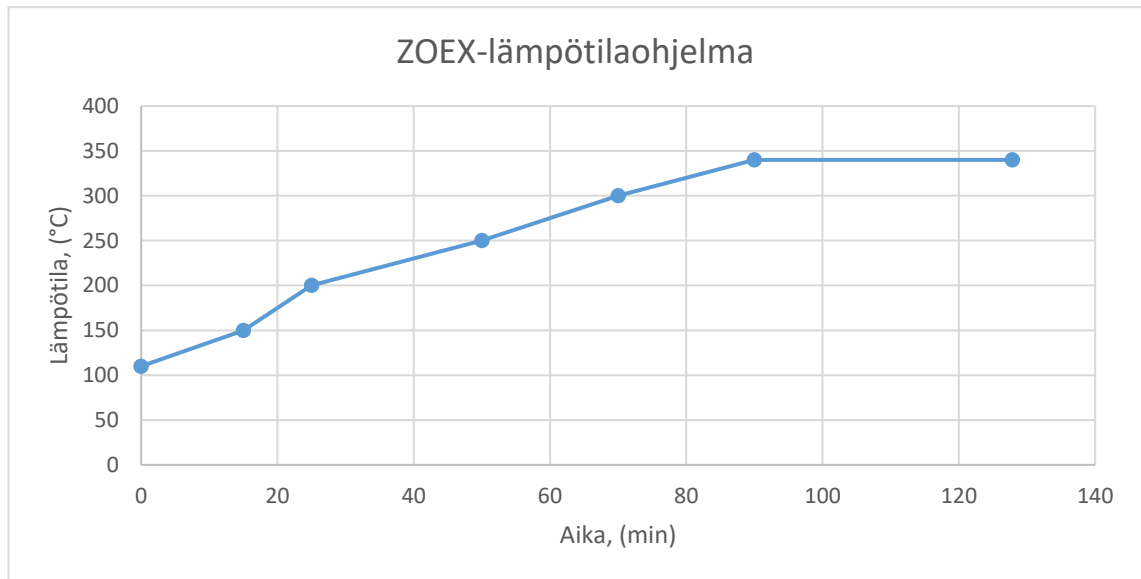
Pitkän ajo-ohjelman (kuva 17) portaat saatiin kokeellisesti. Matalan lähtölämpötilan avulla voitiin saada helposti haihtuvat yhdisteet mukaan analyysiin. Alun suhteellisen nopea lämpötilan nousu oli mahdollista korkeamman haihtumispisteen jakeelle suunnitellun ajon aikana, sillä suurin osa näytteen komponenteista kulkeutuivat ilmaisimille vasta 150 °C:n lämpötilan jälkeen. Tämän johdosta ajo-ohjelman keskivaiheilla oli hitaamman lämpötilan nousun vaihe mahdollistamassa suuren näytekomponenttimäärän erottelun. Lisäksi suurimmat yksittäiset piikit tulivat 70-80 minuutin aikavälillä, jolloin massaspektrometrin toimintakyky oli äärirajoillaan suuren näytekkuorman takia. Kun lämpötila saavutti 225 °C:n suurin osa tutkittavista yhdisteistä oli kulkeutunut analyysisysteemin läpi ja lämpötilaa voitiin taas nostaa nopeammin loppulämpötilaan.



Kuva 17. Pitkän ajo-ohjelman uunin lämpötila ajan suhteen.

Modulointiyksikön kuuman typen lämpötilan tuli olla korkeampi kuin GC-uunin lämpötilan. Tästä johtuen modulointityypen lämpötilalle tuli tehdä myös oma lämpötilaohjelmansa (kuva 18), joka myötäili GC-uunin lämpötilaohjelmaa. Modulointiyksikön jäähtyminen kesti huomattavasti kauemmin kuin GC-uunin, sillä sen

yhteydessä ei ollut erillistä jäähdytysjärjestelmää. Tämä muodosti pullonkaulan analyysisarjojen etenemisnopeudessa.



Kuva 18. Moduloinnissa käytetyn kuuman typen lämpötilaohjelma.

FID-ilmaisimelle tulevien kaasujen virtausnopeudet ovat tärkeitä ionisointiliekin palavana pysymisen kannalta. Näiden perusteluja on käyty läpi kirjallisessa katsauksessa tarkemmin. Taulukossa 3 on käyty läpi FID-ilmaisimen virtausnopeudet ja lämpötila.

Taulukko 3. FID-ilmaisimen asetukset.

Lämpötila (°C)	340
Makeup-kaasun virtaus (He) (ml/min)	30
H <sub>2</sub> -virtaus (ml/min)	40
Ilman virtaus (ml/min)	400

GC:n injektorin asetukset on esitetty taulukossa 4. Jakosuhdetta kokeiltiin huomattavasti paljon suurempanakin (jopa 500). Suuremmilla arvoilla aromaattisten ja syklisten yhdisteiden ilmaisinvasteet olivat liian matalat tunnistusta sekä määrän mittaamista silmällä pitäen. Jakosuhte 20 todettiin riittäväksi, mutta ei liian suureksi. Kolonivirtauksen arvioiminen ja laskeminen oli haastavaa erimittaisten ja sisähalkaisijan omaavien peräkkäin ja rinnakkain asetettujen kolonnien takia. Systemillä

saatiin kuitenkin luotua toimiva ratkaisu tähän kokonaisuuteen heliumin toimiessa kantajakaasuna.

Taulukko 4. GC:n injektorin asetukset.

Kolonnivirtaus (ml/min)	1,45
Jakosuhte	20
Kokonaisvirtaus (ml/min)	33,5

Massaspektrometrin asetukset on listattu taulukoissa 5 ja 6. tunnistusparametrien luomisessa käytettiin laitteen suorituskykyä raja-arvojen asettamisessa. Laitteen suurin tarkastelunopeus on 20000 Hz. Massaspektrometrille haluttiin luoda suurin mahdollinen m/z-mittausalue mittaustapahtuman keston ollessa 0,02 s. Tämä toteutui m/z-alueella 40-334. Harkittiin alueen alarajan nostoa 45:een, jolloin CO<sub>2</sub> ei näkyisi massaspektrissä, mutta näyte sisälsi CO<sub>2</sub>:a niin vähän, että todettiin pienempien hiilivety-yhdisteiden tunnistamisen tuovat lisäarvoa mittauksille enemmän.

Taulukko 5. Massaspektrometrin lämpötilat.

Osa	Lämpötila (°C)
GC-MS -rajapinta	300
Ionilähde	200

Taulukko 3. Massaspektrometrin tunnistusparametrit.

Aloitusaika	Lopetusaika	Tarkastelunopeus	Mittaustapahtuman kesto	m/z alue
0,1 min	127,83 min	20000 Hz	0,02 s	40-334

## 10 Työn suoritus

Työn tarkoituksena oli ottaa laitteisto käyttöön ja muodostaa uusille osille sopivat ajo-ohjelmat. Seuraava vaihe oli toimivien ajo-ohjelmien muokkaaminen paremmaksi ja hiilivetyseoksien analysointi. Näytteiden kromatogrammien tulkinnan tarkoituksena oli ensimmäisessä vaiheessa tunnistaa näytteiden sisältämät yhdisteet kaupallisten

massaspektirikirjastojen avulla ja muodostaa syklisten ja aromaattisten yhdisteiden alueet kromatogrammiin sekä toisessa vaiheessa käyttää tätä tunnistusta FID-mittaustuloksien kanssa yhdisteryhmien pitoisuuksien selvittämiseen.

Kromatografian käytössä ilmeni haasteita sen toimintakunnon takia ja kylmennykseen käytettävän nestetyypen toimituksien ajankohtien johdosta. Laite oli epäkunnossa useissa eri jaksoissa yhteensä noin 1,5 kk. Lisäksi nestetyyppitoimituksia oli maksimissaan 2/vko ja yksi nestetyyppisäiliö riitti 30-33 h jäähdytyskäyttöön. Typpisäiliö tyhjentyi myös suunnilleen samaa vauhtia, vaikka venttiilit olivat suljettuina, joten laitteen käyttömahdollisuudet olivat noin 30 h nestetyyppitoimituksen jälkeen. Yhden näytteen analysoiminen välipesut ja laitteiston jäähtyminen huomioon ottaen kesti noin 4,5 h, joten kerrallaan voitiin analysoida 6-7 näytettä. Pesuja vähentämällä päästiin 10-12 näytteeseen, mutta varsinkin analyysisarjan loppuvaiheessa ilmeni kolonnin likaisuutta.

Tietojenkäsittelyohjelmalla tehty pitoisuuden mittaaminen osoittautui erittäin haastavaksi, sillä ohjelman mukana tulleissa käyttöohjeissa oli ohjeistus vain GC x GC-MS-laitteistolle. Ohjelma vaati tunnistetut yhdisteet, joita FID-mittaustuloksista ei voitu saada. Tästä johtuen tunnistus tuli tehdä MS-tietojen pohjalta ja luoda tunnistusta varten sopiva pohja, joka voitiin yhdistää FID-tuloksiin ja näin saada tunnistetut piikit myös FID-kromatogrammiin. Tässä ongelmana oli ilmaisimien pienet erot retentioajoissa ja havaittujen piikkien määrässä. Parhaimmillaan MS-tiedoista tehty pohja onnistui tunnistamaan 90-95 % FID-kromatogrammin piikeistä, mutta tietyt piikkien tunnistamiset eivät onnistuneet lainkaan.

Tietojenkäsittelyohjelma vaati sisäisen standardin lisäksi näytteeseen tunnetun pitoisuuden ainetta, jolla sisäisen standardin kalibrointi oli tehty. Tämä aiheutti ongelmia, sillä käyttöohjeessa tästä ei mainittu. Laitetoimittaja ei osannut myöskään auttaa tilanteessa ja havainto tapahtui niin opinnäytetyön loppuvaiheessa, että ulkopuolelta avun hankkiminen olisi ollut haastavaa. Tästä syystä tulokset eivät olleet tarkkoja ja työn suorittaminen jäi kesken.

## **10.1 Ajo-ohjelmien muodostaminen**

Kaasukromatografian hallinnointiohjelmassa oli olemassa jo ennen FID-ilmaisimen lisäämistä lyhyt sekä pitkä ajo-ohjelma, joista lyhyttä ajo-ohjelmaa käytettiin lyhempiketjuisten hiilivetyseosten analysointiin ja pidempää pidempiketjuisten seosten

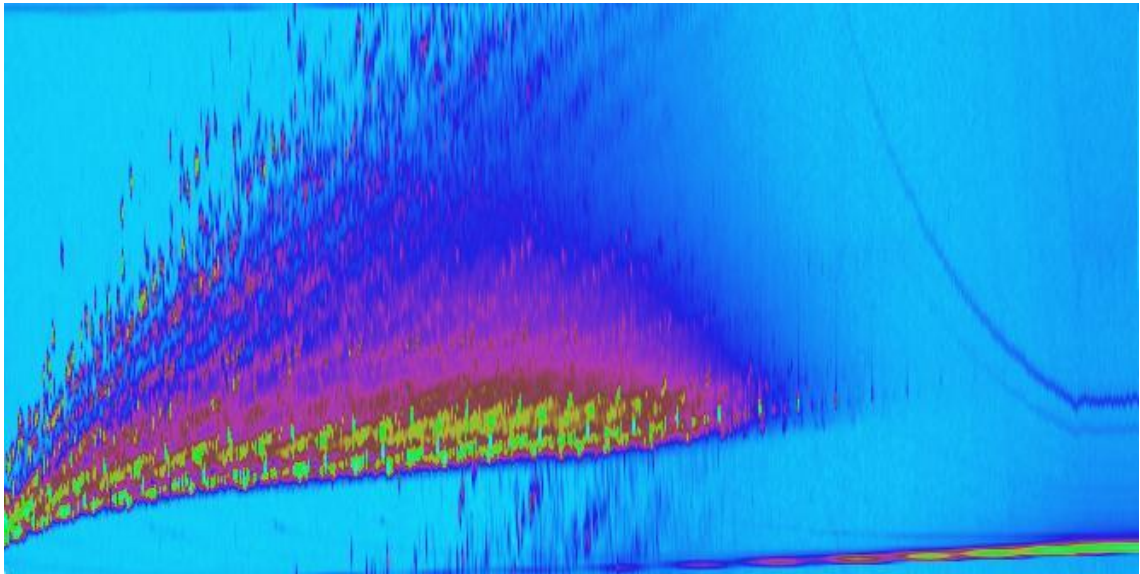
analysointiin. Lyhempi ohjelma ei myöskään päättynyt yhtä korkeaan lämpötilaan. Nämä ohjelmat eivät kuitenkaan toimineet laitteeseen tehtyjen lisäysten jälkeen, eivätkä ne olleet ennen muutoksia parhaita mahdollisia. Y-haaran ja sen jälkeisten faasittomien kapillaarien johdosta kantajakaasun virtauksia piti muuttaa. Lisäksi ohjelmaan lisättiin kaasun säästöohjelma ja massaspektrometrin kuvantamisnopeus asetettiin parhaalle mahdolliselle tasolle.

## 10.2 Kromatogrammin tulkinta

Kromatogrammista löytyy pienimmän havaittavan piikin koosta riippuen 1200-2800 piikkiä. Näistä piikeistä 200-400 ovat kolonnivuotoa, mutta loppujen piikkien tunnistaminen on tärkeää, jotta voitiin erottaa aromaattiset yhdisteet ja sykliset yhdisteet omille alueilleen. Kaupalliset kirjastot (NIST, Wiley) onnistuivat tunnistamaan suhteellisen varmasti (yli 85 % yhteensopivuus) vain pienen osan aromaattisista ja syklisistä ja lisäksi lineaariset hiilivedyt. Näytteissä noin 60 m-% oli lineaarisia hiilivetyjä.

Kuvassa 19 nähdään vastaavantyyppisen hiilivetyseoksen kromatogrammi, jollaisia työssä käsiteltiin. Vihreällä ja keltaisella kuvatut piikit olivat erittäin voimakkaita ja ne kuvasivat suoraketjuisia ja haaroittuneita hiilivetyketjuja. Vaaleanpunaisella kuvatut piikit olivat keskivahvoja ja kuvasivat syklisiä rakenteita sekä erilaisilla funktionaalisilla ryhmillä ja kaksoissidoksilla varustettuja hiilivetyjä. Näitä UPM X:ssä oli huomattavasti vähemmän. Siniset piikit olivat jo huomattavan pieniä verrattuna lineaarisiin hiilivetypiikkeihin ja ne olivat peräisin aromaattisista yhdisteistä.

Kuvasta voidaan huomata, ettei syklisten ja aromaattisten yhdisteiden rajat olleet yhtä selkeät kuin kirjallisuusosan kuvassa 8 annettiin ymmärtää. Tämä johtui näytematriisin vaikeudesta ja moninaisuudesta sekä osittain myös laitteen kokoonpanon eroista.



Kuva 19. Kuvassa kromatogrammi vastaaventyyppiselle kaupalliselle hiilivetyseokselle kuin UPM X:n korkeamman haihtumispisteen jae.

Kaupalliset kirjastot tulkitsivat kromatogrammeista myös sellaisia yhdisteitä, joita näyte ei voinut sille tehtyjen käsittelyiden jälkeen sisältää, kuten paljon alkoholeja ja epoksidgeja sekä lineaarisia tyydyttymättömiä hiilivetyjä. Nämä erheellisesti tunnistetut piikit sijaitsivat lähes poikkeuksetta eri toiminnallisten ryhmien rajapinnoissa, eli lineaaristen hiilivetyjen ja syklisten hiilivety-yhdisteiden rajapinnassa tai syklisten ja aromaattisten yhdisteiden rajapinnassa. Tämä hankaloitti huomattavasti pitoisuusmäärittysten suorittamista, joten kaikki epäselvät piikit (800-1200 piikkiä) käytiin läpi manuaalisesti kahdella eri massaspektrin käsittelyohjelmalla.

Manuaalisen tunnistuksen jälkeen laadittiin varsin tarkat rajat eri yhdisteryhmien välille. Näitä alueita käytettiin hyväksi yhdisteryhmien määrän mittaamisessa, kun ohjelmisto laski alueen piikkien suhteelliset alat yhteen ja ilmoitti yhdisteryhmän pitoisuuden massaprosentteina näytteestä.

Koska FID-ilmaisoin tunnistoi vain näytteen pitoisuuksia, tuli FID-kromatogrammiin määrittää manuaalisesti yhdisteiden nimet. Tämä oli erittäin työlästä tehdä piikki kerrallaan, joten tietojenkäsittelyohjelmassa oli työkalu, jolla voitiin tehdä pohjia esimerkkinäytteen avulla. Pohjan avulla voitiin nopeasti tehdä tunnistuksia sekä MS- että FID-kromatogrammeista. Pohjaan oli mahdollista määrittää esimerkiksi sisäisen standardin paikka ja nimetä se sekä tämän jälkeen mielenkiinnon kohteena olevat alueet kromatogrammista. Tässä tapauksessa sisäinen standardi, aromaattiset yhdisteet ja

sykliset yhdisteet. Pohjan sijainti kiinnitettiin yksittäisiin tunnistettuihin piikkeihin, joita tulisi olla vähintään kolme kappaletta ja sen jälkeen kohdistettiin muodostetut alueet asetettujen piikkien mukaan. Tällä tavalla asetetut alueet tuli olla oikeassa paikassa suhteessa sisäiseen standardiin ja muihin määriteltyihin ankkurointipiikkeihin.

Tunnistusohjelmien suurin ongelma oli yhdisteryhmien rajojen määrittäminen ja siihen käytettiin lähes yhtä paljon aikaa kuin yksittäisten piikkien tunnistamiseen. Tunnistusohjelmien rajoja yritettiin myös muokata pitoisuusmääritysten aikana ja pyrittiin saamaan tarkempi kuva siitä, kuinka paljon alueiden rajavyöhykkeen tunnistamattomat piikit vaikuttivat pitoisuusmäärittäisiin.

Automaattisessa tulosten käsittelyssä oli myös ongelmana oikeiden määrityspiikkien tunnistamisessa. Sisäisen standardin ohjelma tunnistoi poikkeuksetta oikein, mutta muina määrityspiikkeinä käytetyt *o*-ksyleeni ja oktadekaani tuottivat ohjelman automatisaatiolle ongelmia, joten ne piti määrittää kuitenkin käsin käyttäen graafista käyttöliittymää.

### 10.3 Sisäiset standardit

Sisäisen standardin valinnassa pyrittiin löytämään yhdiste, joka sijaitisi keskeisellä paikalla suhteessa mitattaviin yhdisteryhmiin eli syklisiin ja aromaattisiin hiilivety-yhdisteisiin. Lisäksi sisäinen standardi ei saanut esiintyä mitattavissa näytteissä edes virheellisen valmistusprosessin myötä.

Vaihtoehtoisina tapoina käytettiin joko halogenoitua hiilivety-yhdistettä tai deutoitua yhdistettä. Lisäksi kokeiltiin samoja sisäisiä standardeja, joita käytetään HPLC-standardeina. Valinta aloitettiin tutkimalla, minkä tyyppisiä kemikaaleja löytyi UPM NERC-kemikaalivarastoista työn jouduttamiseksi. HPLC-standardeista käytettiin fluoreenia, fenantreenia ja *o*-ksyleenia. Lisäksi kemikaalivarastosta löytyi naftaleenia ja 1-klooritetradekaania. Näiden lisäksi tilattiin deutoitua naftaleenia. Standardeista *o*-ksyleeni ja 1-klooritetradekaani olivat nesteitä ja loput jauheita.

Jauhemaisten standardien kohdalla kokeiltiin erillistä liuotusta heptaaniin ja liuottamista suoraan näytteeseen. Nestemäiset standardit lisättiin näytteisiin mikrolitruuskulla tai automaattipipetillä, riippuen halutusta väkevyydestä ja näytteen määrästä.

Fenantreenia ja naftaleenia esiintyy erittäin pieniä määriä UPM X-näytteessä, joten niitä ei voitu käyttää sisäisenä standardina. Deutoitu naftaleeni oli hyvin kaukana syklisten



yhdisteiden joukosta ja sen hinta oli huomattavan korkea jatkuvaan käyttöön. Edellisten lisäksi fluoreenikin jouduttiin karsimaan huonon liukoisuuden ja esikäsitelyn keston vuoksi.

Edellisen johdosta ainoat varteenotettavat vaihtoehdot olivat *o*-ksyleeni ja 1-klooritetradekaani helpon, nopean ja tarkan analyysin saavuttamiseksi. Tällöin *o*-ksyleenin retentioaika oli kuitenkin hyvin pieni ja yhdiste sijaitti ensimmäisten mitattujen piikkien joukossa. Tästä johtuen sen tunnistus oli hieman epävarmaa ja sijainti ei ollut yhtä keskeinen kuin 1-klooritetradekaanilla, joten päädyttiin käyttämään 1-klooritetradekaania sisäisenä standardina.

Käytännössä 1-klooritetradekaanin käyttämisessä oli myös omat haasteensa. Koska 1-klooritetradekaani oli halogenoitu yhdiste, tuli näytteet, joihin sitä oli lisätty, käsitellä erillisenä liuotinjätteenään ja käsittelykustannukset nousivat. Tästä johtuen haluttiin käsitellyt näytemäärät pitää pienenä.

### **10.3.1 Pitoisuuden valitseminen**

Sisäisen standardin pitoisuuden tuli olla lähellä mitattavien analyyttien pitoisuutta. Tämä aiheutti suuria haasteita UPM X-näytteen kanssa, sillä suurimman ja pienimmän piikin pitoisuusero saattoi olla jopa 1:1000. Pitoisuutta testattiin useilla ajoilla, kunnes löydettiin sopiva vaihtoehto, joka oli lopulta 0,3 m-%. Tämä aiheutti mittausteknisesti suuria haasteita, sillä näytteen ja standardin tuhmaamisen välttämiseksi tuli voida tarkasti mitata hyvin pieniä määriä 1-klooritetradekaania.

### **10.3.2 Sisäisen standardin kalibrointi**

Pitoisuusmäärityksiä varten tuli sisäinen standardi kalibroida tunnetuilla määrillä jotain muuta yhdistettä näytematriisissa. Tähän yritettiin käyttää edellisissä vaiheissa hylättyjä sisäisiä standardeja, lukuun ottamatta deuterioitua naftaleenia. Täydellisen liukenemisen varmistamisen vaikeuden ja keston vuoksi päädyttiin käyttämään *o*-ksyleenia. Valmistettiin useasti kalibrointisuora 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 m-%:n liuoksista ja mitattiin sekä varmistettiin suora 0,2 tai 0,3 m-%:n liuoksella.

Standardin kalibrointi suoritettiin GCProject-ohjelmalla, jossa luotiin mittaustiedoista ilman graafista käyttöliittymää kalibraatiotaulukko ja sen pohjalta tehtiin kalibraatiosuora. Kalibraatio saatiin onnistumaan usein hyvin, mutta kalibroinnin käyttö ei jostain syystä ohjelmalla toiminut.

## 11 Työn tulokset

Laite saatettiin toimintakuntoiseksi FID-ilmaisimen lisäyksen jälkeen ja hiottiin ajo-ohjelmat parhaiksi mahdollisiksi eri tarkoituseriä varten. Kantajakaasuna käytettävän He-kaasun kulutusta vähennettiin ja valittiin sopivan mittaiset ilmaisimille johtavat kapillaariputket. Uuden tietojenkäsittelyohjelman käyttämiseen perehdyttiin ja onnistuttiin käyttämään sitä graafisen kromatogrammikäsitteilyn lisäksi graafittoman automatisointityökalun avulla.

Työssä saatiin muodostettua hiilivetyryhmien mukaiset alueet kromatogrammiin. Syklisten yhdisteiden ja aromaattisten yhdisteiden sekä syklisten yhdisteiden ja lineaaristen yhdisteiden rajapintoja kromatogrammissa ei kuitenkaan saatu täydellisiksi massaspektrometrin yhdisteiden tunnistamisongelmien takia. Myöskään kaikkia alueiden sisällä olevia pisteitä ei tunnistettu, mutta kromatografian toimintaperiaatteen vuoksi alueet voitiin olettaa yhtenäisiksi yhdistetyyppien suhteen.

Sopiva sisäinen standardi valittiin ja sille määritettiin sopiva pitoisuus sekä kalibrointiohjeet. Aromaattisten ja syklisten yhdisteiden pitoisuuksien määrittämiselle luotiin edellytykset ja ohjeistus. Kyseisellä tavalla mitattuna syklisten yhdisteiden pitoisuus oli lähellä kaupallisten laboratorioiden tuloksia, mutta kokonaisaromaattipitoisuus oli 3-4 prosenttiyksikköä liian korkea. Mitatut pitoisuudet olivat luokkaa 10-11 m-%, kun kaupallisten laboratorioiden tulokset ja HPLC:lla mitatut tulokset olivat tasolla 6-7 m-%.

Lopuksi pohdittiin laitteiston konfiguraation mielekkyyttä, sillä kaupallisten laboratorioiden kolonnijärjestys on eri. Ensimmäisen ulottuvuuden kolonnin tulisi olla osittain poolinen ja toisen ulottuvuuden pooliton, jos haluttaisiin paras mahdollinen herkkyys aromaattisille hiilivedyille. Tuloksista voitiin huomata, että aromaattisten hiilivetyjen pitoisuuden määrittämisessä hiilivetyjen pitoisuuden mittaaminen muodosti juuri tämänkaltaisessa asetelmassa ongelman.

## 12 Yhteenveto

GC x GC-MS/FID-yhdistelmä on teoreettisesti erittäin tehokas analyysilaitteisto, joka soveltuu erityisesti hankalien matriisien analyysiin. Koko ajan kasvavan tiedonhalun esimerkiksi ruoka-aineiden suhteen voi olettaa kehittävän lisää sovelluksia laitteiston käytölle. Kehitystä kuitenkin tulee varmasti johtamaan tähänkin asti suurimmat tahot eli petrokemia ja ilmantutkimus.

Kasuvat vaihtoehtoisten polttonesteiden markkinat ja tuotanto ohjaavat analyysia myös edelleen haastavampien näytematriisien suuntaan. Suurimpana haasteena analyysilaitteistolle on ilmaisimien tarkkuus ja kyky tunnistaa kaikkea havaittua tietoa. Kuten käytetyssä laitteessa, myös tehokkaammilla TOF-MS-spektrometreilla ja nykyisillä kaupallisilla kirjastoilla kaikkien analyyttien tunnistaminen on mahdotonta.

Kirjastojen kehittämistä pitäisi ohjata näytekohdaisiin suuntiin tai pitäisi pystyä määrittämään tietyytyyppisten yhdisteiden olemassa- tai poissaolo. Kuten UPM X:n tapauksessa massaspektrin tunnistukset olisivat voineet olla paremmat, jos kirjastosta olisi poistettu alkoholeja ja *n*-alkeeneja sisältävät molekyylit. Itse tehty kirjasto olisi myös vaihtoehto, mutta 1000-3000 piikin kirjaston luominen edellyttäisi suurta työmäärää.

Työn suorittaminen vaati yhden lisäkuukauden panostamista pelkästään laboratoriotyöskentelyyn suunnitellun kuuden kuukauden lisäksi. Tämä johtui ennalta-arvaamattomista laitteisto-ongelmista ja nestetyypen jaksollisista toimituksista sekä haasteista tiedonkäsittelyohjelmiston kanssa. Työ pystyttiin kuitenkin saattamaan siihen pisteeseen, että analyysin kehittämistä voidaan jatkaa ja tehdä mahdollisia muutoksia laitteiston konfiguraatioon.

## Kirjallisuusviitteet

1. A.C. Lewis, N. Carslaw, P.J. Marriot, R.M. Kinghorn, P. Morrison, A.L. Lee, K.D. Bartle ja M.J. Pilling, A larger pool of ozone-forming compounds in urban atmospheres, *Nature*, **2000**, *405*, 778-781.
2. J. Beens, H. Boelens ja R. Tijssen, Quantitative aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*(1), 47-54.
3. J. Beens ja U.A.Th. Brinkman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography—a powerful and versatile technique, *Analyst*, **2005**, *130*(2), 123–127.
4. G.S. Frysinger ja R.B. Gaines, Quantitive determination of BTEX and total aromatic compounds in gasoline by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC), *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, *22*(4), 195-200.
5. K. Robards, P.R. Haddad ja P.E. Jackson, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Academic Press Limited, Lontoo, Iso-Britannia, 1994.
6. H. Weil ja T.I. Williams, History of chromatography, *Nature*, **1950**, *166*, 1000-1001.
7. Inverse gas chromatography for characterization of alumina and other inorganic materials, <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=5178>, Surface Measurement Systems Ltd., (31.7.2017).
8. How do small particle size columns increase sample throughput?, [http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm\\_A016](http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016), Rick Lake, Pharmaceutical Innovations Chemist, (31.7.2017).
9. <http://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/van-deemter-plot-open-tubular-gc-column-three-different-mobile-phases-1-reason-differences-q18446550>, (31.7.2017).

10. Gas chromatography, <http://chemistry.tutorvista.com/analytical-chemistry/gas-chromatography.html>, (31.7.2017).
11. Gas chromatography, <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm>, Sheffield Hallam University, (31.7.2017).
12. J. Beens, H.-G. Janssen, M. Adahchour ja U.A.Th. Brinkman, Flow regime at ambient outlet pressure and its influence in comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1086*(1), 141-150.
13. L.F. de Alencastro, D. Grandjean ja J. Tarradellas, Application of multidimensional (Heart-cut) gas chromatography to the analysis of complex mixtures of organic pollutants in environmental samples. *Chimia*, **2003**, *57*(9), 499-504.
14. M.K. Kallio, *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: Instrumental and Methodological Development*, Väitöskirja, Helsingin yliopisto, Kemian laitos, Analyttisen kemian laboratorio, Helsinki, 2008.
15. GC basics theory, <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHonOvmOIIeCzB&subNav=tlpbfDsHonOvmOIIeCzBsB>, Harold McNair, Virginia Tech, Yhdysvallat, (31.7.2017).
16. R.E. Mohler, B.J. Prazer ja R.E. Synovec, Total-transfer, valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *555*(1), 68-74.
17. M. Kallio, M. Kivilompolo, S. Varjo, M. Jussila ja T. Hyötyläinen, Data analysis programs for comprehensive two-dimensional chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2009**, *1216*(13), 2923-2927.
18. Utilizing GC x GC for advanced analytical analysis of volatile and semi-volatile organic compounds, [https://www.researchgate.net/publication/252478303\\_Utilizing\\_GC x GC\\_for\\_Advanced\\_Analytical\\_Analysis\\_of\\_Volatile\\_and\\_Semi-Volatile\\_Organic\\_Compounds](https://www.researchgate.net/publication/252478303_Utilizing_GC_x_GC_for_Advanced_Analytical_Analysis_of_Volatile_and_Semi-Volatile_Organic_Compounds), Mark Libardoni, Ph.D., Chief Executive Officer, Volatile Analysis Corporation – Huntsville, Yhdysvallat, (31.7.2017).

19. M. Merrick, Simply GC x GC™, GC x GC made simply to use, webinaari, LECO Corporation, 19.7.2017.
20. T. Hyötyläinen, M. Kallio, K. Hartonen, M. Jussila, S. Palonen ja M.-L. Riekkola, Modulator design for comprehensive two-dimensional gas chromatography: quantitative analysis of polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(17), 4441-4446.
21. Comprehensive two dimensional gas chromatography (GC x GC) for lipid analysis,  
<http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=41157>, Prof. Giorgia Purcaro, (31.7.2017).
22. M. Kallio ja T. Hyötyläinen, Simple calibration procedure for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1200(2), 264-267.
23. M. Kallio ja T. Hyötyläinen, Quantitative aspects in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1148(2), 228-235.
24. J.V. Seeley, S.K. Seeley, E.K. Libby ja J.D. McCurry, Analysis of biodiesel/petroleum diesel blends with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **2007**, 45(10), 650-656.
25. J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 2. Painos, Raven Press, New York, Yhdysvallat, 1985.
26. Mass spectrometry: a molecular scale,  
<https://uakk.wordpress.com/2013/04/25/mass-spectrometry-a-molecular-scale/>, (31.7.2017).
27. Quadrapole mass spectrometer (QMS),  
<http://www.sprl.umich.edu/projects/QMS/index.php>, (31.7.2017).
28. Mass spectrometry of peptides and proteins,  
[https://www.ctu.edu.vn/~dvxe/Bioinformatic%20course/mod2/mod2\\_0.html](https://www.ctu.edu.vn/~dvxe/Bioinformatic%20course/mod2/mod2_0.html), (31.7.2017).

29. K. Downard, *Mass Spectrometry: A Foundation Course*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, Iso-Britannia, 2004.
30. Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS), <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/tof.htm>, (31.7.2017).
31. J.G. Speicht, *Handbook of Petroleum Product Analysis*, 2. Painos, John Wiley & Sons, Laramie, Yhdysvallat, 2015.
32. K.H. Altgelt, *Composition and Analysis of Heavy Petroleum Fractions*, Marcel Dekker Inc., New York, Yhdysvallat, 1994.
33. C. Vendeuvre, R. Ruiz-Guerrero, F. Bertoncini, L. Duval, D. Thiébaud ja M.-C. Hennion, Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates. *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1086*(1), 21-28.
34. J. Dallüge, J. Beens ja U.A.Th. Birkaman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J. Chromatogr. A*, **2003**, *1000*(1), 69-108.
35. M.D.R. Gomes da Silva, Z. Cardeal ja P.J. Marriott, Comprehensive two-dimensional gas chromatography: application to aroma and essential oil analysis. Kirjassa: H. Tamura, S.E. Ebeler, K. Kubota ja G.R. Takeoko, *Food Flavour*, American Chemical Society, Washington DC, Yhdysvallat, 2008, ss. 3-24.
36. M. Swartz ja I.S. Krull, *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker Inc., New York, Yhdysvallat, 1997.
37. G.S. Frysinger ja R.B. Gaines, Determination of oxygenates in gasoline by GC x GC. *J. High Resol. Chromatogr.*, **2000**, *23*(3), 197-201.
38. P.J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity: A Guide to Method Development*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Alankomaat, 1986.