CROMATOGRAFÍA DE GASES COMPLETA EN DOS DIMENSIONES: APLICACIONES EN QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL

Lourdes Ramos

Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC), CSIC.
Juan de la Cierva 3. 28006 Madrid
l.ramos@iqog.csic.es

Abstract

La cromatografía de gases completa en dos dimensiones (GC×GC) puede considerarse una técnica establecida y aceptada en el campo analítico. Sin embargo, sigue siendo también una técnica en desarrollo y un campo de investigación muy activo al que continúan realizándose aportaciones, tanto desde el punto de vista instrumental, como en relación con el desarrollo de nuevo software para el tratamiento de datos o la evaluación de nuevos campos de aplicación. Respecto a este último tema, durante la última década, se observa una tendencia a pasar de los análisis dirigidos convencionales a abordar estudios no orientados cuyo objetivo es caracterizar tantos compuestos como sea posible. En el caso del análisis ambiental, esta aproximación ha llevado a la detección de un número enorme de contaminantes orgánicos en muestras ambientales de distinta naturaleza, e incluso a la identificación de sustancias tóxicas no antes descritas, demostrando la utilidad de la GC×GC en este activo campo de investigación.

1. Introducción

La cromatografía de gases (GC) con columnas capilares es probablemente la técnica de separación más adecuada para la determinación de compuestos (semi-) volátiles en mezclas complejas. Su aplicación al análisis de compuestos menos volátiles es también posible, pero requiere la trasformación de estos analitos en derivados más volátiles previa a su análisis instrumental. El acoplamiento de la GC con algunas de las técnicas de espectrometría de masas (MS) disponibles en la actualidad ha demostrado ser una estrategia de separación-detección con un enorme potencial, y que permite la identificación inequívoca y cuantificación precisa de trazas de los analitos de interés (límites de detección, LOD, en el orden de los ng) en una variedad de matrices complejas, como son las ambientales. Sin embargo, a pesar de esta gran capacidad de resolución y detección, existen mezclas de elevada dificultad para cuya correcta separación se requiere una capacidad de pico cromatográfico aún mayor. La cromatografía de gases completa en dos dimensiones (GC×GC) surgió para dar respuesta a este tipo de problemas. En GC×GC, los componentes de una mezcla compleja son sometidos a dos procesos de separación en serie, de tal forma que analitos que coeluyen en el primer proceso de separación (o dimensión, ^{1}D) sean separados en el segundo (o segunda dimensión, ^{2}D), aunque cumpliendo una serie de condiciones adicionales.

Este artículo revisa de manera sucinta las principales ventajas, limitaciones aún no resueltas y tendencias actuales en la aplicación de la GC×GC en estudios de química analítica ambiental, en concreto para el análisis de trazas de contaminantes orgánicos.

2. Consideraciones generales

No todos los procesos de separación que involucran dos columnas cromatográficas acopladas en serie son considerados procesos multidimensionales. El concepto de multidimensionalidad en cromatografía fue introducido por Giddings en los 80´s. Este autor enunció las dos condiciones básicas que debe cumplir una separación múltiple para ser considerada multidimensional [1, 2]:

- Los componentes de la mezcla deben ser sometidos a dos (o más) procesos de separación, que deben estar gobernados por mecanismos de separación diferentes.
- Los analitos resueltos en una de las etapas previas de separación deben mantenerse separados hasta que el total del proceso de separación se complete.

De acuerdo con la primera condición, puesto que los analitos se someten a dos (o más) mecanismos independientes de separación, al final del proceso, los compuestos se han caracterizado en base a dos (o más) parámetros distintos [3]. Es decir, en comparación con la GC monodimensional (1D GC), donde cada analito se caracteriza por un tiempo de retención específico, en la GC bidimensional (2D GC), cada compuesto se caracteriza por dos tiempos de retención independientes. Estos dos tiempos de retención le confieren una posición específica en un plano bidimensional (el denominado *contour-plot*), en el que los dos ejes corresponden a la escala de tiempos de retención de las dos separaciones cromatográficas que se llevan a cabo. De esta forma, la identificación preliminar de los analitos en 2D GC resulta más fiable que en 1D GC.

Hacer factible la segunda condición requiere el análisis cromatográfico independiente de fracciones relativamente pequeñas del eluato de la ^{1}D en una ^{2}D, con el fin de preservar la resolución conseguida en esa primera etapa de separación. Este proceso, que no es ni sencillo ni obvio, se consigue a través de un elemento instalado entre ambas columnas, el modulador, que actúa como interface y permite concentrar, enfocar y re-inyectar de manera rápida y en forma de pequeñas fracciones el eluyente de la ^{1}D en la ^{2}D para su análisis bajo condiciones de GC rápida.

El modulador es, por tanto, el corazón de la técnica y un instrumento fundamental para su correcto funcionamiento. En este sentido, cabe mencionar que buena parte de las investigaciones abordadas desde la introducción de la GC×GC se han centrado en el desarrollo y mejora de los distintos moduladores propuestos, siendo éste un campo de trabajo muy activo incluso hoy día. Existen distintos tipos de moduladores. Los primeros desarrollados fueron moduladores térmicos que incorporaban partes móviles, les siguieron los denominados "criogénicos" y, más recientemente, los basados en válvulas y en el control neumático de los flujos a través de las columnas. Su revisión excede el objetivo del presente artículo, por lo que se remite al lector a bibliografía más especializada para una discusión más profunda de las ventajas y limitaciones de cada uno de ellos [4, 5]. Baste decir aquí que los más empleados hoy son los criogénicos (de cuatros jets en dos etapas o de loop), seguidos de los basados en el control neumático de flujos, siendo los primeros los más recomendables para el análisis de residuos y los segundos para compuestos termolábiles.

El efecto de re-inyección de la muestra en su transferencia de la primera a la segunda dimensión, y las condiciones de análisis aplicadas en ésta última, dan lugar a picos cromatográficos muy estrechos (de 100-200 ms o menos) que hacen imprescindible el uso de detectores rápidos (con una velocidad de adquisición de datos > 100 Hz) o que adquieran *en continuo*. Por otra parte, ese efecto de enfoque, y el consecuente estrechamiento de la banda cromatográfica, resulta en un aumento de la sensibilidad (LODs más bajos) que ha permitido la recuperación de algunos detectores convencionales para su uso acoplados a GC×GC en análisis ambiental, como sería el caso del detector de ionización de llama (FID) o el microdetector de captura de electrones (µECD). Sin embargo, por otra parte, esta necesidad de una velocidad alta de adquisición de datos supone una limitación para su acoplamiento incluso a los analizadores de MS cuadrupolares (qMS) más rápidos comercializados en la actualidad. Aunque este acoplamiento es posible, en general, con el fin de garantizar la adquisición de un número mínimo de puntos para la correcta definición del pico cromatográfico, en GC×GC-qMS se debe restringir la adquisición de datos a un intervalo reducido de *m/z*, o trabajar en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM). El empleo de espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (ToF MS), con velocidades de adquisición de datos de hasta 500 Hz sin restricciones en el intervalo *m/z* monitorizado (*m/z* 10-999, o incluso 10-1500 en los nuevos instrumentos), permite superar estas limitaciones, por lo que el acoplamiento GC×GC–ToF MS es uno de los más empleados, en particular en el campo de la química analítica ambiental. No obstante, también se han descrito acoplamientos de la GC×GC con otros analizadores, como la trampa lineal (QqQ MS) o sistemas de alta resolución (HRMS), tanto ToF HRMS, como de sector magnético. Independientemente del analizador seleccionado y su resolución, la capacidad de confirmación estructural derivada del acoplamiento de GC×GC con estos instrumentos aporta un tercer criterio de identificación independiente y complementario a los dos tiempos de retención asociados a la aplicación de la GC×GC, lo que permite aumentar la seguridad en la identificación, incluso aunque el analizador de MS sea de baja resolución.

Como se ha indicado, el acoplamiento en línea dos columnas de GC que implican dos mecanismos diferentes de separación en GC×GC permite, en las condiciones adecuadas, maximizar la resolución entre los componentes de mezclas complejas. Este aumento en la capacidad de separación se ha empleado con distintos fines, como simplificar las etapas previas de preparación de muestra y facilitar la caracterización detallada de los cromatogramas, una cuestión relevante cuando se pretende la propuesta de perfiles característicos (como en los estudios de *fringerprint*), o para la identificación de posibles compuestos marcadores. Por otra parte, también facilita la identificación de los compuestos detectados mediante comparación con librería o por elucidación estructural, al proporcionar espectros de masas más limpios.

3. Aplicaciones en química analítica ambiental

De acuerdo con todo lo expuesto, se puede concluir que la GC×GC, en especial cuando se combina con ToF MS, es una técnica de elevadas prestaciones y gran flexibilidad que admite diversas formas de trabajo. La Fig. 1 muestra de manera esquemática algunas de las determinaciones y aplicaciones más comunes en el campo de la química analítica ambiental.

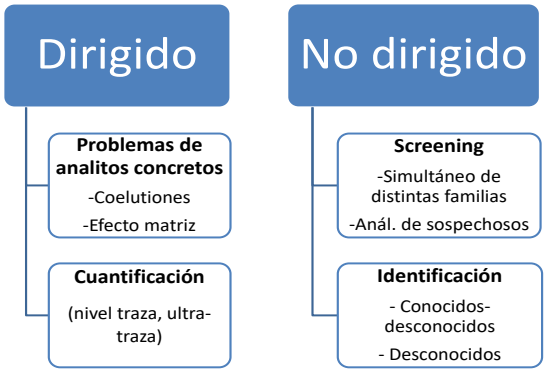

Fig. 1. Campos de aplicación de la GC×GC-ToF MS en química analítica ambiental y sus principales ventajas.

El objetivo básico de un análisis dirigido (o *target analysis*) es verificar la presencia o determinar la concentración de ciertos analitos preseleccionados en la muestra objeto de estudio. Este tipo de análisis es factible con GC×GC. Sin embargo, a pesar de que determinadas configuraciones permiten llevar a cabo determinaciones incluso al nivel de atogramo [6], lo cierto es que aún está por ver si la técnica es una alternativa realmente competitiva frente a otras técnicas monodimensionales basadas en el acoplamiento de GC con algunos de los potentes espectrómetros de masas disponibles en la actualidad. No obstante, y a pesar de la mejora en la selectividad ofrecida por algunos de estos analizadores, la GC×GC resulta superior a estas técnicas en aspectos dependientes de la resolución cromatográfica, como puede ser la mejora de la separación

entre analitos que coeluyen en 1D GC o la eliminación del efecto matriz.

Por otra parte, la GC×GC es especialmente útil (y ventajosa) en estudios (no dirigidos) de *fingerprinting*. En este campo, la posibilidad de obtener cromatogramas estructurados, en los que compuestos pertenecientes a una misma familia química forman grupos reconocibles en regiones concretas del *contour plot*, y en los que los isómeros aparecen formando estructuras organizadas (*roof-tile structures*) es una ventaja fundamental para la comparación rápida de los perfiles de los analitos en muestras diferentes, pero también para la identificación de analitos pertenecientes a clases caracterizadas, aun cuando no se disponga de su correspondiente patrón puro. La posibilidad de obtener estos cromatogramas estructurados con una elevada resolución cromatográfica (Fig. 2) hace que la GC×GC, en particular cuando se acopla con una técnica capaz de proporcionar información estructural, en general la MS (i.e., GC×GC-MS), resulte una técnica muy atractiva en estudios de screening no dirigidos (*non-target screening*, NTS).

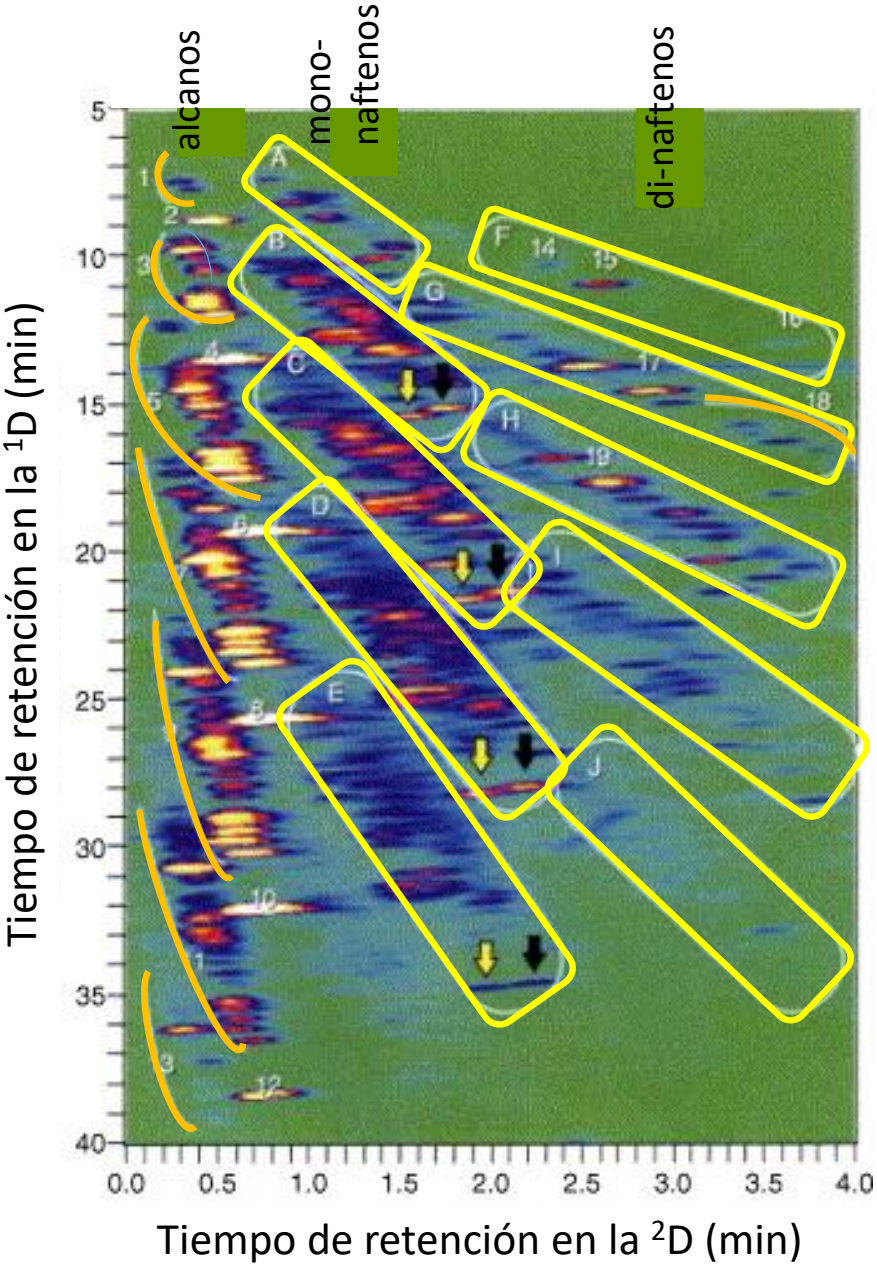

Fig. 2. *Contour plot* de un disolvente no aromático en GC×GC. (1) C10 ramificado, (2) n-C10, (3) C11 ramificado, (4) n-C11, (5) C12 ramificado, (6) n-C12, (7) C13 ramificado, (8) n-C13, (9) C14 branched, (10) n-C14, (11) C15 ramificado, (12) n-C15, (13) C16 ramificado, (14) desconocido, (15) trans-decalina, (16) cis-decalina, (17) trans-metildecalinas, (18) cis-metildecalinas, (19) C2-decalinas. (A–E) mono-naftenos C10 a C14, (F–J) Di-naftenos C10 a C13. Cada mancha en el *contour plot* corresponde a la reconstrucción de un pico cromatográfico. La intensidad de los colores en el *contour plot* es proporcional a la abundancia de los analitos detectados. Imagen adaptada de [7].

Durante la última década, y particular en los últimos años, se observa un interés cada vez mayor en la aplicación de la GC×GC-MS en estudios no dirigidos. Esta tendencia es especialmente clara en el campo medio ambiental, donde se está consolidando como una línea de investigación reconocible y muy activa. El motivo hay que buscarlo en la creciente preocupación por la presencia en el medio de un gran número de contaminantes y productos de transformación cuya dinámica y destino final son aún desconocidos. Por sus características, la GC×GC-MS resulta muy adecuada para este tipo de estudio, ya que además permite la identificación de potenciales contaminantes desconocidos en las muestras investigadas con un alto grado de seguridad.

El NTS de contaminantes busca identificar y comprender los compuestos presentes en una muestra sin tener información previa respecto a su existencia o identidad. Por tanto, estos estudios se plantean con una perspectiva amplia (i.e., -ómica), en el sentido de que se intenta preservar y analizar tantos contaminantes como esa posible. Este planteamiento hace que el enfoque adoptado en estas evaluaciones sea radicalmente diferente del aplicado en un estudio *target*, en el que el interés se centra en un grupo concreto de compuestos conocidos para los que se dispone de métodos establecidos y selectivos, tanto de preparación de muestra como para su análisis instrumental. Frente a esto, un análisis no dirigido parte de un proceso de tratamiento de muestra genérico. Es decir, comienza con una extracción exhaustiva de la muestra e incluye un mínimo (o ningún) tipo de limpieza o fraccionamiento posterior del extracto obtenido. No obstante, y a pesar de que esta simplificación del procedimiento de preparación de muestra favorece que se conserven un gran número de contaminantes, uno debe aceptar que nunca van a ser *todos* los presentes en la muestra (los analitos extraídos con un disolvente apolar no son los mismos que los recuperados con un extractante polar). Además, como cualquier técnica instrumental basada en GC, la GC×GC es idónea para la determinación de compuestos de volatilidad media y alta y apolares, mientras que aquellos de elevado peso molecular o muy polares se detectan mejor mediante cromatografía líquida. Es decir, en ningún caso se va a obtener una información completa respecto a la presencia de los contaminantes y sus productos de trasformación con una única técnica de análisis instrumental, si no que más bien se va a requerir de la información complementaria obtenida a través de distintos análisis. Estas limitaciones, unido a la complejidad de la mayor parte de las matrices ambientales, hace que, en la práctica, los estudios de NTS se enfoquen en algún grupo o categoría concreta de contaminantes para su estudio detallado (aunque esa categoría o clase incluya en ocasiones cientos de posibles compuestos, como sería el caso de los contaminantes orgánicos persistentes).

El potencial de la GC×GC-ToF MS en el campo del NTS de contaminantes y del análisis de compuestos sospechosos (*suspect screening analysis*, SSA, entendido aquí como un caso particular de NTS) ha quedado demostrado a través de diversos estudios publicados en los últimos años. Estas investigaciones cubren una gran variedad de matrices y analitos y, en su conjunto, han permitido la caracterización de cientos de sustancias tóxicas en las muestras evaluadas. Estudios representativos incluyen desde los asociados a procesos contaminantes bien conocidos, como los relacionados con el petróleo y sus derivados [8, 9], y prácticas agrícolas [10] o industriales [11], a otros asociados a temas de interés más recientes, como la lixiviación de compuestos tóxicos de desechos [12], y en particular electrónicos [13] o plásticos [14, 15], o la caracterización de tóxicos generados en incendios [16], por mencionar algunos ejemplos. En el marco de estos estudios se han publicado espectrotecas [16-18] que representan una muy valiosa fuente de información para que otros investigadores puedan comparar los espectros de masas de los analitos detectados en sus muestras con los encontrados por otros grupos, aunque no hayan sido aún identificados, a fin de conocer la distribución ambiental de potenciales nuevos contaminantes.

Algunos de estos trabajos han permitido, además, la detección en matrices ambientales de contaminantes no antes descritos, como puede ser el caso de ciertos derivados polibromados de hexahidroxantenos en atún [19], derivados perclorados del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) en delfines [17], algunos cloro-bromo-carbazoles nuevos en sedimentos [20], o diferentes potenciales contaminantes orgánicos emergentes en aire ambiental [21]. Aunque muchas de estas identificaciones incluyen la confirmación de las estructuras propuestas mediante su análisis por otra técnica complementaria, en general basada en MS/MS o HRMS [22], no en todos los casos se pudo confirmar dicha estructura mediante el deseable análisis del correspondiente patrón puro. En cualquier caso, estos estudios han evidenciado, por un lado, la complejidad de las mezclas de contaminantes presentes en el medio ambiente y, por otro, el carácter limitado de las listas de contaminantes consideradas en la legislación vigente y en los programas de monitorización ambiental y de alimentos en uso, en relación a la magnitud del problema de la contaminación ambiental en la actualidad. Pero, sobre todo, han evidenciado el potencial de la GC×GC en este campo de investigación.

Referencias

[1] J.C. Giddings, Use of multiple dimensions in analytical separations, in: H.J. Cortés (Ed.), Multidimensional Chromatography: Techniques and Applications. Chromatographic Science Series. Vol. , CRC Press, New York 1989, pp. 1-27.

[2] J.C. Giddings, Two-dimensional separations: concept and promise, Anal. Chem. 56 (1984) 1258A–1270A.

[3] P. Schoenmakers, P. Marriott, J. Beens, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography, LC-GC Eur. 16 (2003) 335-339.

[4] L. Ramos, Comprehensive two-dimensional gas chromatography. Comprehensive Analytical Chemistry (CAC) Series. Vol. 55, Elsevier, The Netherlands 2009.

[5] N.B.L. Milani, E. van Gilst, B.W.J. Pirok, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional gas chromatography— A discussion on recent innovations, J. Sep. Sci 46 (2023) 2300304.
[6] D.G. Patterson, S.M. Welch, W.E. Turner, A. Sjödin, J.F. Focant, Cryogenic zone compression for the measurement of dioxins in human serum by isotope dilution at the attogram level using modulated gas chromatography coupled to high resolution magnetic sector mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3274-3281.
[7] J. Beens, J. Blomberg, P.J. Schoenmakers, Proper tuning of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) to optimize the separation of complex oil fractions, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 182-188.
[8] M. Pena-Abaurrea, F. Ye, J. Blasco, L. Ramos, Evaluation of comprehensive two-dimensional gas-chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the analysis of polyaromatic hydrocarbons in sediments, J. Chromatogr. A 1256 (2012) 222-231.
[9] I.A. Titaley, M. Ogba, L. Chibwe, E. Hoh, P.H.Y. Cheong, S.L. Simonich, Automating data analysis for two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry non-targeted analysis of comparative samples, J. Chromatogr. A 1541 (2018) 57–62.
[10] H.G.J. Mol, H. van der Kamp, G.V.D. Weg, M. van der Lee, A. Punt, T.C. de Rijk, Validation of automated library-based qualitative screening of pesticides by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of flight mass spectrometry, J. AOAC Int. 94 (2011) 1722-1740.
[11] O. Vaye, R.S. Ngumbu, D. Xia, A review of the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography MS-based techniques for the analysis of persistent organic pollutants and ultra-trace level of organic pollutants in environmental samples, Rev. Anal. Chem. 41 (2022) 63-73.
[12] C. Veenaas, P. Haglund, Methodology for non-target screening of sewage sludge using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 4867-4883.
[13] M. Ubukata, K.J. Jobst, E.J. Reiner, S.E. Reichenbach, Q. Tao, J. Hang, Z. Wu, A.J. Dane, R.B. Cody, Non-targeted analysis of electronics waste by comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with high-resolution mass spectrometry: Using accurate mass information and mass defect analysis to explore the data, J. Chromatogr. A 1395 (2015) 152-159.
[14] E. Hurtado-Fernández, M. Velázquez-Gómez, S. Lacorte, L. Ramos, Exhaustive characterization of (semi-)volatile organic contaminants in car dust using comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry, J. Hazard. Mat. 411 (2021) 125058.
[15] C. Carrero-Carralero, J. Escobar-Arnanz, M. Ros, S. Jiménez-Falcao, M.L. Sanz, L. Ramos, An untargeted evaluation of the volatile and semi-volatile compounds migrating into food simulants from polypropylene food containers by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, Talanta 195 (2019) 800-806.
[16] J. Escobar-Arnanz, S. Mekni, G. Blanco, E. Eljarrat, D. Barceló, L. Ramos, Characterization of organic aromatic compounds in soils affected by an uncontrolled tire landfill fire through the use of comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1536 (2018) 163-175.
[17] E. Hoh, N.G. Dodder, S.J. Lehotay, K.C. Pangallo, C.M. Reddy, K.A. Maruya, Nontargeted comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry method and software for inventorying persistent and bioaccumulative contaminants in marine environments, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 8001-8008.
[18] J. Escobar-Arnanz, M. Pena-Abaurrea, F.J. Santos, L. Ramos, Non-target analysis of organohalogenated contaminants in deep-sea fishes from the Mediterranean Sea by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, Sci. Total Environ. 877 (2023) 162873.
[19] M. Pena-Abaurrea, A. Covaci, L. Ramos, Comprehensive two-dimensional gas-chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the identification of organobrominated compounds in bluefin tuna, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6995-7002.
[20] M. Pena-Abaurrea, K.J. Jobst, R. Ruffolo, L. Shen, R. McCrindle, P.A. Helm, E.J. Reiner, Identification of potential novel bioaccumulative and persistent chemicals in sediments from Ontario (Canada) using scripting approaches with GC × GC-TOF MS analysis, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 9591-9599.
[21] L. Qiao, L.R. Gao, Y. Liu, D. Huang, D. Li, M.H. Zheng, Recognition and health impacts of organic pollutants with significantly different proportions in the gas phase and size-fractionated particulate phase in ambient air, Environ. Sci. Technol. 56 (2022) 7153-7162.
[22] E.L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, J. Hollender, Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence, Environ. Sci. Technol. 48 (2014).