

**DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIES ANALÍTIQUES PER  
A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS ORGÀNICS EN  
MATRIUS COMPLEXES.  
APLICACIÓ A L'ESTUARI DEL RIU EBRE**

**Eric Jover**

**Barcelona, Juny 2006**

## 1. Introducció

L'origen de les tècniques de separació rau en primer lloc amb la curiositat i després necessitat de l'espècie humana per tal d'esbrinar la composició qualitativa i quantitativa de les nombroses barreges de compostos químics que ens envolten. Així a la natura, hi podem trobar innumerables barreges complexes com ara per exemple, el petroli que consisteix en una barreja de més de 100.000 compostos o també en el nostre propi organisme conformat per més de 100.000 proteïnes diferents.

A partir del desenvolupament del racionalisme de Descartes, els científics han intentat estudiar amb ull crític, la natura, però sovint han topat contra aquesta gran complexitat que li és inherent. La manera de superar aquesta limitació fou de disseccionar-la per entendre'n l'essència. Per això, ja fa temps que s'han intentat separar les barreges en productes menys complexos, i així doncs, més fàcils d'estudiar. D'aquesta manera, ja al 1834, F.F. Runge [Runge, 1834] separava tints i extractes de plantes amb trossos de paper i/o roba.

A partir d'aquest moment, les tècniques separatives van anar millorant i alhora diversificant-se. Així van aparèixer, les tècniques cromatogràfiques: la cromatografia de líquids al 1941 (LC) [Tiselius, 1941], la cromatografia gas/sòlid al 1951 [Cremer i Prior, 1951], la cromatografia gas/líquid al 1952 [James i Martin, 1952], la cromatografia de fluids supercrítics (SFC) [Klesper *et al.*, 1962] i l'electroforesi capil·lar (CE). Totes aquestes tècniques cromatogràfiques, amb les seves particularitats, s'han anat desenvolupant al llarg dels anys mantenint cadascuna un nínxol particular en el món de les tècniques separatives. Potser, el factor que diferencia més les tècniques cromatogràfiques entre si és la naturalesa i les propietats de les fases mòbils utilitzades. Així doncs, a la Taula 1 se'n resumeixen algunes de les seves característiques físiques que ajuden a explicar les seves aplicacions. En el cas de la comparació entre la LC i la SFC també s'ha de considerar que alguns anàlits es podran solubilitzar més fàcilment en SFC que en LC jugant amb la densitat del fluid i la naturalesa i proporció del modificador emprat [Gere, 1983]. En resum, podríem dir que depenent de les característiques dels compostos a estudiar s'escollirà entre les diferents tècniques cromatogràfiques disponibles i, encara que no sigui sempre cert, en regla general es pot dir que pels anàlits volàtils o semivolàtils es preferirà la GC, pels compostos polars es preferirà la LC i per compostos apolars d'elevat pes molecular s'hauria de seleccionar la SFC.

**Taula 1.** Característiques fisicoquímiques de les principals fases mòbils emprades en tècniques cromatogràfiques.

<b>Tècnica</b>	<b>Fase mòbil</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressió (atm)</b>	<b>Densitat (g mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viscositat (cP)</b>	<b>Diffusivitat (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
<b>GC</b>	Heli <sup>1</sup>	200	1.5	2x10 <sup>-4</sup>	0.02	0.1
<b>LC</b>	Aigua <sup>2</sup>	20	100	1.0	1	10 <sup>-5</sup>
<b>SFC</b>	CO <sub>2</sub>	100	80	0.15	0.02	10 <sup>-3</sup>
		35	200	0.8	0.1	10 <sup>-4</sup>

<sup>1</sup>També s'utilitzen hidrogen i nitrogen<sup>2</sup>També es poden utilitzar altres solvents purs o en barreges

Cal destacar també que algunes tècniques separatives s'han desenvolupat amb l'objectiu de ser tan sols una etapa prèvia de la pròpia anàlisi (tècniques de purificació). En aquest cas s'empren en pretractaments que tenen, generalment, com a funció fraccionar els compostos presents en una barreja en funció d'alguna propietat comuna a les seves estructures químiques (polaritat, geometria, reactivitat, etc.) com ara per exemple la cromatografia d'exclusió estèrica. En aquest treball no tractarem en detall aquestes tècniques però cal considerar que com més passos siguin necessaris per a realitzar el procés analític més costosa en temps i en diners serà la implantació d'aquesta metodologia. A més, també cal destacar que les recuperacions analítiques tenen tendència a ser inversament proporcionals al número de passos analítics que tingui la metodologia emprada.

Recentment, ha crescut l'interès per les biomolècules de pes molecular elevat com poden ser enzims, proteïnes i l'ADN que ens endinsen en el món de la proteòmica i la genòmica. Per analitzar aquestes biomolècules s'utilitzen principalment tècniques d'espectrometria de masses acoblades, com la LC-MS [Hart i Gaskell, 2005] o la CE [Quigley i Dovichi, 2004] o no acoblades com el MALDI-TOF i la FTIR-MS ciclòtrònica que s'aplica també per la caracterització dels àcids húmics [Stenson *et al.*, 2002].

En la present Tesi, ens centrarem exclusivament a descriure les característiques de la cromatografia gas/líquid (GLC) i les seves diferents variants, així com alguns dels avenços que ha conegut a partir dels seus inicis (1952) fins a l'actualitat.

Les prestacions de la GLC han anat millorant en el decurs de les seves varies dècades d'existència, desenvolupant-se tant els aspectes instrumentals com d'altres: la

columna cromatogràfica, la injecció o la detecció. No obstant això, el canvi que va provocar el salt qualitatiu més important fou el desenvolupament de les columnes capil·lars [Golay, 1957, Golay, 1958] que permetien treballar amb longituds de columna molt més grans degut a la elevada permeabilitat dels capil·lars oberts. Aquestes columnes capil·lars aconseguien una millor separació o bé el mateix resultat que les columnes reblertes però amb un temps d'anàlisi 10 cops menor [Bartle i Myers, 2002]. Ara bé, degut a alguns inconvenients com ara l'adsorció de les columnes metàl·liques, la fragilitat de les columnes de vidre i la seva limitada capacitat d'introducció de mostra va fer que la seva introducció generalitzada no es materialitzés fins quan van aparèixer les columnes de sílice fosa. En la fabricació d'aquestes columnes s'empra la tecnologia desenvolupada per les fibres òptiques i tenen un recobriment extern de poli-imida que les fa molt més resistents i flexibles [Dandeneau i Zerenner, 1979].

Pel que fa a les tècniques de detecció, a partir del primer detector que va ser un katharometre [Ray, 1954] han anat apareixen nous instruments cada cop més sensibles. Cal destacar, entre altres, el detector de ionització de flama (FID) [McWilliam i Dewar, 1958] que ha estat el detector universal per excel·lència (robust i amb un ampli interval de linealitat) i alguns detectors més específics com ara el detector de captura d'electrons (ECD) [Lovelock i Lipsky, 1960], el detector fotomètric de flama (FPD) [Brody i Chaney, 1966] o el detector de nitrogen i fòsfor (NPD) [Kolb i Bischoff, 1974] (encara que hagi anat millorant al llarg del temps, sobretot pel que fa la pastilla de sals de rubidi, es caracteritza per una gran sensibilitat i una baixa repetitivitat). Finalment, el detector que cada cop està agafant més rellevància és l'espectròmetre de masses (MS) degut a la reducció del seu cost, la seva versatilitat i a la gran quantitat d'informació que proporciona [Gohlke, 1959]. En aquest últim cas, és interessant destacar una petita curiositat. El primer acoblament GC-MS es va realitzar amb un espectròmetre de masses de temps de vol (ToF MS). Malgrat això, aquest tipus de detectors van gairebé desaparèixer i van ser substituïts pels quadrupols, i és tan sols últimament que sembla que estiguin reemergint amb força. Aquest comportament segurament ve del fet que en els seus inicis no hi havia un utilatge informàtic de gestió de dades suficientment potent per aprofitar la capacitat del ToF MS.

Finalment, un altre dels aspectes importants en el desenvolupament de la GC és la millora de la introducció de mostra, ja que introduir una fracció representativa d'una mostra en una columna cromatogràfica capil·lar sense saturar-ne la fase no és trivial. Però ja al 1959 es va desenvolupar el injector de *split* que permetia introduir dins de la

columna tan sols una fracció de la mostra injectada [Desty *et al.*, 1959]. De totes maneres, més endavant es va veure que tancant aquesta vàlvula de *split (splitless)* es podien analitzar elements traça que es concentraven en cap de columna [Grob i Grob, 1969]. Cal dir que aquest tipus d'injecció és actualment la més utilitzada pel que fa a l'anàlisi ambiental. Una altre manera d'analitzar elements traça era aconseguir injectar grans quantitats de mostra (aprox. 100 µL) que es va assolir amb el desenvolupament del injector de vaporització a temperatura programada (PTV). Un altre tipus d'injector va néixer a fi d'evitar les pèrdues observades en els injectors de *split/splitless* i evitar el fenomen de discriminació, es va anomenar la injecció *on-column* que consisteix en introduir la mostra directament dintre de la columna cromatogràfica [Zlatkis i Walker, 1963].

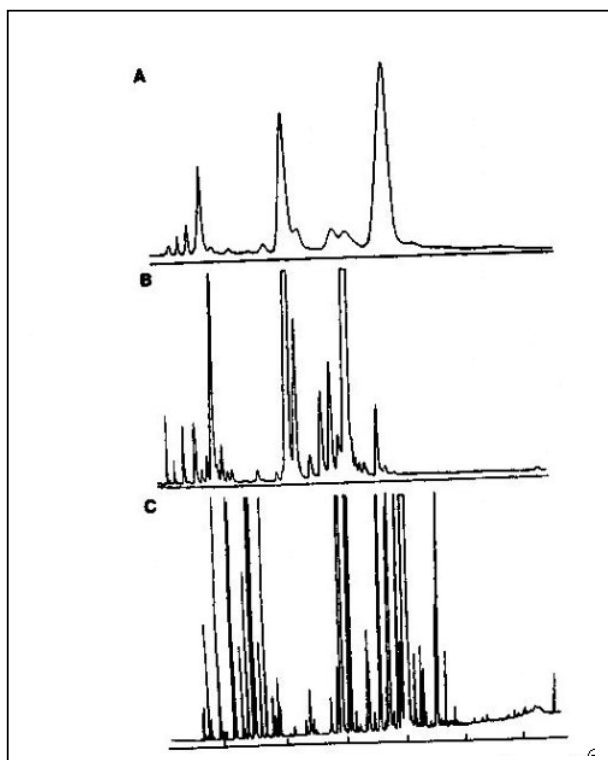
Després d'aquest breu resum de l'evolució que han conegut les tècniques separatives en general i la GC en particular, passarem a descriure les diferents alternatives que existeixen actualment pel que fa a la GC d'alta resolució tant monodimensional com multidimensional i que ajuden a solucionar la complexitat de les matrius d'interès; la GC essent, en l'actualitat, la tècnica més emprada per a la determinació de compostos volàtils i semivolàtils.

Encara que no correspongui a cap millora tecnològica de la GC cal destacar els constants avenços en les tècniques de derivatització que permeten ampliar, de manera considerable, l'interval de compostos analitzables per aquesta tècnica cromatogràfica. Aquestes derivatitzacions permeten disminuir la polaritat i augmentar la volatilitat dels compostos d'interès fent-los més fàcilment cromatografiables [Halket, 1993].

## **1.1 Tècniques separatives d'alta resolució**

### *1.1.1 Monodimensionals*

Pel que fa les tècniques monodimensionals cal pensar que tan sols prendrem en consideració les tècniques basades en columnes capil·lars que com ja hem comentat permeten una resolució cromatogràfica molt més elevada. Així a la Figura 1 hi podem veure un clar exemple [Jennings, 1979] de la separació d'un oli essencial en diferents columnes cromatogràfiques. Hom pot passar de tenir uns 5.000 plats cromatogràfics teòrics en una columna reblerta de 5 m a uns 300.000 en una columna capil·lar de 60 m [Barry, 2004].

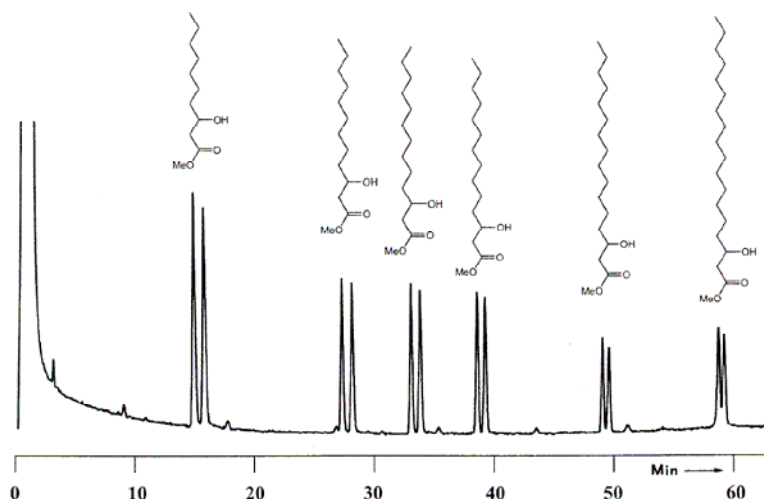


**Figura 1.** Oli essencial de menta. (A) columna reblerta de 1.8 m  $\times$  6.35 mm ID, (B) columna capil·lar d'acer de 152 m  $\times$  0.76 mm ID, (C) columna capil·lar de vidre 50 m  $\times$  0.25 mm ID [Jennings, 1979].

Un dels factors més importants en GC per a aconseguir una bona separació dels anàlits d'interès és la correcta selecció de la fase estacionària. Avui dia existeixen una gran varietat de fases líquides generalment polisiloxans substituïts que cobreixen un espectre molt ampli de polaritats, des de les apolars, com per exemple la de 100% polidimetilsiloxà, a les molt polars, com ara les biscianopropilpolisiloxans. Cal destacar també el desenvolupament de fases estacionàries basades en ciclodextrines funcionalitzades que són enantioselectives. Per exemple a la Figura 2 es mostra la separació gairebé fins a la línia base dels enantiomers d'una sèrie homologa de hidroxiàcids. També s'han desenvolupat fases estacionàries en base a una estructura de sol gel que proporcionen una elevada estabilitat química [Shende *et al.*, 2003].

Recentment, també s'han desenvolupat noves fases estacionàries formades per líquids iònics que presenten propietats ambivalents, tot mostrant un comportament polar amb els anàlits polars i un comportament apolar amb els anàlits apolars degut a la seva estructura química. Així mateix, es poden també utilitzar per a separar enantiomers si

s'utilitza un selector quiral dissolt en un líquid iònic o si el mateix líquid iònic ja és quiral [Ding *et al.*, 2004].



**Figura 2.** Separació d'enantiomers d'una sèrie homologa d'èsters metàlics de hidroxiàcids amb una columna capil·lar (5 m × 0.25 mm) amb 0.25 μm de Chirasil-β-Dex 9 com a fase estacionària [Schurig, 2005].

Les fases estacionàries han anat millorant, també, pel que fa la seva estabilitat tèrmica disminuint-ne de manera considerable el sagnat. Així s'han desenvolupat fases estacionàries específiques per MS basades en grups silarilens que permeten disminuir de manera significativa la deriva de la columna. També, cal destacar en aquest punt el desenvolupament de la cromatografia de gasos d'elevada temperatura (HTGC) que permet analitzar compostos poc volàtils i d'elevat pes molecular. Aquesta tècnica està basada en columnes capil·lars, generalment curtes, recobertes amb fases estacionàries de policarborà, molt més estables tèrmicament, passant a ser en aquest cas el factor limitant la poli-imida que recobreix externament la columna capil·lar i que no pot superar els 360°C. Per aquesta raó, en alguns casos, s'utilitzen columnes metàl·liques, generalment d'alumini, amb les que es pot arribar a temperatures de 425°C [Philp, 1994]. Una altra manera d'analitzar compostos d'elevat pes molecular, sobretot si són termolàbils, és treballar a temperatures més baixes utilitzant sistemes cromatogràfics a pressió sub-ambient. En aquests casos cal un restrictor (generalment de 0.1 mm de diàmetre intern i 0.5 m de longitud) entre la columna de 0.53 mm de diàmetre intern i la precolumna. Aquest sistema acoblat a la font d'impacte electrònic d'un espectròmetre de masses, que treballa al buit, permet que la separació es realitzi en condicions de pressió sub-ambient

[Deursen *et al.*, 2000b]. Una altre de les avantatges d'aquesta tècnica és d'augmentar la rapidesa de l'anàlisi degut, justament, a que aconseguim eluir els compostos a temperatures inferiors ja que al disminuir la pressió del sistema disminueix també el punt d'ebullició dels anàlits el que permet reduir la longitud dels programes cromatogràfics.

La disminució del temps de l'anàlisi és un factor de gran importància ja que és clau per a augmentar la productivitat i així reduir els costos. No obstant, aquesta rapidesa d'anàlisi va associada a una pèrdua de resolució cromatogràfica i cal doncs arribar sovint a un compromís entre productivitat i poder de separació. A fi d'escurçar l'anàlisi, s'han utilitzat diferents mecanismes a part de la ja esmentada cromatografia en condicions de pressió sub-ambient. Habitualment es prefereix treballar amb columnes curtes de diàmetre intern  $<0.25$  mm i amb elevades pressions en cap de columna (entre 5 i 20 bar) [Cramers *et al.*, 1999, Lieshout *et al.*, 1998]. Una altra manera d'accelerar les separacions és emprar gradients de temperatura molt elevats com els que es poden aconseguir en la cromatografia *flash*, on la columna és disposa a dintre d'un tub metàl·lic que es calenta inductivament arribant a obtenir gradients propers als  $100^\circ/\text{s}$  [Lieshout *et al.*, 1998]. El problema de treballar amb columnes de diàmetre intern petit, és que la quantitat de mostra que es pot introduir és molt petita ja que aquesta quantitat màxima és proporcional al cúbic del diàmetre intern [Cramers *et al.*, 1999]. La cromatografia de gasos multi-capil·lar (MCGC), que consisteix a col·locar molts capil·lars de diàmetre intern molt reduït ( $40 \mu\text{m}$ ) en paral·lel (aprox. 900), permet solucionar aquest problema ja que la quantitat de mostra que es pot introduir és 900 cops la quantitat màxima dels capil·lars individuals. No obstant això, la resolució cromatogràfica d'aquests sistemes no és l'esperada degut, majoritàriament, a petites diferències en les propietats (longitud, diàmetre, eficiència, etc.) dels capil·lars individuals [Jitaru *et al.*, 2005].

Avui dia continua havent-hi una constant innovació en el camp de la GC [Eiceman *et al.*, 2004] i més concretament cal destacar els avenços realitzats en la miniaturització i en el desenvolupament de cromatografs portables. Un exemple espectacular és l'obtenció d'un xip de  $3 \text{ cm}^2$  que conté uns 3 m de microcanals de  $150 \mu\text{m}$  d'ampla i  $240 \mu\text{m}$  de profunditat, aquest xip assoleix uns 5500 plats teòrics. Aquest instrument s'ha utilitzat per a la determinació d'una barreja de compostos orgànics volàtils [Lambertus *et al.*, 2005].



Una manera de resoldre la complexitat implícita en la majoria de matrius que ens envolten és emprar detectors que siguin selectius o detectors que ens aportin un màxim d'informació possible de la matriu. D'aquesta manera, detectors selectius com el NPD han estat a bastament emprats per a determinar, per exemple, compostos organofosforats en matrius complexes atesa la seva selectivitat vers al nitrogen o fòsfor, reduint així la complexitat en la composició de la mostra inicial [Balnova, 1996]. El problema és que la utilització d'aquest tipus de detectors redueix tant l'interval d'anàlits que es poden analitzar simultàniament com la quantitat d'informació que s'obté de la mostra. D'aquí va sorgir la idea de la cromatografia dual que consisteix en un sistema cromatogràfic acoblat a dos detectors que poden disposar-se en sèrie o bé en paral·lel. Aquests sistemes permeten d'ampliar l'interval de compostos analitzats tot i gaudint de la simplificació de la matriu que representa treballar amb detectors selectius. Aquest tipus de configuració ja ha estat utilitzat emprant GC-TSD/FPD [Loconto i Gaind, 1989] on el TSD és un detector termoiònic, GC-ECD/FPD [Zuin *et al.*, 2003], GC-ECD/FID [Oaks *et al.*, 1964] i el més emprat el GC-ECD/NPD [Oh-Shin *et al.*, 1997]. Fins hi tot, considerant que la resposta obtinguda en un detector està correlacionada amb la concentració de l'anàlit i amb algunes de les seves propietats moleculars [Leathard i Shurlock, 1970]; els quocients de resposta entre els dos detectors es poden utilitzar com a complements d'informació qualitativa per tal de confirmar la identificació dels diferents compostos [Bicchi *et al.*, 1996].

Finalment, l'espectrometria de masses (MS) està esdevenint cada cop més la tècnica de detecció preferida per a la GC gràcies al grau de refinament que ha assolit durant les darreres dècades, fent-la al mateix temps, més accessible i robusta. Dels diferents tipus d'espectròmetres existents, el quadrupol és el preferit degut al seu baix cost però també s'han desenvolupat considerablement les trapes iòniques, els espectròmetres de masses d'alta resolució (HRMS) i els de temps de vol. Aquestes tècniques permeten obtenir una segona dimensió d'informació (espectres de masses) sent de gran utilitat en la identificació de compostos. Però sobretot, el fet d'utilitzar ions característics pot permetre de minimitzar les interferències de la matriu facilitant, així, la determinació quantitativa dels anàlits d'interès. Algunes d'aquestes tècniques presenten altres característiques interessants. Així, per exemple, el HRMS permet assolir una gran precisió en la mesura de les masses permetent així, una identificació molt més precisa dels anàlits. Una de les seves aplicacions més habituals és la determinació de dioxines [Abad *et al.*, 2004], anàlisi que s'ha de realitzar, per requisits

legals, amb una resolució superior a 10.000 [EPA, 2004]. Finalment, també s'ha de destacar la utilització d'espectròmetres de masses en tandem com el triple quadrupol [Lachenmeier *et al.*, 2003] que permeten d'obtenir molta més informació estructural dels compostos analitzats per etapes successives de fragmentació i aïllament de masses individuals. En aquest sentit, les trampes iòniques permeten de fer  $n$  vegades aquestes etapes ( $MS^n$ ) [Melchert i Pabel, 2004].

Com hem vist anteriorment, en GC s'ha d'arribar a un compromís entre rapidesa d'anàlisi i la resolució cromatogràfica. En GC-MS, al evitar moltes interferències no necessitem una resolució tan gran i podem augmentar, així, la rapidesa de l'anàlisi. En aquest sentit, s'han desenvolupat tècniques que fan compatibles la cromatografia ràpida amb l'espectrometria de masses com pot ser el GC-MS supersònic [Amirav *et al.*, 2001]. No obstant, cal esmentar que en cas de que la matriu sigui realment molt complexa pot haver-hi supressió iònica encara que aquest fenomen és més recurrent en LC-MS [Gomes *et al.*, 2004].

### 1.1.2 Multidimensionals

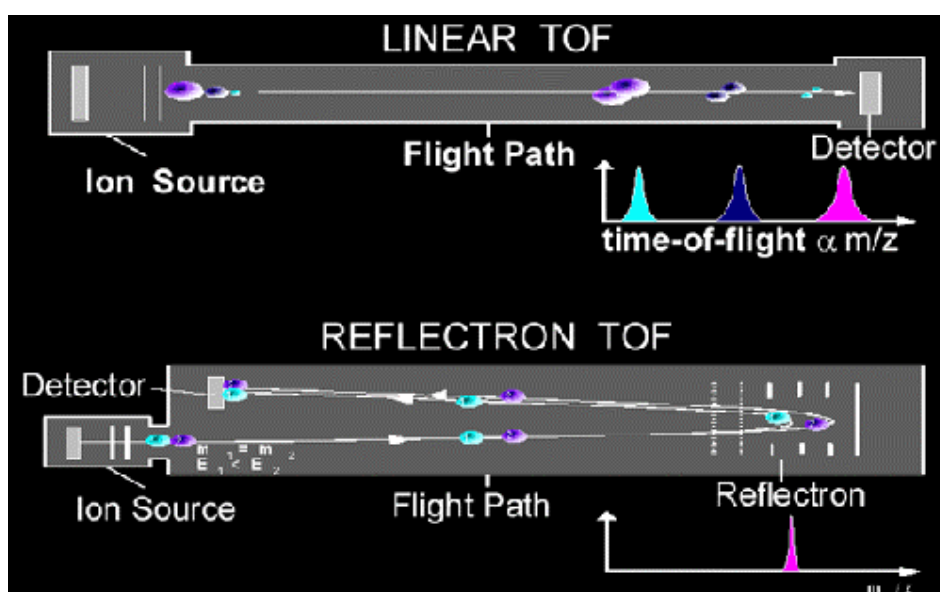
Degut a la gran complexitat de la majoria de mostres a analitzar, sovint, la GC no és suficient, i aleshores es fan necessaris llargs pretractaments per tal de reduir les interferències de la matriu. Una possible solució, per tal de minimitzar aquests passos previs, és de combinar columnes cromatogràfiques amb selectivitat diferents. Existeix una gran varietat de fases estacionàries per GC que basen la seva separació en diferents propietats dels anàlits a determinar. D'aquesta manera va sorgir la cromatografia de gasos multidimensional (MDGC). Aquesta tècnica consisteix en enviar una fracció de l'efluent d'una columna de GC a una altre columna de GC de selectivitat diferent. El punt clau del mecanisme és la transferència d'una fracció de la mostra d'una columna a l'altre. Principalment existeixen tres mecanismes diferents de transferència: A) el intercanviador de Deans, B) el sistema de vàlvules i C) les trampes criogèniques [Tomlinson *et al.*, 1996]. El sistema dissenyat per Deans [Deans, 1968] que funciona aplicant sobrepressions permet d'evitar que la mostra hagi de passar per una vàlvula eliminant així els efectes de memòria [Deans, 1981]. El sistema basat en trampes criogèniques consisteix a bloquejar fraccions de la mostra eluïda de la primera columna en trampes mantingudes a temperatures subambientals i que després s'escalfen per a reinjectar les fraccions en la segona columna. És important que aquest escalfament sigui ràpid per a evitar l'eixamplament de la banda d'injecció, utilitzant-se, generalment tubs

metàl·lics que s'escalfen elèctricament. A fi de poder analitzar mostres molt complexes, es treballa amb múltiples trampes criogèniques en paral·lel ja que el temps necessari per a atrapar i reinjectar una fracció faien que el sistema monotrapa perdés resolució [Krock *et al.*, 1993]. La *peak capacity* teòrica d'un MDGC correspon al producte de la *peak capacity* de cadascuna de les dues columnes. A la pràctica, la *peak capacity* és força més baixa ja que quan estem atrapant una fracció estem perdent la resolució que havíem aconseguit amb la primera columna cromatogràfica.

Fa una desena d'anys es va desenvolupar la cromatografia bidimensional integrada (GC×GC) que permet aproximar-se a la *peak capacity* teòrica. Aquesta tècnica representa una important millora ja que aconsegueix que la totalitat de l'efluent de la primera dimensió passi a la segona en comptes de introduir-hi tan sols fraccions com en el cas de la MDGC [Marriott *et al.*, 2003, Schomburg, 1996]. En GC×GC quan ens referim a les dues columnes cromatogràfiques del sistema, les anomenem primera i segona dimensió. El modulador, peça central del sistema, permet de tallar l'efluent de la primera dimensió a intervals regulars de temps gràcies a un sistema de criofocalització i de reinjecció. Aquests talls han de ser lo suficientment ràpids per a no malmetre la resolució cromatogràfica obtinguda en la primera dimensió i està generalment acceptat, que per assolir aquest objectiu cada pic cromatogràfic ha d'estar modulats un mínim de tres o quatre cops [Schoenmakers *et al.*, 2003]. Per aquest motiu, és preferible que els pics cromatogràfics de la primera dimensió no siguin massa estrets i per això, s'utilitzen rampes de temperatura bastant lentes (entre 2 i 5° min<sup>-1</sup>) i els cromatogrames de GC×GC tenen la tendència a ser més llargs que en 1D-GC. No obstant això, cal puntualitzar que la recent utilització de columnes de 50 µm de diàmetre intern com a segona dimensió disminueix substancialment aquest problema [Adahchour *et al.*, 2003b]. Diferents paràmetres cromatogràfics poden influir en la separació en GC×GC com ara la temperatura, el cabal, les fases estacionàries i les longituds de columna [Ong *et al.*, 2002]. És important també assenyalar que una de les principals limitacions d'aquesta tècnica és el gran volum de dades que obliga a manejar si es compara amb la 1D-GC. Aquest fet, augmenta la complexitat de la GC×GC i fa que, de moment, costi que aquesta tècnica sigui emprada en anàlisi de rutina [Hinshaw, 2004].

Algunes aplicacions així com la metodologia de selecció de les columnes foren resumides per Dalluge, en un treball de revisió [Dalluge *et al.*, 2003]. De totes maneres, podem esmentar que, normalment, la segona dimensió acostuma a ser una columna curta (aprox. 1 m) i amb un diàmetre intern petit (aprox. 100 µm). Això fa que els temps

de retenció de la segona dimensió siguin sovint inferiors a 6 s obtenint pics cromatogràfics molt estrets. Aquest fet provoca la necessitat de detectors molt ràpids per a poder fer-ne el seu seguiment (FID i  $\mu$ ECD). Això no obstant, el ToF-MS és una tècnica prometedora ja que la seva velocitat d'adquisició està perfectament adaptada a les necessitats de la GC×GC. Gràcies a l'acoblament GC×GC-ToF MS es pot tenir accés a 4 dimensions d'informació: temps de retenció ( $R_t$ ) de la primera dimensió,  $R_t$  de la segona dimensió, espectre de masses i abundància que són de gran utilitat per a la anàlisi de mostres complexes. A la Figura 3 es mostra el funcionament d'un detector ToF MS.



**Figura 3.** Diagrama bàsic mostrant el funcionament d'un ToF-MS lineal i un reflectró [Centre, 2006].

En aquest instrument el temps que triga un ió a arribar al detector ve definit per l'equació següent i depèn del pes de la partícula:

$$t = \sqrt{\left(\frac{2md}{eE}\right)} + L\sqrt{\left(\frac{m}{2eV_0}\right)}$$

on  $t$  és el temps,  $m$  el pes de la partícula,  $d$  la longitud de la zona d'acceleració,  $e$  la càrrega electrònica,  $E$  el camp electrostàtic aplicat a la font,  $L$  la longitud de la zona lliure de camp i  $V_0$  el potencial d'acceleració. Aquest tipus d'aparell introduït inicialment l'any 1946 [Stephens, 1946] presenta, teòricament, els avantatges d'un interval de masses il·limitat, obtenció d'un espectre de masses complet per a cada pols ionitzant, la no necessitat d'escanejar el feix ionitzat i sobretot una gran velocitat d'adquisició.

L'acoblament GC×GC-ToF MS ha estat emprat en la determinació de compostos volàtils d'essències i olis [Gogus *et al.*, 2006, Ozel *et al.*, 2004, Shellie *et al.*, 2001, Shellie *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2004, Zhu *et al.*, 2005], barreges de compostos volàtils [Dimandja, 2003], en el fum de cigarret [Dalluge *et al.*, 2002b, Lu *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2004], de compostos aromàtics en aliments [Adahchour *et al.*, 2004, Adahchour *et al.*, 2003a, Adahchour *et al.*, 2005b], també s'ha utilitzat per a caracteritzar teixits animals [Shellie *et al.*, 2005], per a analitzar metabòlits en orina [Sinha *et al.*, 2004], caracteritzar el material particulat en aerosol [Hamilton *et al.*, 2004, Hamilton *et al.*, 2005, Schnelle-Kreis *et al.*, 2005, Welthagen *et al.*, 2003], per a caracteritzar mostres de petroli [Deursen *et al.*, 2000a, Hao *et al.*, 2005, Vendevre *et al.*, 2004], per a l'anàlisi de plaguicides [Dalluge *et al.*, 2002a, Dalluge *et al.*, 2002c, Zrostlikova *et al.*, 2003], de contaminants en sediments [Morales-Muñoz *et al.*, 2005] i de compostos organoclorats [Focant *et al.*, 2005, Harju *et al.*, 2003a, Harju *et al.*, 2003b, Korytar *et al.*, 2005, Korytar *et al.*, 2003]. Un dels problemes de la tècnica és que la quantitat de dades que es generen i que s'han de tractar és encara més gran que en GC×GC emprant altres detectors. Per tant, la part informàtica del sistema és en aquests casos molt important i es necessiten ordinadors ràpids i amb una gran capacitat d'emmagatzematge. Recentment, s'està intentant realitzar l'acoblament GC×GC-MS utilitzant quadrupols de nova generació ràpids i sensibles que permeten analitzar correctament intervals de massa reduïts (50 uma) [Adahchour *et al.*, 2005a, Mondello *et al.*, 2005]. Ara bé, un dels problemes potencials de l'ús del quadrupol és la manca d'estabilitat de l'espectre de masses durant la durada del pic cromatogràfic la qual cosa, dificulta la identificació dels compostos i la seva quantificació. De totes maneres, les millores contínues en la instrumentació fan que aquest acoblament sigui prometedor.

Cal esmentar que el tractament quantitatiu de les dades és especialment difícil ja que per cada compost s'han d'identificar i quantificar, degut a la modulació, entre 3 i sis pics cromatogràfics. La quimiometria pot representar una gran ajuda en aquesta tasca atès que pot permetre canalitzar tot aquest allau d'informació i obtenir-ne millors resultats.

## **1.2 Caracterització de barreges complexes**

En aquest apartat es descriuen els anàlisis i matrius que han estat d'interès en aquesta Tesi Doctoral amb el benentès que les metodologies desenvolupades poden ser també d'interès en altres camps d'aplicació.

### 1.2.1 Lípids

Els lípids estan amplament distribuïts en el medi i en els éssers vius. Llurs propietats principals són, la seva capacitat d'emmagatzemar energia, les seves propietats estructurals i el seu rol important en el metabolisme. Els lípids inclouen diverses famílies químiques i han estat, habitualment definits operacionalment com insolubles en aigua i solubles en dissolvents no polars. Potser d'entre totes les famílies presents, la més important és la dels àcids grassos (FA) que formen part de la majoria de les cèl·lules vives i dels fluids cel·lulars. Podem trobar aquests compostos tant en forma lliure (FFA) com esterificats. Per a analitzar els FFA, la tècnica preferida, ja en els seus inicis i fins a l'actualitat és la GC [Ackman, 2002]. En aquest sentit, no s'ha d'oblidar que la primera aplicació de la GC va ser la separació d'àcids grassos volàtils (VFA) [James i Martin, 1952]. Els lípids s'analitzen per GC majoritàriament derivatitzats, els FFA metilats i els compostos amb grups hidròxi sililats. L'etapa de derivatització disminueix la polaritat i augmenta llur volatilitat fent-los més fàcilment cromatografiats.

La caracterització lipídica ha estat, de fa molt temps, d'interès per a diferents camps d'investigació. Tot seguit en destacarem alguns. En Geoquímica Orgànica, el concepte de fòssil químic ja fou introduït fa anys per a descriure compostos orgànics que permetien d'identificar els organismes precursors de la seva síntesi [Eglinton i Calvin, 1967]. Aquest concepte ha anat evolucionant fins a l'actual concepte, més genèric, de traçador molecular. Els traçadors moleculars i les seves propietats han estat utilitzats de diferents maneres en els estudis ambientals [Volkman, 2006]. La diversitat i abundància dels FAs (diferent llargada de cadena, possibles ramificacions i diferents graus d'insaturació) i d'altres lípids en el medi fa que siguin d'una gran utilitat per a estudiar les interaccions biològiques entre organismes [Zhukova i Kharlamenko, 1999], les cadenes alimentàries [Jeffries, 1970], ben caracteritzar ecosistemes [Bodineau *et al.*, 1998] i per ser traçadors dels processos biogeoquímics [Rontani i Volkman, 2003] o traçadors d'efluents de contaminació urbana [Grimalt *et al.*, 1990].

Alguns dels lípids tenen propietats que són de gran interès per a les indústries cosmètiques i farmacèutiques degut a la seva afinitat per l'epidermis humana. Aquests compostos permeten de transportar a través de la pell, aigua (hidratació) o compostos actius d'aplicació tòpica que normalment no aconseguirien traspasar-la. A més, alguns lípids han demostrat tenir efectes anticancerigens com per exemple els alcohols de

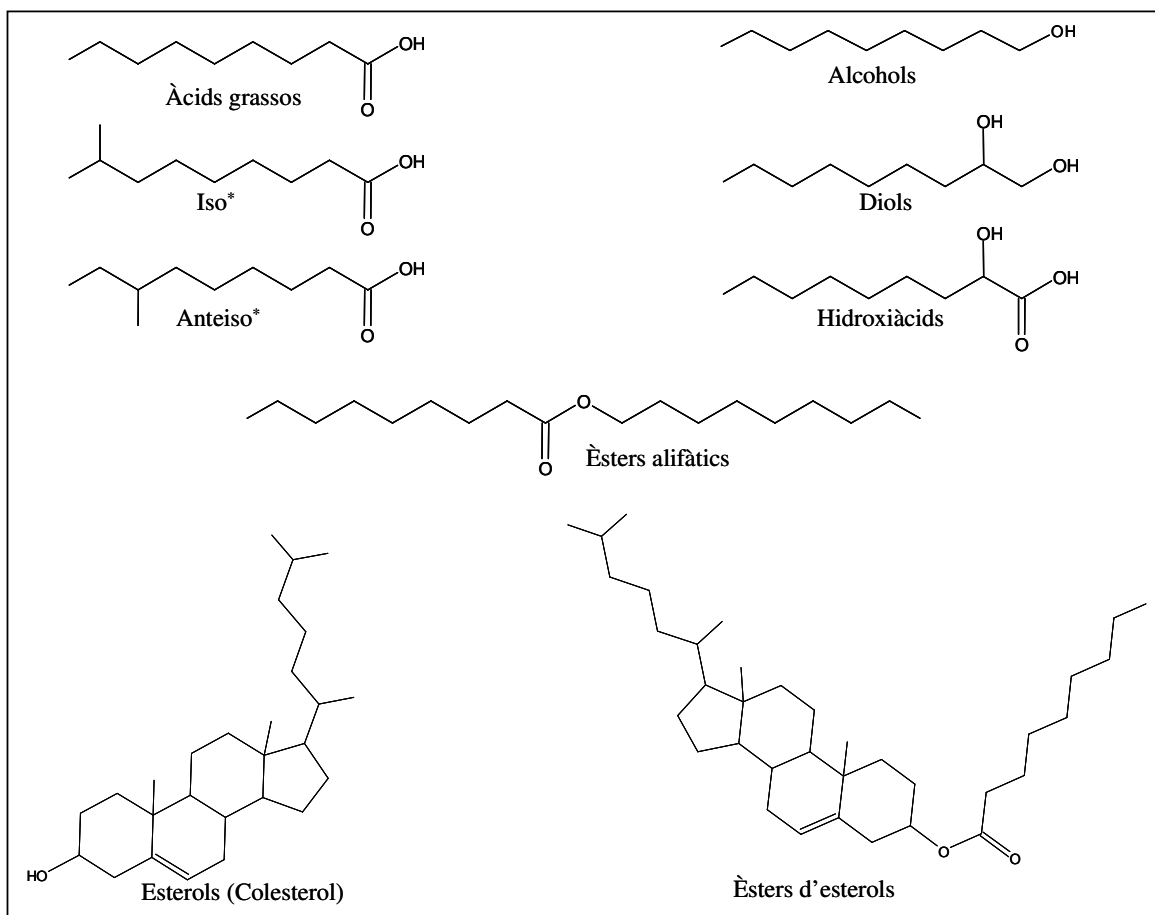
cadena llarga [Miwa *et al.*, 1996]. No obstant això, també hi ha compostos que poden ser nocius com l'àcid 22:1n9 que augmenta el risc cardíac ja que facilita l'acumulació de greix al teixit muscular del cor [Geus *et al.*, 2001] o alguns FFAs que són compostos al·lèrgics.

Aquests compostos també han estat àmpliament utilitzats en el camp de l'alimentació ja que la seva distribució pot ajudar a discriminar l'origen i les característiques ambientals on s'ha desenvolupat el producte [Amaral *et al.*, 2006]. També pot permetre de detectar possibles fraus com podria ser, per exemple, la presència d'olis vegetals en una llet animal [Kamm *et al.*, 2002]. Però aquests compostos no estan tan sol utilitzats per investigacions en la temàtica de l'alimentació sinó que la química forense també els empra, per exemple, per a datar una empremta digital [Archer *et al.*, 2005].

Com hem esmentat, els lípids són barreges complexes de compostos de diferents famílies químiques. En aquesta Tesi Doctoral s'ha utilitzat la lanolina com a barreja lipídica de referència. La lanolina s'obté de la purificació de les ceres, excretades per les glàndules sebàcies, que protegeixen les fibres de llana de les ovelles. La lanolina té nombroses aplicacions a la indústria farmacèutica i cosmètica gràcies a les seves propietats. La lanolina no purificada, o de baixa qualitat, s'utilitza a la indústria com a lubricant de peces mecàniques. És una barreja complexa constituïda per FAs, alcohols grassos (FALs), esterols, èsters alifàtics, èsters esteroidals, hidroxilàcids i diols [Thewlis, 1996, Thewlis, 1997]. A la Figura 4, es poden veure les estructures químiques de les famílies més significatives. Cal destacar que en la lanolina estan presents, pel que fa als FAs i als FALs, tant els compostos lineals com els compostos ramificats *iso* ( $(\omega-1)$ monometil substituït) i *anteiso* ( $(\omega-2)$ monometil substituït). A tall d'exemple de la complexitat d'aquesta barreja, hom calcula que la família de monoèsters alifàtics estaria formada per més de 10.000 compostos individuals degut a les múltiples combinacions possibles de FALs i FAs de diferent longitud de cadena i forma isomèrica [Barnett, 1986].

Normalment, la lanolina es caracteritza prèvia saponificació [Motiuk, 1979a, Motiuk, 1979b]. Aquest pretractament té com a objectiu reduir el pes molecular dels compostos a estudiar ja que es trenquen els lligams dels èsters i així són més fàcilment analitzables per GC. De totes maneres, cal destacar que amb aquest tipus de pretractament es perd molta informació estructural ja que no podem saber quins

compostos es trobaven inicialment sota la forma esterificada i quins es trobaven sota forma lliure.



**Figura 4.** Estructures químiques de les diferents famílies de compostos presents a la lanolina. Cal destacar que en la lanolina es troben aquests compostos amb diferents longituds de cadena i diferents isòmers posicionals. Aquests isòmers posicionals (iso i anteiso) es troben representats pels àcids grassos (\*)

Per a realitzar la caracterització lipídica d'una matriu tan complexa com la lanolina, ens veiem en la necessitat d'utilitzar diferents tècniques analítiques adequades a les particularitats de les diferents famílies químiques a analitzar, havent fins i tot de necessitar dues tècniques analítiques per a caracteritzar completament els FAs. Quan ha estat possible, s'ha analitzat la lanolina sense saponificar a fi de no perdre informació referent a la seva composició original. Quan s'han emprat tècniques cromatogràfiques monodimensionals sovint s'ha necessitat pretractar la mostra a fi de reduir-ne la seva complexitat utilitzant o bé mètodes de fraccionament (GPC) o de preconcentració (SPME).



### 1.2.2 Contaminants orgànics

Existeixen, cada cop més, contaminants distribuïts al medi ambient. En l'actualitat és del tot impossible trobar una mostra independentment de llur natura o origen, on no es detectin substàncies d'origen antropogènic. En aquest sentit, cal destacar els processos de transport a llargues distàncies que fan que substàncies persistents semivolàtils s'acumulin en les zones fredes (tant sigui per altitud com per latitud) [Grimalt i Drooge, 2006]. Així apart dels contaminants *històrics*, la utilització dels quals ja ha estat prohibida als països occidentals des de fa temps, s'hi afegeixen els productes de producció més recent i els seus productes de degradació augmentant així la complexitat de la barreja de contaminants existents. Cal destacar que poden existir interaccions (sinèrgies i antagonismes) entre aquests compostos que facin que la toxicitat d'una mostra no sigui forçosament l'addició de les toxicitats dels compostos individuals [Paustenbach, 2000].

En les últimes dècades, s'ha anat prohibint la utilització de plaguicides i productes industrials que per la seva toxicitat, persistència, bioacumulació i biomagnificació en la cadena tròfica representaven un risc per les persones i el medi ambient. Aquests compostos orgànics persistents (POPs) han estat l'objecte de diferents tractats internacionals enfocats a la seva eliminació com per exemple el Protocol sobre els POPs de la UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) del 1998 i el Conveni d'Estocolm que afecta a 12 POPs. Per això, ja fa uns anys que s'han desenvolupat alternatives a aquests compostos més respectuoses pel medi ambient. Generalment, aquests compostos són més polars (menys bioacumulables) i més fàcilment biodegradables (menys persistents).

A la necessitat de millora de l'eficiència de l'agricultura, hi trobem associada la utilització dels plaguicides. La seva eficàcia i suposada inoqüïtat van afavorir el seu ràpid desenvolupament. La paraula plaguicida inclou de fet diferents tipus de compostos orientats al control de diverses plagues. D'aquesta manera són considerats plaguicides els herbicides, fungicides i insecticides. Realitzant aquestes funcions podem trobar compostos inorgànics com el sulfat de coure; substàncies orgàniques persistents com el DDT; altres substàncies orgàniques com les triazines, els compostos organofosforats, els piretroids, etc.; anàlegs hormonals juvenils com el metoprè i agents microbians com el *Bacillus thuringiensis*. Aquests compostos presenten diferent toxicitat en humans. Poden ser immunodepressors, neurotòxics, teratogens, potencialment carcinogens; poden provocar alteracions hormonals, efectes reproductius i estrogènics, malalties de la

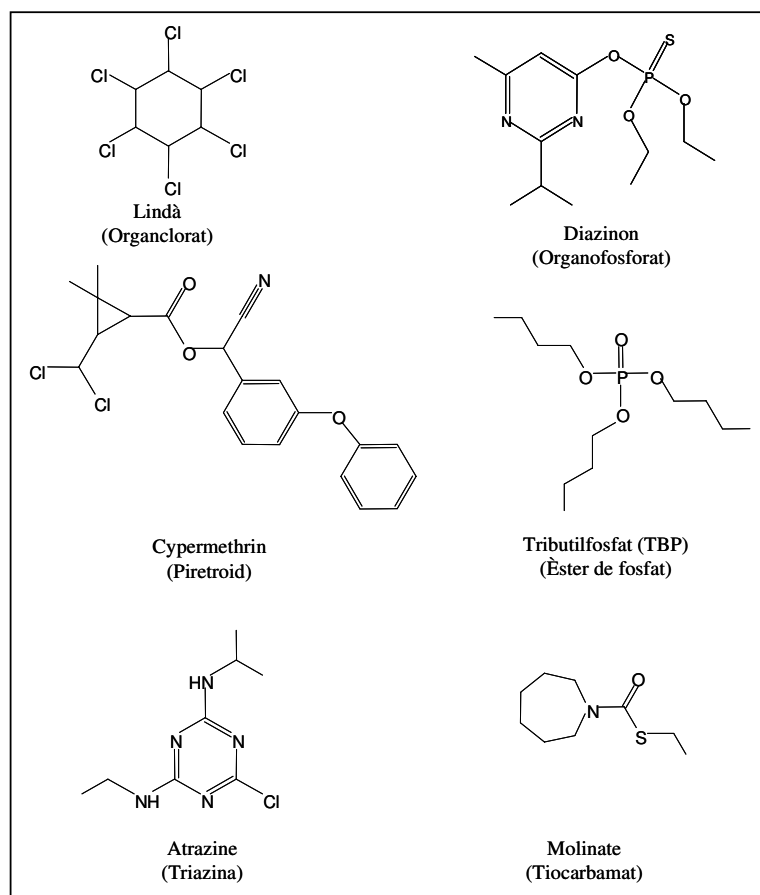
pell, disfuncions en diferents òrgans i alteracions genètiques [Rose *et al.*, 1999]. A més no tan sols els compostos inicials poden ser tòxics ja que alguns dels seus productes de degradació poden també ser problemàtics per la salut pública com per exemple el DDE i DDD productes de degradació del DDT. El contingut límit d'aquestes substàncies i d'altres contaminants orgànics i inorgànics està regulat en l'aigua de beguda per la directiva marc de la Unió Europea 98/83/EC [UE, 1998]. Existeixen també llistes de contaminants prioritaris que inclouen plaguicides o els seus productes de degradació com les *Candidate List* de la EPA [EPA, 2005].

Cada cop, alguns compostos nous, estan generant més interès per els seus efectes tant en la salut pública com en el medi ambient. Aquests compostos que es coneixen com a *contaminants emergents* [Petrisor, 2004] inclouen plaguicides, subproductes dels processos de desinfecció, organometàlics, perfluorats, bromats, hormones, disruptors endocrins, fàrmacs i productes d'higiene personal [Richardson i Ternes, 2005]. El principi de precaució ens porta a evitar la presència de substàncies d'origen antropogènic en el medi encara que la seva toxicitat no hagi estat encara demostrada sobretot si es troben presents en l'aigua de beguda.

Existeixen múltiples metodologies analítiques per a la determinació d'aquests compostos. Si ens centrem en les matrius ambientals és important tenir present algunes de les característiques d'aquestes determinacions. Si exclouem els llocs on ha existit una font de contaminació directe, les mostres ambientals es caracteritzen per contenir un còctel de contaminants a nivells traces (interval de concentracions ppt-ppb) al mig d'una matriu complexa majoritària. Així doncs, el concepte és completament oposat al de l'anàlisi lípida, on el que s'analitzava eren els constituents majoritaris de la pròpia matriu. Aquest fet dificulta la determinació dels anàlits i obliga a metodologies més laborioses que generalment estan formades de tres etapes: extracció, purificació i determinació. La complexitat i el número de passos de que consta cada etapa serà funció dels compostos a determinar, de la seva concentració i de les interferències associades a la matriu. L'extracció i la purificació de la mostra que corresponen a la preparació de mostra són les etapes que necessiten de més temps i més feina en la totalitat del procés analític [Santos i Galceran, 2002] fent més difícil l'automatització dels processos analítics. A fi de contrarestar aquesta complexitat s'utilitzen tècniques cromatogràfiques com la GC amb la màxima resolució possible i detectors o bé selectius (NPD, ECD) o bé que aporten un complement d'informació addicional (MS). Cal destacar el recent

increment de les tècniques basades en una detecció per MS-MS utilitzant de manera preferencial la tecnologia de la trampa iònica.

En aquest treball, s'han estudiat membres de diferents famílies químiques de contaminants orgànics, la majoria utilitzats com a agents fitosanitaris com ara compostos triazínics, piretroides, organofosforats o tiocarbamats i alguns compostos organoclorats persistents. També s'han estudiat diferents èsters de fosfat que són utilitzats com a retardants de flama i plastificants [Marklund *et al.*, 2005]. A la Figura 5 es mostren les estructures químiques d'alguns dels compostos analitzats. Cal destacar que analitzant simultàniament diferents famílies químiques es fa més difícil de realitzar un pretractament adequat a les mostres ja que l'interval de propietats fisicoquímiques dels anàlits (per exemple interval de polaritats) serà més ampli podent-se juxtaposar a les propietats fisicoquímiques de la pròpia matriu de les mostres. En el nostre cas, s'ha treballat en diferents matrius com la lanolina i mostres d'aigua de l'estuari del riu Ebre.



**Figura 5.** Estructura química representativa d'alguns dels contaminants analitzats en aquest treball.

## **2 Objectius de la Tesi Doctoral**

- Desenvolupar metodologies analítiques monodimensionals i multidimensionals per a la caracterització de mostres lipídiques complexes utilitzant la lanolina com a matriu de referència.
- Aplicar metodologies desenvolupades per a caracteritzar traçadors moleculars lipídics a l'estuari del riu Ebre. Estudi del seu comportament temporal i de la influència de la falca salina.
- Desenvolupar metodologies analítiques monodimensionals per a la determinació de contaminants orgànics en matrius ambientals i lipídiques complexes.
- Modelització del comportament de contaminants orgànics en un estuari de règim de falca salina.
- Determinació dels contaminants orgànics en l'estuari del riu Ebre. Tendència temporal, influència de la falca salina i càlcul de l'aportació al Mar Mediterrani.