

CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Se puede clasificar a las técnicas cromatográficas según el estado físico de la denominada fase móvil. Si la fase móvil es un líquido, la técnica se denomina **cromatografía líquida**. La misma se subdivide en dos tipos:

- Tipo 1: *Cromatografía en columna*: es lo que se denomina HPLC en inglés.
- Tipo 2: *Cromatografía planar*: está representada principalmente por la C en capa fina. Sus siglas en inglés TLC.

Cuando la fase móvil es un gas la técnica se denomina cromatografía gaseosa tanto en la CL como en la gaseosa hay dos fases en el sistema, la fase estacionaria que es la que efectivamente produce la separación y una fase móvil que es la que arrastra a los componentes del extracto para que tomen contacto con la fase fija o estacionaria y se produzca la separación.

De forma general para que una sustancia pueda ser extractada, movilizada por un flujo de gases (fase móvil) debe poder disolverse en dicho gas. Entonces la CG es aplicable a extractos cuyos principios activos sean volátiles, más específicamente estos componentes no tendrán un punto de ebullición superior a los 300°C y además deben ser térmicamente estables.

Gases posibles: helio (para CG y EM), nitrógeno, hidrógeno. El tipo de gas depende de cuál es el detector que se use para identificar a los principios separados por el cromatógrafo.

El helio es la fase móvil y también recibe el nombre de gas portador o gas carrier.

ACÁ VA DIBUJO DEL CROMATÓGRAFO

El bloque de inyección tiene en su parte superior un septum de material inerte químicamente y térmicamente estable. Por debajo de él se ubica el inserto o liner que es de vidrio o de sílice. Un extremo de la columna cromatográfica se inserta en el liner por su parte inferior. El gas carrier permanentemente fluye a través de la columna cromatográfica. El otro extremo de la columna a través de una interfase calefaccionada se acopla al detector. Finalmente, unido al detector va un dispositivo de registro y de procesamiento de datos. La CC se encuentra alojada en un horno de temperatura programable, su disposición dentro del horno es en forma de hélice con las espiras en íntimo contacto. El BI está calefaccionado para permitir la vaporización de la muestra una vez inyectada en la columna.

Columna cromatográfica

La columna se ubica en un horno con programación de temperatura. La velocidad de la migración de cada componente y en consecuencia el tiempo de retención de ese componente dentro de la columna depende de su distribución entre la fase móvil y la estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferencial afinidad por la estructura de la fase estacionaria, esto permite que se separen los diferentes componentes del estrato y aquellos más fuertemente retenidos en la fase estacionaria serán los últimos en alcanzar el detector, lo que tengan la menor interacción con la fase estacionaria eluirán rápidamente de la columna al detector.

Un factor clave es la presión de vapor (volatilidad) de los compuestos a separar. En general, a mayor presión de vapor menor tiempo de retención en la columna.

Existen 3 técnicas básicas para la **inyección de muestra**:

1) *Modo split*: toda la muestra inyectada ingresa a la columna. Se utiliza como recurso cuando los componentes del extracto están en muy baja concentración. Por el contrario, si la concentración de los compuestos de la muestra es muy elevada por este modo de inyección se puede llegar a saturar la columna.

2) *Modo Splitless*: solo una fracción de volumen de la muestra ingresa en la columna. También se denomina modo de inyección con división. El volumen de muestra que no ingresa a la columna se descarta, este modo es útil con muestras muy concentradas, en ambos casos la muestra es un extracto en estado líquido.

3) *Modo on column*: se inyecta directamente en la columna una masa de vapor obtenida de la fase de vapor sobrenadante procedente de un ensayo Head Space, técnica de aislamiento que hace referencia a la fase de vapor sobrenadante obtenida en un vial herméticamente sellado y sometido a una incubación en estufa a temperatura y tiempo prefijado. Ejemplo: se ingresa al vial (frasco ampolla de vidrio) material sólido o muestra líquida (ej. líquido con sospecha de ser un combustible), se tapa el frasco con un tapón teflonado y se sella el conjunto con un sello de aluminio, se incuba a una determinada temperatura y por un determinado tiempo y en ese proceso los compuestos más volátiles de la muestra pasan a la fase vapor en contacto con ella, es decir, por efecto del calentamiento la atmósfera del vial sellado se va enriqueciendo en los compuestos más volátiles que integran esa muestra. Con jeringa se extrae una fracción de ese vapor y se inyecta en el cromatógrafo.

Las columnas actualmente en uso en cromatografía gaseosa se denominan **columnas capilares** con un diámetro interno que varía entre 250 y 320 micrones. Estos tubos capilares tienen la cara interna de la pared recubierta de una fina capa (película) líquida que es la fase estacionaria.

Las paredes de las columnas capilares se fabrican de sílice fundido. La resistencia de los tubos se refuerza con un recubrimiento externo de material orgánico. Las columnas resultan relativamente flexibles y admiten ser enrolladas en forma espiralada.

Características de la fase estacionaria

La fase estacionaria tiene el papel fundamental en la separación de los solventes del extracto inyectado, ya que la fase móvil es cromatográficamente, inerte. Las preparaciones se deben exclusivamente a interacciones entre la estructura de los solutos y la estructura de FE.

Las **propiedades** que debe cumplir la FE son:

1. Tener un rango de temperatura útil lo más amplio posible, idealmente sería un rango entre -50°C y 400°C.
2. Debe tener una presión de vapor lo más baja posible, es decir, el punto de ebullición debe ser al menos 100°C mayor que la temperatura máxima de trabajo del horno.
3. Debe ser químicamente inerte.
4. Debe ser lo más selectiva posible para el tipo de soluto con los que va a interactuar.

A nivel molecular la retención de un soluto por parte de la fase estacionaria puede deberse a varios tipos de **interacciones intermoleculares** también denominadas enlaces secundarios:

a) *Fuerzas de dispersión o de Van der Waals*: este tipo de fuerzas se deben a los campos eléctricos producidos por dipolos instantáneos debido al movimiento de nubes electrónicas en torno a los núcleos atómicos. Estas fuerzas de dispersión son las que actúan en fases estacionarias no polares o poco polares y solutos no polares o poco polares.

b) *Fuerzas de orientación o fuerzas de Keeson*: son debidas a interacciones entre dipolos permanentes (cloro-metano), dipolos que deberán existir tanto en las moléculas de soluto como en las moléculas de la FE.

c) *Enlaces de Hidrógeno*: son debidas a las interacciones físicas en la que se producen una transferencia no completa de electrones de un átomo donante (H) a uno aceptor (átomos más electronegativos: O, N, etc.).

El límite superior de temperatura de trabajo de una FE cualquiera es la temperatura más elevada a la que puede mantenerse sin que se produzcan pérdidas por volatilización de dicha fase (sangrado de columna). En la actualidad se produce la unión química entre la FE y el material del soporte de la columna, esto permite minimizar el sangrado de columna.

Parámetros de inyección

- Temperatura del inyector: debe ser suficientemente elevada para que la muestra se vaporice de forma inmediata sin alteración de la estructura química de los solventes. Por regla general la temperatura del inyector será de unos 50°C mayor que la T de ebullición del compuesto menos volátil.

- Volumen a inyectar: para columnas capilares y para un extracto líquido se inyecta en promedio un microlíquido de muestra.

- La inyección se practica con una jeringa Hamilton (microjeringa) que tiene el cuerpo de vidrio pírex (boro-silicato) y la aguja es de acero inoxidable.

- La mayoría de las fases estacionarias derivan de polímeros polisiloxanos.

- Orden de elución (orden de salida de los solutos de la columna al detector): para fases estacionarias de cualquier naturaleza (no polar, medianamente polar) una serie homologa eluye según un orden creciente de átomos de C.

Rampa de T del horno

DIBUJO DE LA CURVA

Se mantiene condiciones de isoterma a 100°C durante 5'. A partir de los 5' primera rampa de ascenso de T de 40°C por minuto, hasta llegar a 300°C. Isoterma de 300°C durante 5 minutos y segunda rampa de T con ascenso de 10°C por minuto hasta llegar a 350°C. Isoterma final de 350°C durante 10 minutos.

La mayoría de los ensayos en Cromatografía gaseosa (toxicología) se hacen programando rampas de T del horno de forma tal de asegurar elución secuencial en el tiempo, de distintos solutos del extracto.

En una FE polar se retienen más los solutos polares que los no polares por lo cual eluyen en primer término estos últimos.

Si la fase es no polar, los solutos no polares eluyen en orden creciente de puntos de ebullición.

MICRODIFUSIÓN

Tóxico gaseoso: presenta ese estado físico en condiciones normales de presión y temperatura.

Tóxico volátil: en CNPT se encuentra en estado líquido pero tiene alta presión de vapor y bajo punto de ebullición, por lo cual tiene alta tendencia a pasar a fase vapor.

La **microdifusión** es una técnica a microescala que se lleva a cabo en la denominada cámara o celda de Conway. Este dispositivo es una placa de vidrio circular de menor altura que la pared externa de la cámara y se completa con una tapa circular que permite lograr estanquidad.

Fundamentos de la microdifusión

En el compartimiento interno se deposita una solución que actuará como agente fijador o secuestrante del principio activo volátil. La formulación química de esta solución varía en función de la naturaleza del principio volátil. En el compartimiento interno se deposita un volumen preestablecido de muestra (generalmente sangre) que se le adiciona solución saturada de un agente liberante (facilita la volatilización del tóxico), en general se utiliza como agente liberante una solución saturada de carbonato de potasio o carbonato de sodio.

Para ingresar la muestra de sangre y el agente liberante al compartimiento externo se retira parcialmente la tapa circular que ya había sido fijado a la cámara con un sellador (parafina y parafina mezclada con vaselina sólida). Una vez cargada la cámara con la muestra y la solución de carbonato, se vuelve a sellar la cámara con la tapa.

Se lleva a incubación durante un período de tiempo y una temperatura prefijada y **resulta crítico** respetar estos parámetros. La incubación se lleva a cabo generalmente en una estufa de esterilización, normalmente se incorpora un termómetro con escala de 0 a 100° mínimo, que permite controlar visualmente si la temperatura del equipo es la indicada. Terminada la incubación, se retira la cámara y mediante pipeta de vidrio, micropipeta graduada o pipeta Pasteur se retira la totalidad de la solución del compartimiento interno en la cual se evaluará la presencia o no de un tóxico volátil y de ser necesario se cuantificará.

Material de la cámara: vidrio boro silicato, resiste alta temperatura y oxidación.

Los tóxicos volátiles más comúnmente investigados utilizan como técnica de aislamiento la microdifusión, la cual sirve también para tóxicos gaseosos, ejemplos: monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno (volátiles) y etanol (gaseoso).

Para el caso del monóxido de carbono que se investiga en muestras de sangre que tienen un porcentaje importante de hemoglobina unida a este tóxico, la solución fijadora es una solución de cloruro de paladio (PdCl_2). Para el caso del cianuro de hidrógeno la solución fijadora es una solución acuosa de hidróxido de sodio. Durante el proceso de incubación, el eventual principio volátil que contenía la muestra se libera de la misma gradualmente, facilitando el proceso, por la interacción física del carbonato de potasio o sodio con los componentes de la sangre, este tóxico liberado va enriqueciendo progresivamente la atmósfera gaseosa contenida en la cámara y toma contacto con la solución fijadora que lo va extrayendo de esa fase gaseosa transformándola en una especie no volátil. Este proceso continúa hasta que la totalidad del tóxico abandona la muestra original.