

## METODOS CROMATOGRÁFICOS.

La *cromatografía* es una técnica analítica de separación mediante la cual se consiguen separar los componentes de una mezcla compleja en función de su afinidad relativa entre una fase móvil y una fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz), puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida en una película, etc. Cuando la fase móvil es un gas se habla de ***cromatografía de gases***, mientras que si es un líquido o un fluido supercrítico se habla de ***cromatografía de líquidos***.

En general un cromatógrafo constará de un sistema de introducción de muestra, una columna cromatográfica, que puede estar dentro de un horno, y un sistema de detección a la salida de la columna.

Como consecuencia de la diferente movilidad de los componentes en función de su diferente afinidad por las fases, éstos se separan en bandas o zonas discretas que van eluyendo de la columna cromatográfica a distinto tiempo, de modo que pueden ser recogidos o detectados de forma separada por el detector, el cual mide la variación de alguna propiedad física de la fase móvil, originada por la elución de los solutos.

La representación gráfica de la respuesta del detector hacia el soluto en función del tiempo de elución de dicho soluto constituye el cromatograma. El cromatograma consiste en una serie de picos cuya posición en el eje del tiempo (tiempo de retención) puede servir para identificar los componentes de la muestra en unas condiciones dadas. Por otro lado, el área bajo cada pico proporciona una medida cuantitativa de la cantidad del soluto en la muestra.

La ***cromatografía de gases*** es de las técnicas cromatográficas más utilizadas y se caracteriza porque la muestra es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica. Los componentes de la muestra son arrastrados por el flujo de un gas inerte (fase móvil), se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria y eluyen a diferente velocidad en función de su diferente afinidad por la fase estacionaria, que generalmente es un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte o en las paredes interiores de la columna, si ésta es capilar, si bien también puede ser un sólido, en cuyo caso el mecanismo de retención es la adsorción, lo cual conduce a picos cromatográficos con colas por lo que esta técnica tiene poca aplicación.

Las partes esenciales de un cromatógrafo de gases son:

Gas portador: es un gas inerte, generalmente helio, nitrógeno o argón de elevado grado de pureza cuyo caudal debe ser conocido y controlado. El modo de trabajo puede ser tanto a presión constante como flujo constante.

Sistema de inyección de muestras: en el portal de inyección la muestra debe ser vaporizada de modo que tendrá una temperatura superior al punto de ebullición del componente de la muestra menos volátil. La inyección puede ser tanto manual como automatizada. El volumen de muestra inyectado varía, generalmente entre 0.2 y 5 mL. Los modos de inyección más utilizados son con división de flujo (sólo parte de la muestra inyectada pasa a la columna) o sin división de flujo (toda la cantidad de muestra inyectada pasa a la columna)

Columna: generalmente son columnas capilares en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar. La naturaleza de la fase estacionaria dependerá de los compuestos a separar y generalmente se encuentra dentro de un horno, donde es sometida a temperatura (isotermo o gradiente de temperaturas). La temperatura será función de los puntos de ebullición de los componentes de la muestra.

Los compuestos son retenidos en la columna en mayor o menor grado en función de su afinidad por la fase estacionaria, de modo que el tiempo que tardan en atravesarla es diferente y será característico para un determinado compuesto en unas condiciones dadas (flujo de gas portador, temperatura del inyector, programa de temperaturas



del horno, tipo de fase estacionaria o tipo de fase móvil.

Detector: debe ser capaz de medir e identificar la señal producida por los diferentes compuestos que eluyen de la columna. Se basa en la medida de la variación de alguna propiedad física del gas portador originada por la elución de los compuestos. La temperatura del detector debe ser mayor o al menos igual que la de la columna para evitar la condensación de los compuestos eluidos. La señal detectada es almacenada en un sistema informático con un programa de tratamiento

de datos adecuado. Existe un gran número de detectores que pueden ser acoplados a un cromatógrafo de gases, si bien los más comunes son el detector nitrógeno-fósforo de ionización de llama (NPD-FID) o el espectrómetro de masas (MS). El detector (NPD-FID) básicamente es un quemador de hidrógeno/oxígeno donde los analitos y el gas portador procedentes de la columna se mezclan con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura, esto genera la ionización de los compuestos orgánicos de nitrógeno y fósforo que da lugar a una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrómetro situado por encima de la llama. La corriente de salida, proporcional al número de iones recolectados, es medida por un electrómetro convertida a forma digital y enviada a un dispositivo de salida.

*Limitaciones de la cromatografía de gases:*

- La necesidad volatilizar la muestra condiciona el campo de aplicación óptimo de esta técnica. Las moléculas pesadas no pueden ser volatilizadas. Sustancias apolares serán más fáciles de volatilizar (no forman puentes de hidrógeno que aumentan sus puntos de ebullición). La derivatización ayuda a que los analitos pueden ser más volátiles pero no siempre se obtienen compuestos derivados que sean estables. En algunos casos además se da lugar a varias formas tautómeras que se encuentran en equilibrio, de modo que disminuye la sensibilidad de forma considerable.
- Las moléculas termolábiles no pueden ser analizadas porque se degradan en el portal de inyección al vaporizar la muestra.

La **cromatografía de líquidos** se caracteriza porque los componentes de una mezcla son separados al desplazarse con una fase móvil (líquido) a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija en una columna o soporte. Los componentes de la mezcla se distribuyen de modo distinto entre las fases móvil y estacionaria de modo que su velocidad de migración es inversamente proporcional a la retención. Generalmente la fase estacionaria es un líquido retenido en un sólido inerte. Los soportes se preparan generalmente con sílice rígida o albúmina, aunque en el mercado actual cada vez son más abundantes las fases con base polimérica o híbrido polímero-sílice, que permiten trabajar a mayor rango de pH. Los recubrimientos de la fase enlazada más utilizados se obtienen por reacción con un organoclorosiloxano con un radical alquilo. La longitud de este radical confiere diferente polaridad a la fase y en función de dicha polaridad se distinguen dos tipos de mecanismos de separación:

*Cromatografía en fase normal:* donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no-polar a la que se le añade un modificador polar (un

disolvente miscible) para controlar la fortaleza y selectividad del disolvente.

*Cromatografía en fase reversa:* es la más utilizada. La fase estacionaria tiene carácter apolar. La fase móvil es una disolución relativamente polar con respecto a la fase estacionaria. Está formada por mezcla de disolventes polares (fase orgánica) como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano, y agua (fase acuosa). La fase acuosa puede ser simplemente agua o contener algún tampón para ajustar el valor de pH.

Las partes esenciales de una cromatógrafo de líquidos son:

*Sistema de bombeo de disolventes:* Son bombas capaces de soportar presiones por encima de 350bares y de bombear el disolvente (fase móvil) a través de la columna entre 0.01ml/min y 5ml/min. Actualmente se están desarrollando instrumentos capaces de soportar presiones superiores a 1200bares, lo que permite aplicar flujos elevados a columnas con tamaño de partículas menores de 2 $\mu$ m.

*Sistema de inyección de muestra*

*Termostatos y hornos de columna:* Se utilizan en aplicaciones donde se necesite un control estricto de la temperatura.

*Fase móvil:* Son en general disolventes que se mezclan en diferentes proporciones y que tienen el objeto de competir con las interacciones analito-fase estacionaria para permitir la migración de estos a través de la columna. En función del tipo de fase estacionaria se emplean diferentes disolventes.

*Columna:* Contiene la fase estacionaria. Se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme y de forma recta. La composición de la fase estacionaria dependerá de la naturaleza de los compuestos a separar. La longitud de la columna ha sido tradicionalmente de 100 a 300mm, si bien en acoplamiento tipo LC/MS

se suelen emplear columnas más cortas (entre 3-100mm) ya que no se requiere la separación completa de todos los componentes de la muestra, lo cual permite reducir el tiempo de análisis y el consumo de disolventes. En acoplamiento LC/MS el diámetro interno



será el menor posible (entre 1-4.6mm) ya que cuanto menor sea éste, menor será también el flujo que fluye hacia el espectrómetro de masas y que debe ser eliminado antes de entrar en él.

El tamaño de partícula que tradicionalmente se emplea en la cromatografía de líquidos es de 5-10µm, sin embargo en acoplamientos tipo LC/MS el tamaño de partícula es de 3-5µm para mantener el número de platos teóricos requerido para las separaciones estándar. Tamaño de partícula (dp) y longitud (L) de la columna vienen relacionados por la expresión:

$$N_{\max} = L / dp$$

Donde N es el número de platos teóricos.

Actualmente, junto con el desarrollo de sistemas de bombeo capaces de soportar mayores presiones, se han desarrollado también columnas con tamaño de partículas menores a 2µm, lo que permite llevar a cabo separaciones muy complicadas en menos de 2 minutos.

Detector: los más comunes son detector DAD, detectores de ultravioleta visible de longitud de onda variable o acoplamientos con espectrometría de masas (MS).

*Limitaciones de la cromatografía de líquidos:*

- Las fuentes de ionización utilizadas en LC son poco energéticas y requieren que la sustancia se encuentre ionizada en disolución (ácidos y bases) o que posea grupos susceptibles de ser ionizados (heteroátomos, dobles enlaces conjugados). Las sustancias más apolares difícilmente podrán ser analizadas mediante LC/MS.
- Es difícil obtener librerías de espectros de masas de LC porque las condiciones en que estos son obtenidos son menos reproducibles que las condiciones en que se obtienen los espectros de masas de GC/MS.

El acoplamiento de la cromatografía tanto líquida como gaseosa con la espectrometría de masas proporciona una herramienta única para la inequívoca identificación de una sustancia, si bien la elección de una u otra técnica dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a detectar.

<i>Cromatografía de gases</i>	<i>vs</i>	<i>Cromatografía de líquidos</i>
Muestra se volatiliza en el portal de inyección		Analito se encuentra disuelto en fase móvil
Analitos gaseosos migran en función de su punto de ebullición a lo largo de la columna arrastrados por la fase móvil (gas transportador)		La fase móvil esta compuesta por mezcla de disolventes con diferente polaridad (Fase Reversa → Tampón/Metanol o acetonitrilo). Analitos migran con la fase móvil a lo largo de la columna en función del coeficiente de reparto del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria (columna)
Cuando analitos llegan al espectrómetro de masas se encuentran en fase gaseosa		Cuando analitos llegan al espectrómetro de masas se encuentran en fase líquida

*Tipos de acoplamientos que se encuentran en el laboratorio de control de dopaje de la AEA*

*GC-NPD*

*GC-MS*

*GC-MS<sup>n</sup>*

*GC-HRMS*

*GC-C-IRMS*

*LC-MS<sup>n</sup> (QqQ)*

*LC-MS<sup>n</sup> (QqQtrap)*

*HPLC preparativa*