



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“HISTORIA, DESARROLLO Y PERSPECTIVA
DE LA CROMATOGRAFIA DE FLUIDOS
SUPERCRITICOS COMO METODO
ANALITICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JULIO ALFREDO SALDIVAR CALVO

ASESORA: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Historia, desarrollo y perspectiva de la cromatografía de fluidos supercríticos como método analítico".

que presenta el pasante: Julio Alfredo Saldivar Calvo
con número de cuenta: 8454070-6 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de ENERO de 2005

PRESIDENTE	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	
VOCAL	<u>Dra. Flora Adriana Ganem Rondero</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Eva Ma. Molina Trinidad</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Koizumi Castro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Ponce Anguiano</u>	

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por la vida que me ha regalado y su protección e inspiración en cada momento difícil.

A MI ASESORA: Dra. Adriana Ganem

Por su paciencia y apoyo en cada instante a lo largo de la realización del presente trabajo y sobre todo por la amistad que me ha brindado junto con su familia.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Por abrirme las puertas y darme la oportunidad de formarme como profesionista. Por su ambiente cálido que permanecerá siempre presente en mi corazón.

A TODOS MIS PROFESORES

Porque cada uno de ellos aportó cosas importantes en mi formación y que ahora valoro de manera muy especial.

Quiero expresar mi gratitud a la profesora María Eugenia Posada por quien la conclusión de esta etapa de mi vida ha sido posible.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: Héctor y Julieta

Gracias por haberme impulsado a llegar hasta este momento porque sin el apoyo que me dieron en mis años de escuela esto no sería posible.

A MIS HIJOS: Luz Melissa y Luis Alfredo

Ustedes son una inspiración y una motivación que cada día me llevan a trazarme nuevas metas y a realizar sueños que si ustedes no hubieran llegado a mi vida jamás hubiera logrado.

Gracias hijos por sus vidas y por llenar la mía de alegría. Los amo con todo mi corazón.

A MI ESPOSA: Luz Elena

Gracias por todo el sacrificio que has hecho a lo largo de este tiempo y que ha hecho posible la terminación de este trabajo.

A LA 11^{AVA} GENERACION DE QFB:

Por todos los momentos inolvidables que pasamos juntos. Los llevaré siempre conmigo

**CON CARÍÑO
JULIO.**

INDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
1. OBJETIVOS	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	1
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CROMATOGRAFÍA.....	2
4. GENERALIDADES SOBRE LA CROMATOGRAFÍA.....	3
5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	5
5.1 GENERALIDADES.....	5
5.2. INSTRUMENTACIÓN PARA LA CROMATOGRAFÍA.....	7
5.2.1. SISTEMA DE BOMBEO.....	8
5.2.2. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA.....	8
5.2.3. DETECTORES.....	9
5.2.4. COLUMNAS.....	10
5.2.5. COMPUTADORA, INTEGRADOR O GRABADORA.....	11
5.3. APLICACIONES COMUNES DE LA CLAR.....	11
6. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	12
6.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	12
6.2 TRASFONDO TEÓRICO.....	14

6.3. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	14
6.4. INTRODUCCIÓN A LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	16
7. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS COMO	
TÉCNICA ANALÍTICA	23
7.1. USOS GENERALES DE LA TÉCNICA.....	24
7.2. APLICACIONES COMUNES.....	24
7.3. CARACTERÍSTICAS.....	25
7.4. LIMITACIONES.....	25
7.5. INSTRUMENTACIÓN Y VARIABLES DE OPERACIÓN.....	26
7.5.1. HORNO.....	27
7.5.2. INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA.....	28
7.5.3. COLUMNAS.....	29
7.5.4. DETECTORES.....	30
7.5.5. RESTRICTORES.....	31
7.6. FUNCIONAMIENTO DE LA CFS.....	31
8. FACTORES QUE AFECTAN EN LA CFS.....	37
8.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	37
8.2. EFECTO DE LA CAÍDA DE PRESIÓN.....	37
8.3. EFECTO DE LA DENSIDAD TOTAL.....	38
8.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL.....	38
9. APLICACIÓN DE LA CFS.....	41
9.1. ÁREAS DE APLICACIÓN.....	42
9.2. APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN ALIMENTOS.....	42
9.3. APLICACIONES FARMACÉUTICAS.....	46

9.4. APLICACIONES AMBIENTALES.....	48
9.5. OTRAS APLICACIONES.....	49
10. COMPARACIÓN DE LA CFS CON OTRAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	53
11. RESÚMEN.....	58
12. CONCLUSIONES.....	60
12.1 CONCLUSIONES RESPECTO AL TRABAJO EN GENERAL.....	60
12.2 CONCLUSIONES RESPECTO A LA CFS COMO TÉCNICA ANALÍTICA.....	61
13. APÉNDICE.....	62
14. GLOSARIO.....	63
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Sustancias útiles como fluidos supercríticos y sus correspondientes parámetros críticos.....	19
Tabla 2. Constantes críticas y parámetros de selectividad y polaridad para modificadores orgánicos comunes.....	40
Tabla 3. Ejemplos de compuestos analizados por CFS y condiciones	51
Tabla 4. Comparación de las características de la CG, la CFS y la CL.....	57

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Equipo para CLAR	11
Figura 2. Diagrama de fase para una sustancia pura.....	17
Figura 3. Esquema de la desaparición del menisco entre un gas y un líquido en el punto crítica.....	20
Figura 4. Fotografía de un experimento real en el cual se observa la desaparición del menisco en el punto crítico.....	21
Figura 5. Diagrama de un sistema para CFS.....	26
Figura 6. Gráfica de las áreas de aplicación de la CFS.....	41
Figura 7. Gráfica de los usos de la CFS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido fosfotídico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
AGL	Ácidos grasos libres
CA	Cromatografía de afinidad
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFAR	Cromatografía en capa fina de alta resolución
CFS	Cromatografía de fluidos supercríticos
CG	Cromatografía de gases
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CIM	Cromatografía de interacción metálica
CL	Cromatografía de líquidos
CLAR	Cromatografía de líquidos de Alta resolución
EFS	Extracción con fluidos Supercríticos
EM	Espectrometría de masas
ERMN	Espectrometría de resonancia magnética nuclear
FC	Fosfatidil-colina
FE	Fosfatidil-etanolamina
FI	Fosfatidil-inositol

FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier
FID	Detector de ionización de flama
GP	Grado de polimerización
HPLC	Cromatografía de líquidos de Alta resolución
k	Factor de retención o factor de capacidad
P'	Índice de polaridad de solvente
P _C	Presión crítica
TA	Ácido trifluoroacético
T _C	Temperatura crítica
UV	Ultravioleta
X _n	Factor de selectividad solvente

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Hacer un análisis sobre el desarrollo de la CFS (cromatografía de fluidos supercríticos) y su perspectiva como método analítico alternativo, a partir de los antecedentes históricos de la técnica, con la finalidad de considerar las ventajas de la misma con respecto a otros métodos analíticos de uso común en los laboratorios.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Explicar qué es el estado supercrítico y por qué utilizarlo en la cromatografía.
2. Enumerar los fluidos supercríticos más utilizados y sus características.
3. Describir el equipo y condiciones de trabajo para la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS).
4. Comparar la CFS con otras técnicas cromatográficas.
5. Analizar algunas de las ventajas que tiene el uso de la CFS sobre otras técnicas de análisis en casos específicos.
6. Dar ejemplos de aplicaciones de la CFS en distintas áreas.

2. INTRODUCCIÓN

La cromatografía fue inventada por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1903,¹ desde entonces esta técnica ha sufrido múltiples modificaciones y en la actualidad las aplicaciones en la industria farmacéutica y en la biotecnología son amplias. Una de las modalidades de mayor desarrollo a partir de los 70's ha sido la cromatografía de líquidos de alta resolución

(CLAR), que ha permitido implementar un gran número de opciones como técnica de análisis instrumental.

Este mismo desarrollo llevó al surgimiento de una nueva variante a mediados de los 80's : la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), técnica que es en realidad una versión híbrida entre la CLAR y la cromatografía de gases (CG).

El concepto de fluido supercrítico, sin embargo, no era nuevo, ya que en 1879, Hanna y Hogarth² describieron la solubilidad de cobalto y cloruro de hierro en etanol supercrítico. Más tarde Lovelock³ en 1958 sugirió por primera vez el uso de fluidos supercríticos como una fase móvil en cromatografía y en 1962 Klesper y col.⁴ publicaron el primer artículo sobre CFS. Desde entonces el interés por esta técnica tuvo muchos altibajos, siendo las causas principales el desarrollo de la CLAR y los problemas técnicos que tuvieron que ser superados en un inicio por la falta de un equipo adecuado.

En este documento se analizan los fundamentos de esta técnica y su proyección de uso en diversas áreas, así como también la exposición de ejemplos concretos en los cuales es evidente el auge que esta técnica está teniendo en la última década.

3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CROMATOGRAFÍA

Como fue mencionado en la introducción, el invento de la cromatografía se atribuye al botánico ruso Mikhail Tswett. Éste utilizó la técnica para separar los pigmentos de varias plantas, tales como la clorofila y la xantofila, haciendo pasar soluciones de éstas a través de columnas empaquetadas de vidrio que contenían carbonato de calcio muy fino. La separación aparecía como bandas de colores en la columna, lo cual le sugirió el nombre que utilizaría para el método.

La palabra cromatografía es difícil de definir rigurosamente porque el término se ha aplicado a una gran variedad de sistemas y técnicas. Todos estos métodos, sin embargo, tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil, algunos de estos métodos son⁵:

- Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)
- Cromatografía de gases (CG)
- Cromatografía en capa fina (CCF)
- Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR)
- Cromatografía de intercambio iónico (CII)
- Cromatografía de afinidad (CA)
- Cromatografía de interacción metálica (CIM)

4. GENERALIDADES SOBRE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación de especies químicas en el que éstas se distribuyen en forma molecular entre dos fases no miscibles.

La cromatografía es una técnica que se utiliza para la separación, identificación y cuantificación de compuestos. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible e inerte de composición fija, dispuesta en una columna cilíndrica, en una placa o en una tira. Ambas fases se eligen de tal manera que los componentes de la muestra se distribuyan de forma distinta entre la fase estacionaria y la fase móvil. Las moléculas de soluto que se retengan preferentemente en la fase estacionaria, estarán una fracción de tiempo más pequeña en la fase móvil y no serán transportadas a lo largo de la columna, placa o tira; por el contrario

los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Este proceso trae como consecuencia que los componentes de la muestra se separen en bandas definidas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

La importancia del proceso cromatográfico es la distribución en el equilibrio de los diversos componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. La relación entre las concentraciones de una sustancia en ambas fases, determinado en condiciones de equilibrio, se llama coeficiente de distribución o reparto (k).

$$k = \frac{C_S}{C_M}$$

Donde C_S es la concentración molar del analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar en la fase móvil. La importancia de este coeficiente en la cromatografía radica en que se puede determinar la facilidad de una separación y la velocidad a la que se mueve una banda en la columna, placa o tira. La selectividad de un sistema de cromatografía depende de las interacciones de los componentes de la muestra con las dos fases. Estas interacciones pueden ser:

- 1) Ion-ion: descritas por la Ley de Coulomb, la cual dice que la interacción entre dos iones es función directa de sus cargas e inversa al cuadrado de las distancias entre ellos.
- 2) Ion-dipolo: esta interacción se presenta entre iones y moléculas que poseen un momento dipolar, permanente o inducido. Los dipolos surgen, respectivamente, de la distribución no uniforme de electrones en los enlaces covalentes entre átomos que difieren bastante en su electronegatividad y de la polarización por los iones de moléculas con electrones de valencia de una movilidad relativamente alta. La interacción dipolo-dipolo ocurre, en la mayoría de los casos, por alineación de los mismos y disposición adyacente de las

cargas de distinto signo de cada dipolo. El ejemplo más común de este tipo de interacción es el enlace por puente hidrógeno.

- 3) Interacciones de tipo no polar: surgen de la interacción entre los dipolos instantáneos producidos por el desplazamiento relativo de electrones y núcleos; dichas fuerzas aumentan con el grado de similitud de las moléculas, con la facilidad de pérdida de electrones y con el número de éstos.

Por lo tanto, los adsorbentes polares tenderán a adsorber compuestos polares. El orden en el que las especies químicas son preferentemente adsorbidas depende de la naturaleza química del adsorbente y del disolvente, además de la concentración en la solución de las sustancias a separar.

5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

5.1. GENERALIDADES

La cromatografía de líquidos es importante porque la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles para que se les pueda aplicar la cromatografía de gases. La CLAR utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. El sistema CLAR consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y una computadora para controlar el sistema y visualizar los resultados. Actualmente muchos sistemas incluyen además un horno para controlar la temperatura de la columna.

En la CLAR, por lo general, no es factible usar columnas tubulares abiertas, porque el diámetro de la vena líquida del disolvente es demasiado grande para que lo atraviese una molécula de soluto en poco tiempo. La cromatografía de líquidos se hace con columnas

empaquetadas, la eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas en CLAR es de 3 a 10 micrómetros. Calentando una columna cromatográfica, de ordinario, disminuye la viscosidad del disolvente, reduciéndose así la presión requerida o permitiendo un mayor caudal. Al aumentar la temperatura se acortan los tiempos de retención y aumenta la velocidad de difusión de los solutos. Sin embargo, aumentando la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y reducir la vida de la columna. Si no se controla, la temperatura de la columna fluctúa con la temperatura ambiente. Usando un horno a una temperatura a unos pocos grados por encima de la temperatura ambiente se mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención y la precisión del análisis cuantitativo. El soporte más común en la CLAR son partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente y que tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por gramo. La sílice se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que no puede utilizarse por encima de ese pH. Algunas calidades de sílice son estables hasta pH 9-10. Para cromatografiar compuestos básicos a pH entre 8 y 12, se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno. La superficie de la sílice tiene hasta 8 micromoles de grupos silanol (Si-OH) por metro cuadrado. Todos los grupos silanol están prácticamente protonados si el pH está entre 2 y 3, se disocian formando iones Si-O en un amplio intervalo de pH por encima de 3; los grupos Si-O superficiales retienen con fuerza las bases protonadas y originan colas. La sílice pura se puede utilizar como fase estacionaria en cromatografía de adsorción. Más frecuente es la cromatografía de reparto líquido-líquido, que se lleva a cabo con fase estacionaria enlazada covalentemente a la sílice. Estas fases enlazadas se encuentran disponibles en un amplio intervalo de polaridades, dependiendo del grupo funcional presente, algunos ejemplos son las ciano, fenil, C- 8 y C- 18, esta última de

características no polares, es sin duda una de las más empleadas para la separación de una gran diversidad de compuestos.

5.2. INSTRUMENTACIÓN PARA LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Con objeto de alcanzar un caudal eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 3 y 10 micrómetros, que por otra parte, son comunes de la cromatografía moderna de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la CLAR tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.

Un aparato moderno de CLAR esta equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos (en general oxígeno y nitrógeno) que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o, sistemas de purga que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna. No es necesario que los desgasificadores y los filtros sean partes integrantes de los sistemas de CLAR. Por ejemplo, una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en

filtrarlos a vacío a través de un filtro (millipore) de tamaño de poro muy pequeño. Este tratamiento elimina los gases, así como la materia en suspensión. Una separación que utiliza un sólo disolvente de composición constante se denomina una elución isocrática. Con frecuencia, la eficacia de la separación se aumenta notablemente por una elución con gradiente. En este caso se utilizan dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Los instrumentos en la CLAR moderna a menudo están equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.

5.2.1. SISTEMA DE BOMBEO

Los requisitos para un sistema de bombeo en CLAR son rigurosos e incluyen la generación de presiones por encima de 6000 psi, un flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0.1 a 10 ml/min., el control y la reproducibilidad del caudal y componentes resistentes a la corrosión. Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamientos y bombas neumáticas o de presión constante.

5.2.2. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA

A menudo, el factor límite en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se acentúa por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas.

Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500 microlitros. Además, se ha de poder introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

El medio más simple y antiguo para la introducción de las muestras implicaba la inyección con una jeringa a través de un elastómero (septum) que cierra herméticamente. Con esta finalidad se utilizaron microjeringas capaces de resistir presiones de hasta 1500 psi. En las inyecciones a flujo detenido, el flujo del disolvente se detiene momentáneamente, se retira el conector de la cabeza de la columna, después se retira el accesorio y el sistema se vuelve a presurizar. La ventaja de esta técnica es su sencillez. Desafortunadamente, la reproducibilidad de la inyección con jeringa rara vez es mejor de un 2 o un 3% y con frecuencia es peor. En cromatografía de líquidos el método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 hasta 500 microlitros de muestra. Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una presión relativa de unas décimas por ciento. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con bucles con volúmenes de 0.5 a 5 μL .

5.2.3. DETECTORES

Un componente muy importante en CLAR es el detector. Cualquier molécula que es separada por cromatografía debe ser analizada cualitativa y/o cuantitativamente para generar resultados manipulables. La función de un detector es producir una señal eléctrica proporcional a la concentración de la muestra; ésta es entonces conducida hacia un instrumento de almacenaje y visualización. Además de producir una respuesta que sea

lineal a la concentración, el detector ideal no debe contribuir al ensachamiento de la banda ni debe ser afectado por la temperatura. Un detector ideal debe producir ninguna o casi ninguna señal para los eluyentes de uso común, tales como sales buffer, modificadores orgánicos, detergentes o agentes caotrópicos, sin embargo, debe responder a todos los analitos a través de todo el intervalo de concentración encontrado en muestras típicas. En aplicaciones preparativas, el detector debe ser no destructivo, permitiendo la recuperación de la muestra. Desafortunadamente, ningún sistema de detección muestra todas estas propiedades ideales; por lo tanto, el mejor modo de detección debe ser escogido en términos de selectividad y sensibilidad a la fase móvil y a las limitaciones cromatográficas.

Algunos de los detectores más comunes para CLAR son²:

1. Ultravioleta/visible
2. Índice refractivo
3. Fluorescencia
4. Electroquímico
5. Radioactividad
6. Dispersión de luz
7. Espectrometría de masa

5.2.4. COLUMNAS

Se dice que la columna es el corazón de la CLAR debido a que la separación ocurre ahí. Generalmente está hecha de un metal inoxidable de grado 316 que es relativamente inerte a la corrosión química y es empaquetada con la fase estacionaria deseada. Las dimensiones comunes para las columnas de escala analítica están en el intervalo de 10 a 25 cm de longitud y 3 a 9 mm de diámetro interno.

5.2.5. COMPUTADORA, INTEGRADOR O GRABADORA

Se conecta al detector un aparato de colección de datos tal como una computadora, un integrador o una grabadora. Toma las señales electrónicas producidas por el detector y las trazas en forma de cromatograma, el cual puede ser evaluado por el usuario. Las grabadoras son rara vez utilizadas en la actualidad por no poder integrar los datos. Tanto los integradores como las computadoras pueden integrar los picos en los cromatogramas y las computadoras tienen además la ventaja de guardar electrónicamente los cromatogramas para su posterior evaluación.

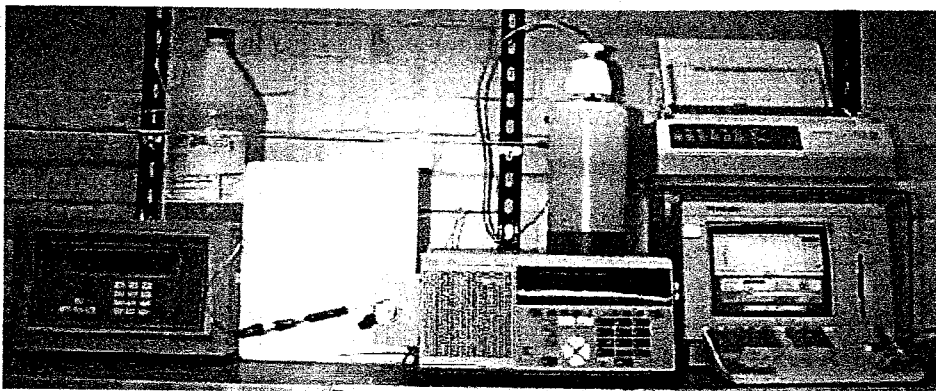


FIG.1 Equipo para CLAR

5.3. APLICACIONES COMUNES DE LA CLAR

- Medición de los niveles de ciertos compuestos tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas en muestras fisiológicas.

- Medición de los niveles de fármacos, subproductos sintéticos, o productos de degradación en formas farmacéuticas.
- Medición de compuestos que pueden ser tóxicos tales como pesticidas o insecticidas
- Monitoreo de muestras ambientales
- Purificación de compuestos a partir de mezclas
- Separación de polímeros y determinación de la distribución del peso molecular de los polímeros en una mezcla.
- Control de calidad
- Seguimiento de reacciones sintéticas

6. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (CFS)

6.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1822, Cagniard de Tour⁶ describió por primera vez el estado crítico; en 1869 Andrew⁴ publicó el primer artículo sobre el punto crítico gas-líquido. En 1879, Hannay y Hogarth^{7,8} describieron la solubilidad del cobalto y el cloruro de hierro en etanol supercrítico². Lovelock (1958) sugirió por primera vez el uso de fluidos supercríticos como una fase móvil en cromatografía³ y en 1962 Klesper y col.⁴ publicaron el primer artículo sobre cromatografía de fluidos supercríticos. En este artículo describieron la separación de porfirinas de níquel utilizando clorofluorometanos supercríticos como fase móvil. Este trabajo fue hecho antes de que la CLAR fuera introducida por Piel en 1966. En los años siguientes, Sie, Rijners⁹ y Giddings¹⁰, a través de sus estudios teóricos y prácticos, hicieron contribuciones significativas para la comprensión del proceso de separación con fluidos supercríticos. Sie y Rijners en los laboratorios Shell en Amsterdam fueron los primeros en

utilizar el término cromatografía de fluidos supercríticos en 1967. En los 70's la CFS declinó en popularidad, debido al rápido desarrollo de la CLAR y porque en esos días, el trabajo con fluidos supercríticos no era tan sencillo debido a diversos problemas técnicos. A pesar de todo, el desarrollo de la CFS continuó. En 1969-70, Jentoft y Gouw¹¹ fueron los primeros en trabajar con presión programada y en utilizar modificadores para incrementar la fuerza de elución de la fase móvil. Schneider y col.¹² investigaron los aspectos fisicoquímicos de los fluidos supercríticos y así contribuyeron en la comprensión de la técnica. La introducción de columnas capilares en la CFS por Lee y Novotny¹³ en 1981 llevó a un reavivamiento de esta técnica, lo cual fue seguido por una serie de artículos sobre nuevas aplicaciones. Al mismo tiempo (1981) el primer instrumento comercial de columna empacitada para CFS llegó al mercado. Cuatro años más tarde, en 1985, el primer instrumento de columna capilar para CFS estaba disponible comercialmente. Desde inicios de los 80's, la columna capilar y empacitada se hizo cada vez más popular, como lo demuestra la creciente publicación de artículos y libros y las reuniones internacionales dedicadas exclusivamente a la CFS y EFS (extracción con fluidos supercríticos). La razón de esta creciente popularidad es el significativo progreso en el mejoramiento de la instrumentación, lo cual extendió sus aplicaciones a muchos problemas tales como el análisis cuantitativo del medio ambiente. Otra razón es porque los químicos modernos han comenzado a darse cuenta de que las diferentes técnicas analíticas de separación (CLAR, CG, CCF, CFS, etc.) no deberían competir unas contra otras. Cada técnica tiene sus ventajas y la técnica que se prefiera debe ser decidido dependiendo de cada caso particular.

6.2. TRASFONDO TEÓRICO

Si un gas es comprimido por encima de su presión crítica y a temperaturas que excedan la temperatura crítica, entonces no estará presente ni un gas ni un líquido, pero sí un fluido supercrítico, que combina propiedades de ambos¹⁴. La densidad es muy similar a la del líquido. Por otro lado la viscosidad es comparable a la de un gas y el coeficiente de difusión es alrededor de 10 veces más elevado que el del líquido¹⁵. Así, en CFS (especialmente en columna empaquetada) los análisis pueden realizarse a velocidades de flujo más elevadas que en la CLAR sin pérdida de eficiencia, lo que resulta en un tiempo de análisis significativamente más corto¹⁶. Debido a la baja viscosidad de los fluidos supercríticos, muchas columnas empaquetadas pueden ser combinadas en serie, aun con pequeñas partículas, sin generar alta presión. Si muchas columnas empaquetadas con la misma fase estacionaria son conectadas en serie, la eficiencia de separación puede mejorarse grandemente. La combinación de diferentes fases estacionarias y la variación en la longitud de su columna da como resultado una selectividad totalmente novedosa e interesante. En general una fase móvil para CFS debe tener las características siguientes¹⁴:

- 1) El parámetro crítico (temperatura y presión) debe lograrse con el equipo comercial
- 2) El fluido debe estar disponible en alta pureza y no debe ser elevado su costo
- 3) El fluido debe ser químicamente compatible con la muestra y el equipo de CFS
- 4) El fluido debe ser miscible con muchos solventes orgánicos

6.3. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRTICOS

La temperatura crítica de una sustancia es la temperatura por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Una sustancia a temperatura y

presión por encima de su temperatura y de su presión crítica (punto crítico) se denomina fluido supercrítico. Una propiedad importante de los fluidos supercríticos, que esta relacionada con sus elevadas densidades (de 0.2 a 0.5 g/cm³) es su notable capacidad para disolver moléculas grandes no volátiles¹⁷. Por ejemplo, el dióxido de carbono supercrítico disuelve fácilmente n-alcenos que poseen entre 5 y 30 átomos de carbono, ftalatos de di-n-alcilo en los cuales los grupos alcilo contienen entre 4 y 16 átomos de carbono y diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos que presentan varios anillos¹⁸. Es digno de mencionar que ciertos procesos industriales importantes se basan en la elevada solubilidad de las especies orgánicas en CO₂ supercrítico. Por ejemplo para la extracción de la cafeína de los granos de café y obtener el café descafeinado o de la nicotina del tabaco se ha empleado este fluido supercrítico¹⁹. Una segunda propiedad notable de los fluidos supercríticos es que los analitos disueltos en ellos pueden ser fácilmente recuperados por el procedimiento simple de permitir que las disoluciones se equilibren con la atmósfera a temperaturas relativamente bajas. Así, un analito disuelto en CO₂ supercrítico, que es el usado más frecuentemente como disolvente, puede ser recuperado sencillamente reduciendo la presión y dejando que el fluido se evapore en las condiciones ambientales del laboratorio. Esta propiedad es particularmente importante en el caso de analitos termolábiles. Otra ventaja de muchos de los fluidos supercríticos es que son baratos, inocuos y no son sustancias tóxicas, por lo que se pueden dejar evaporar libremente en la atmósfera sin efectos ambientales dañinos. El CO₂ como fluido supercrítico es especialmente útil tanto para extracciones como para cromatografía, además, los fluidos supercríticos tienen la ventaja de que las difusividades de los solutos en ellos son de orden de magnitud más altos que en los líquidos y que las viscosidades son un orden de magnitud más bajas que las de los disolventes líquidos.

6.4. INTRODUCCIÓN A LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Cuando dos moléculas se aproximan una a otra en un fluido, a una temperatura donde su velocidad relativa es probable que sea baja, las fuerzas de atracción mutuas provocarán una asociación temporal entre ellas. Si hay una densidad suficiente de moléculas, existe la posibilidad de condensación a un líquido. Por otro lado, si la temperatura y las velocidades relativas probables son elevadas, la fuerza de atracción será muy débil para tener sólo un efecto escaso a las velocidades moleculares y la condensación no puede ocurrir por elevada que sea la densidad molecular. Es, por lo tanto, razonable esperar (sobre las bases del comportamiento molecular) que para cada sustancia haya una temperatura debajo de la cual es posible la condensación a un líquido (y evaporación a un gas), pero arriba de la cual estos procesos no puedan ocurrir²⁰.

El que haya una temperatura crítica encima de la cual una sustancia pueda existir solo como fluido y no como líquido o gas fue demostrado experimentalmente hace 170 años por Charles Cagniard de la Tour. Él calentó sustancias, presentes como líquido y vapor, en un cañón sellado el cual agitó y descubrió que, a cierta temperatura, el derramamiento cesaba. Más tarde construyó un aparato de cristal en el cual el fenómeno podía ser observado más directamente²¹.

DIAGRAMA DE FASES PARA UNA SUSTANCIA PURA

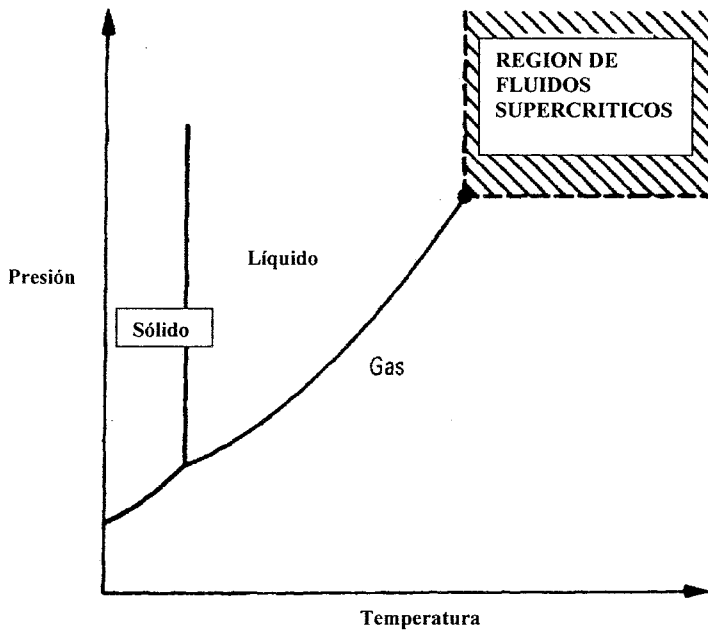


Fig. 2 Diagrama que muestra las fases de una sustancia pura y la región de los fluidos supercríticos.

Estos fenómenos pueden ser puestos en contexto en la figura 2 que es un diagrama de fases de una sola sustancia. El diagrama es esquemático, el eje de la presión no lineal y la fase

sólida a temperaturas elevadas ocurre a presiones muy altas. Las áreas donde la sustancia existe únicamente como fase sólida, líquida o gaseosa están señaladas; así como el punto triple donde coexisten las tres fases. Las curvas representan la coexistencia entre dos de las fases. Si nos movemos hacia arriba a lo largo de la curva de coexistencia entre gas y líquido, el cual es un tramo de presión de vapor contra temperatura, como se muestra en la figura 2, tanto la temperatura como la presión aumentan. El líquido se hace menos denso debido a la expansión térmica y el gas se vuelve más denso conforme aumenta la presión. Eventualmente las densidades de las dos fases se hacen idénticas, la diferencia entre el gas y el líquido desaparece y la curva llega al final en el punto crítico²². La sustancia es ahora descrita como un fluido. El punto crítico²³ tiene coordenadas de presión y temperatura en el diagrama de fase, las cuales son referidas como temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c), las cuales tienen valores particulares, como se muestra por ejemplo en la tabla 1.

TABLA1. SUSTANCIAS ÚTILES COMO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, Y SUS CORRESPONDIENTES PARÁMETROS CRÍTICOS²¹.

	TEMPERATURA CRÍTICA (KELVIN)	PRESIÓN CRÍTICA (psi)
DIOXIDO DE CARBONO	304	74
AGUA	647	221
ETANO	305	49
ETENO	282	50
PROPANO	370	43
XENÓN	290	58
AMONIO	406	114
ÓXIDO NITROSO	310	72
FLUOROFORMO	299	49

La desaparición de la diferencia entre las fases líquida y gaseosa puede ilustrarse gráficamente desarrollando una versión moderna del experimento de Cagniard de la Tour²⁴ en el cual los meniscos entre un líquido y un gas dentro de una celdilla de observación desaparecen a la temperatura crítica. La figura 3 muestra tres representaciones esquemáticas de una celdilla de observación en la cual este experimento es conducido a puntos apropiados en la curva de coexistencia liquido-gas.

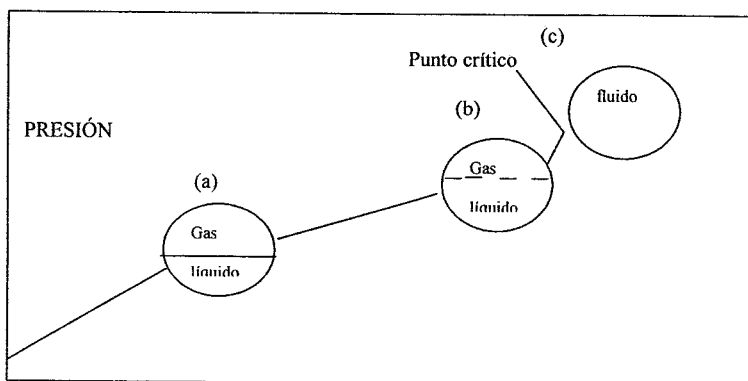


Fig. 3 Esquema de la desaparición del menisco entre un gas y un líquido en el punto crítico.

La celdilla (a) está a la temperatura más baja y muestra las fases de líquido y gas con un menisco entre ellas. Conforme aumentan la presión, la temperatura y la densidad la diferencia entre las dos fases disminuye, el menisco se hace menos notorio, como se muestra en la celdilla (b). En la práctica el menisco ya no es plano, debido a las fluctuaciones de la temperatura y las diferencias mínimas en la densidad. Cuando se rebasa el punto crítico el menisco desaparece totalmente, como se muestra en la celdilla (c).

En la figura 4 se muestran fotografías de un experimento real de este tipo, en el cual los efectos descritos pueden ser vistos a pesar de la turbulencia térmica presente.

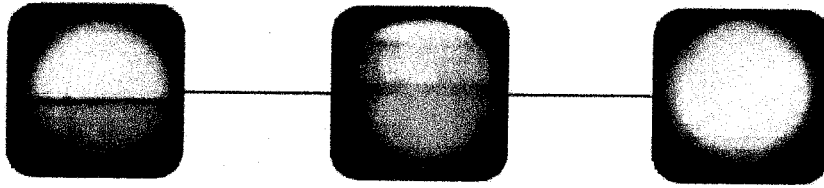


Fig.4. Fotografía de un experimento real en el cual se observa la desaparición del menisco en el punto crítico.

En años recientes, los fluidos han sido llevados por encima de sus temperaturas y presiones críticas y el término fluidos supercríticos ha sido utilizado para describir estos medios. Las mayores ventajas de los fluidos supercríticos ocurren típicamente no muy por encima de sus temperaturas críticas. El gas nitrógeno en un cilindro es un fluido, pero no es usualmente considerado como un fluido supercrítico, es más a menudo descrito con un término más antiguo como gas permanente²⁵. La región para los fluidos supercríticos es el área sombreada en la figura 2. Las presiones bajas son importantes en la práctica también porque estas condiciones son relevantes en estados de separación en procesos supercríticos. No hay límites de fase abajo y a la izquierda de la región supercrítica y el comportamiento no cambia dramáticamente al moverse fuera del área sombreada en estas direcciones. La región de líquido a la izquierda de la región supercrítica tiene muchas de las características de los fluidos supercríticos. Por esta razón muchos prefieren el término fluidos cercanos al estado crítico y el adjetivo subcrítico es también utilizado. Los fluidos supercríticos exhiben características importantes tales como compresibilidad, homogeneidad y un cambio continuo desde propiedades de gas a propiedades de líquido. Estas propiedades son características de condiciones dentro de la región de fluidos supercríticos y a diferentes grados alrededor del área. La tabla 1 nos muestra los parámetros críticos de algunos de los

compuestos importantes útiles como fluidos supercríticos. El CO_2 ha sido por mucho tiempo el más utilizado, debido a su conveniente temperatura crítica, bajo costo, estabilidad química, estabilidad en aplicaciones radioactivas y no toxicidad. Grandes cantidades de CO_2 liberadas accidentalmente pueden constituir un riesgo de trabajo, pero están disponibles los detectores de riesgo. El CO_2 utilizado es obtenido en grandes cantidades como subproducto de la fermentación, la combustión, y de la síntesis de amonio y sería liberado a la atmósfera tarde o temprano, si no fuera utilizado como fluido supercrítico. Su carácter polar como solvente es intermedio entre un solvente verdaderamente no polar tal como el hexano y solventes débilmente polares. Debido a que la molécula es no polar es a menudo clasificado como solvente no polar, pero tiene cierta afinidad limitada con solutos polares²⁶. Para mejorar su afinidad con moléculas polares, el CO_2 es algunas veces modificado con compuestos polares que actúan como modificadores²⁷. Sin embargo, el CO_2 puro puede ser utilizado para muchas moléculas orgánicas aún si tienen algún carácter polar, tiene una afinidad particular hacia los compuestos fluorados y es útil para trabajar con fluoropolímeros. El dióxido de carbono no es tan buen solvente para los polímeros hidrocarbonados y otros hidrocarburos de elevada masa molecular. El etano, el eteno y el propano son algunas alternativas para estos compuestos, aunque tienen las desventajas de ser peligrosos debido a que son inflamables y por ser en cierta forma menos benignos para el ambiente que el dióxido de carbono. El agua tiene ventajas ambientales entre otras, aunque sus parámetros críticos son menos convenientes y eleva los problemas de corrosión. El agua supercrítica esta siendo utilizada como un medio para la destrucción oxidativa de desperdicio tóxico²⁰. Existe un particular interés tanto en el agua supercrítica como en el agua cerca de las condiciones críticas debido a que su polaridad disminuye conforme se eleva la temperatura. El amonio tiene un comportamiento similar, es a menudo discutido y

considerado, pero pocas veces utilizado. Muchos halocarbonos tienen la desventaja del costo o de ser ambientalmente perjudiciales. El xenón es caro, pero útil para experimentos en pequeña escala que involucren espectroscopia debido a su transparencia en el infrarrojo, por ejemplo. Aunque en la práctica el interés por los fluidos supercríticos obedece a razones ambientales, el interés fundamental se debe a las propiedades intermedias que poseen entre gases típicos y líquidos. Comparados con los líquidos, las densidades y viscosidades son menores y las difusividades mayores²⁸. Las condiciones deben ser óptimas para un proceso particular o experimento. Además, las propiedades son controlables tanto por presión como por temperatura y el grado extra de libertad, comparado con un líquido, puede significar que más de una propiedad puede ser optimizada. Cada ventaja debe ser confrontada con el costo y con el inconveniente de utilizar presiones más elevadas. Consecuentemente, los fluidos supercríticos son utilizados en determinadas áreas.

7. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRTICOS COMO TÉCNICA ANALÍTICA

La cromatografía de fluidos supercríticos es una modalidad híbrida entre la cromatografía de gases y la de líquidos que combina algunas de las mejores características de cada una de ellas²². Esta técnica es uno de los tres tipos importantes de cromatografía en columna que está empezando a tener una gran aplicación en muchos laboratorios de la industria, de control y entre los docentes. La CFS es de gran importancia porque permite la separación y determinación de un gran grupo de compuestos que no son manipulados convenientemente ni por la cromatografía de gases ni por la de líquidos. Estos compuestos son:

- 1) Los compuestos no volátiles o térmicamente lábiles para los que la cromatografía de gases es inaplicable.

- 2) Los compuestos que tienen grupos funcionales que no son detectables por las técnicas espectroscópicas o electroquímicas empleadas en cromatografía de líquidos.

7.1. USOS GENERALES DE LA TÉCNICA¹⁵

- Separación de una amplia variedad de compuestos volátiles y no volátiles: orgánicos, organometálicos,²⁹ biológicos, poliméricos, quirales³⁰ y termolábiles.
- Análisis de impurezas
- Purificación de compuestos³¹
- Separación de compuestos relacionados de manera muy cercana³²
- Como método no destructivo
- Como método cuantitativo y cualitativo³³
- Separación de mezclas complejas
- Utilizable con todo tipo de detectores

7.2. APLICACIONES COMUNES¹⁵

- Preparación de muestras para análisis³⁴
- Medición de los niveles de fármacos, subproductos sintéticos o productos de degradación en formas farmacéuticas.
- Medición de niveles de compuestos tóxicos tales como pesticidas o insecticidas^{35, 36}
- Monitoreo de muestras ambientales.
- Purificación de compuestos a partir de mezclas tales como surfactantes, hidrocarburos, y otros químicos.

- Separación de polímeros y aditivos poliméricos y determinación de la distribución del peso molecular de los polímeros en una mezcla.
- Control de calidad.
- Seguimiento de reacciones sintéticas.

7.3. CARACTERÍSTICAS

La muestra debe disolverse en líquido o fluido supercrítico para su inyección dentro del instrumento para cromatografía de fluidos supercríticos; la muestra puede ser líquida, semisólida, o sólida para la extracción con fluidos supercríticos (EFS).

La cantidad inyectada va desde 0.1 a 1.0 μL , ésta varía dependiendo de la sensibilidad y el intervalo dinámico del detector para el analito y las dimensiones de la columna para la CFS.

La cantidad tomada para la CFS depende de la concentración del analito en la matriz.

La preparación de la muestra debe incluir cualquiera de los siguientes pasos: dilución, preconcentración, filtración, extracción vía líquida o fluido supercrítico, o derivatización.

El tiempo de análisis para la CFS esta en un intervalo de 2 min a 1 hora. La preparación de la muestra difiere de una muestra a otra y requiere más tiempo que el análisis.

7.4. LIMITACIONES

- La identificación de compuestos está limitada a menos que la CFS o la EFS sea confrontada con la espectrometría de masas o la espectrometría de infrarrojo.
- La resolución puede ser difícil de obtener con mezclas complejas.
- Sólo se puede analizar una muestra a la vez.
- Se requiere capacitación para optimizar separaciones.

7.5. INSTRUMENTACIÓN Y VARIABLES DE OPERACIÓN

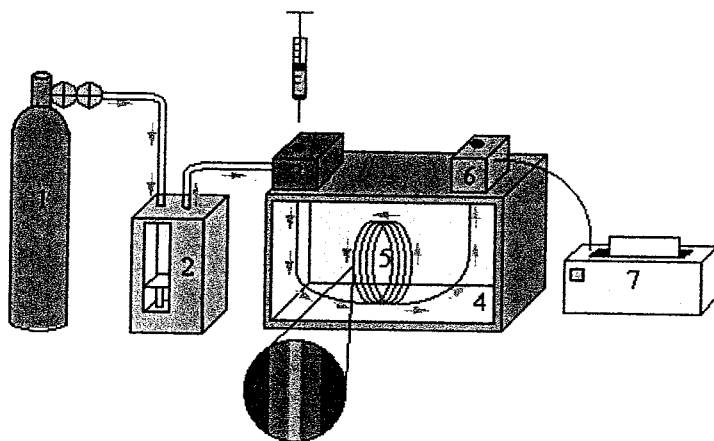


FIG. 5 Diagrama de un sistema para CFS

Las presiones y temperaturas necesarias para originar los fluidos supercríticos a partir de los diversos gases y líquidos se ajustan bien dentro de los límites de trabajo de un equipo de CLAR corriente¹⁶.

Existen, sin embargo, dos diferencias importantes: primero es necesario un horno, similar al empleado en cromatografía de gases, para mantener la columna termostatazada y además, proporcionar un control preciso de la temperatura de la fase móvil; segundo, un restrictor o un dispositivo de contrapresión, que se utiliza para mantener la presión en la columna en el nivel deseado y para convertir el eluyente, de fluido supercrítico en un gas, y arrastrarlo al detector. Un restrictor típico para una columna tubular abierta de 50 a 100 μm consiste en un capilar de 2 a 10 cm de longitud y 5 a 10 μm de diámetro, el cual está directamente unido al extremo final de la columna. En otros casos, el restrictor puede ser una parte integrante de la columna al calentar ésta en una llama. El primero permite el empleo de restrictores intercambiables que tengan diámetros de entrada diferentes, proporcionando así

un intervalo de caudales para cualquier presión de bomba dada. Un instrumento comercial de CFS está equipado habitualmente con uno o más microprocesadores que permiten el control de las variables instrumentales tales como la presión de bombeo, la temperatura del horno y el funcionamiento del detector. Muchos de los problemas en implementar la CFS vinieron de la instrumentación. El requisito de temperatura y presión para bombear a bajas velocidades de flujo (bajo condiciones constantes y de gradiente) un fluido comprimido pero con viscosidad baja y alta presión a una velocidad de caudal constante reproducible fue difícil de lograr por mucho tiempo. Sólo el mantener una contrapresión constante fue a menudo un problema. Además, la muestra tenía que ser introducida en forma precisa en este caudal de alta presión. Estos problemas hicieron que la CFS no fuera ampliamente adoptada como método de rutina en los 80's. No fue sino hasta que se introdujo la segunda generación de instrumentos en los 90's por Anachem y Hewlett-Packard, que los principales problemas parecieron superarse. Sin embargo, para este tiempo, el fracaso de la técnica para brindar reproducibilidad significó que el mercado se perdiera por mucho tiempo.

7.5.1. HORNO

El horno de un sistema para CFS debe tener los mismos requerimientos de un horno normal para cromatografía de gases¹⁷. Debe prevalecer una temperatura constante en todo el horno en cualquier momento de un gradiente de temperatura positivo o negativo. Esto es muy importante para el análisis reproducible de la CFS en columna capilar. Estas columnas son muy sensibles aun a pequeñas variaciones en temperatura, que pueden resultar en la

deformación de los picos, la amplitud de los picos o en tiempos de retención irreproducibles.

7.5.2. INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

Para las columnas empaquetadas y las columnas capilares se utilizan diferentes sistemas de introducción de la muestra¹⁷. En el caso de las columnas capilares, encontrar soluciones apropiadas para la introducción de la muestra es más difícil que para las columnas empaquetadas. Debido a que las columnas empaquetadas tienen dimensiones similares a las de la CLAR normal, la introducción de la muestra puede lograrse con inyectores de bucle ordinarios³⁷. En una columna capilar normal (10 m x 50 μ m) se deben inyectar <100 μ L para prevenir una pérdida mayor de 1% en resolución. Para lograr esto, se han utilizado diferentes técnicas de introducción de muestra. En 1988, Greibrokk y col.³⁸ describieron una técnica que involucra la separación del solvente a partir del soluto en una precolumna. Los solutos son luego transferidos a la columna analítica donde son dirigidos a la cabeza de la columna. Otras técnicas de eliminación de solvente basadas en la purga de gas fueron reportadas por Lee et al.³⁹ Las técnicas reproducibles más comunes para inyectar volúmenes de muestra tan pequeñas en columnas capilares son la de apertura dinámica y la técnica de apertura con tiempo. En el modo de apertura dinámica, la cual es la técnica más frecuentemente utilizada en columna tubular abierta para CFS, el radio de apertura es determinado por el cociente del flujo de salida de la columna al flujo de salida del restrictor de apertura. Así, el flujo de salida de la apertura es 500 veces más rápido que el flujo de salida de la columna, el radio de apertura es 1:500. La desventaja de la técnica de apertura dinámica es que puede ser difícil la obtención de resultados reproducibles con ciertas

muestras. La técnica de inyección de apertura con tiempo está basada en los primeros trabajos hechos por J.C. Moore⁴⁰ para la cromatografía de líquidos. En 1986, Richter⁴¹ fue el primero en reportar sobre esta técnica en CFS. Una válvula de inyección estándar, la cual es manejada neumáticamente por gas de baja viscosidad como el helio, es conectada directamente a la columna analítica (columna empaquetada o columna capilar). La válvula es electrónicamente manejada por neumáticos de alta velocidad para asegurar tiempos de cambio muy rápidos (de posición cargada a posición de inyección y de regreso en milisegundos). Mientras más corto es el tiempo de cambio, mas pequeño es el volumen de muestra inyectada. Debido a los espacios de reproducibilidad con estas dos técnicas de inyección, se recomienda el uso de un estandar interno para el análisis cuantitativo.

7.5.3. COLUMNAS

Una vez que la muestra es inyectada en la corriente supercrítica es llevada dentro de la columna analítica¹⁶. La columna contiene una fase estacionaria en donde el analito puede ser adsorbido temporalmente y luego liberado dependiendo de su naturaleza química. Esta retención temporal hace que algunos analitos permanezcan más tiempo en la columna y es lo que permite la separación de la mezcla. Hay disponibles diferentes tipos de fases estacionarias con diversas composiciones y polaridades. Existen dos tipos de columnas analíticas utilizadas en CFS, empaquetada y capilar. Las columnas empaquetadas contienen pequeñas partículas inactivas a las que se adhieren las fases estacionarias. Las columnas son convencionalmente de acero inoxidable. Las columnas capilares son columnas tubulares abiertas de diámetro interno estrecho hechas de sílica fundida, con la fase estacionaria unida a la pared de la columna.

7.5.4. DETECTORES

Una de las ventajas de la CFS es el hecho de que se puede aplicar una amplia variedad de métodos de detección¹⁴. Como en la cromatografía de líquidos, en la CFS se utilizan detectores destructivos y no destructivos. El detector más comúnmente utilizado para esta técnica es el detector de ionización de flama. Es un detector destructivo, sensitivo y universal, el cual es bien conocido en la CG. El detector UV es también utilizado frecuentemente en CFS, principalmente en columna empaquetada, debido a los problemas de sensibilidad con las columnas capilares. Ya que el dióxido de carbono puro muestra poca absorbancia entre 200 y 800 nm, la detección de UV en columna empaquetada es muy sensible. Un detector no destructivo y universal en CFS es el FT-IR. Aunque su sensibilidad no es muy elevada, esta técnica es altamente informativa y a menudo ayuda a identificar analitos por sus grupos funcionales característicos o para resolver problemas de estructura molecular. Comparados con la cromatografía de líquidos, los sistemas CFS-FT-IR tienen la ventaja significativa de que el CO₂ es transparente en gran parte de la región infrarroja. El fluido "ideal" para la detección del flujo CFS-FT-IR es el xenón supercrítico. Es transparente a lo largo de la región infrarroja y muestra suficiente poder como disolvente. Desafortunadamente el alto precio del xenón limita su aplicación en el análisis de rutina. La CFS asociada a la espectrometría de masas (EM) ha sido uno de las aplicaciones más exitosas de la CFS. La ventaja es que es mucho más fácil evaporar una fase móvil supercrítica dentro de una fuente de EM que en la mayoría de los solventes de cromatografía de líquidos. El desarrollo del método es muy simple ya que sólo la presión y la temperatura han de ser controlados. Sus aplicaciones son amplias e incluyen los exámenes forenses de fármacos controlados, productos naturales, aditivos poliméricos,

muestras clínicas y metabolitos de fármacos. Debido a que el CO_2 no contiene protones también es atractivo como un solvente transparente para la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (ERMN). En este sistema la celda del detector es presurizada y para asegurar una señal constante la presión debe ser mantenida durante el escaneo. El mayor problema en este sistema ha sido la baja polaridad del dióxido de carbono lo cual limita el tipo y el número de analitos que pueden ser examinados.

7.5.5. RESTRICTORES

El restrictor es una parte importante de todo equipo de CFS. Mantiene una presión constante en el sistema y asegura, o al menos debería asegurar, un flujo uniforme, libre de pulsaciones del fluido supercrítico; así también, es responsable de la reproducibilidad del análisis¹⁴. Usualmente el restrictor debe ser calentado, debido a la expansión del flujo supercrítico a la presión atmosférica, que produce un enfriamiento fuerte y la formación de CO_2 sólido, el cual produce un taponamiento en el restrictor y por lo tanto irregularidades en el flujo y reproducibilidad del análisis.

7.6. FUNCIONAMIENTO DE LA CFS

Para entender los principios bajo los cuales se comporta un fluido supercrítico, debemos primero pensar en un gas como solvente. Como sabemos, un gas puede ser utilizado para realizar separaciones basadas en la presión de vapor. El gas es colocado en contacto con la muestra a temperaturas elevadas y los analitos se disuelven en el gas como función de su volatilidad. Esto se hace rutinariamente en la cromatografía de gases. El aumento de la temperatura resulta frecuentemente en una descomposición térmica de la muestra. Por otro lado, muchos materiales, especialmente aquellos de origen polimérico, no muestran

presiones de vapor suficientemente elevadas para ser separados por métodos térmicos. Estos, como muchos sólidos, no muestran una solubilidad apreciable en un gas. Bajo tales condiciones, la entalpía de disolución requiere una interacción más fuerte entre el analito y el solvente para superar las interacciones soluto-soluto o soluto-matriz. Por ejemplo, en la disolución del naftaleno en etileno supercrítico alrededor del punto crítico, el volumen molar parcial del soluto comienza a disminuir dramáticamente conforme las moléculas del etileno se agrupan alrededor del naftaleno. La distancia promedio entre las moléculas disminuye y el comportamiento del gas no ideal comienza a dirigir las interacciones entre el solvente y la muestra, debido al aumento en solubilidad. Es posible regular la fuerza solvente del fluido supercrítico en cualquier parte del intervalo desde el gas ideal hasta el líquido puro. Debido a la incompresibilidad de los líquidos, este fenómeno es especial en los fluidos supercríticos. En esta región, se debe tener mayor cuidado en controlar el comportamiento del solvente, que en ningún otro momento. Es posible, agregando pequeñas cantidades de cosolventes al fluido supercrítico, diseñar un fluido supercrítico para una aplicación específica. Muchos fabricantes ofrecen ahora aparatos útiles tanto para CFS como para EFS. Muchos de los componentes de un sistema para CFS (suplemento de gas, bomba, horno y regulador de contrapresión) son idénticos a los del sistema de EFS⁴³. Para los sistemas analíticos de CFS o EFS el suplemento de gas es simplemente un cilindro de tamaño estándar para laboratorio de los diferentes fabricantes. El CO₂, en virtud de sus parámetros críticos moderados, su elevada pureza y su bajo costo, es el fluido supercrítico más comúnmente utilizado hoy en día, pero muchos otros fluidos potencialmente útiles están disponibles. Desde el cilindro que contiene tanto gas como líquido, este último es llevado del tanque hasta la bomba, donde es presurizado al valor deseado. Se pueden encontrar dos tipos de bombas principales en los instrumentos de CFS y EFS: de jeringa y

de pistón. Las bombas de jeringa tienen volúmenes fijos y cualquier corrida en progreso debe ser interrumpida si la bomba es vaciada durante la corrida. Para minimizar este problema, se utilizan bombas de doble jeringa. Las bombas de pistón están limitadas solo por el volumen del líquido del cilindro de suministro gas-líquido. Sin embargo, es necesario enfriar las cabezas del pistón de manera que solo la fase líquida no compresible sea bombeada. Muchos de los nuevos instrumentos para EFS ahora incorporan bombas de pistón en su diseño. La mayoría de los fabricantes actuales incluyen dos bombas (usualmente como una opción), una para liberar el fluido primario y la otra para liberar el nivel deseado de cosolvente. Las bombas para EFS típicamente tienen presiones máximas entre 6000 y 10,000 psi, y pueden proveer velocidades de flujo del líquido de aproximadamente 20 mL por minuto. El controlador en muchos instrumentos de EFS y de CFS permite que diversos gradientes, la presión del CO₂ o fase móvil, sean programados en el método. Debido a que la CFS requiere un flujo más uniforme, la bomba de jeringa es más popular, aunque Hewlett-Packard ha introducido una bomba de pistón para CFS que produce un flujo sin pulsaciones. Desde la bomba, el líquido viaja a una zona calentada, donde se convierte en supercrítico y luego a un vaso de extracción para EFS, donde la muestra es almacenada. El vaso de extracción es guardado en un horno de manera que la temperatura deseada sea mantenida. Los hornos provistos con instrumentos analíticos de EFS usualmente tienen temperaturas máximas entre 100 y 150°C. Los vasos de extracción contenidos en el horno son cartuchos de acero inoxidable con volúmenes desde una fracción de mililitro a más de 10 ml, aunque hay disponibles vasos más grandes. Al menos un fabricante (ISCO) proporciona cartuchos desechables de composición polimérica. Están todos sellados por ambos lados para evitar la penetración de partículas. En el caso de la CFS el vaso de extracción es reemplazado por un inyector y una columna. La contrapresión

en EFS y CFS puede ser producida por un restrictor estable. Con un restrictor estable la velocidad de flujo no puede ser controlada independientemente de la presión. Así, deben de sustituirse los restrictores lineales con diferentes diámetros y longitudes de tubos para mantener velocidades de flujo constantes bajo diferentes condiciones de presión. Esto se hace rara vez en la práctica; por lo tanto, la velocidad de flujo varía efectivamente con la programación de la densidad. Los orificios estrechos de los restrictores pueden también colocarse boca abajo para no taparse si una gran cantidad de material soluble esta siendo separada o extraída. El calentar los restrictores ayuda a aliviar (no eliminar) los problemas de obstrucción. Las válvulas micrométricas de alta presión electrónicamente controladas se están haciendo más populares en la EFS y la CFS. Estos reguladores de contrapresión, llamados restrictores variables, permiten que las velocidades de flujo sean ajustadas a niveles constantes a diferentes densidades (presiones). El diseño de restrictores estables, aunque no es importante en la EFS, es crucial para el éxito de la CFS. Comúnmente, los detectores de flama deben utilizar restrictores estables. Durante una aplicación típica de EFS la muestra es colocada en el vaso de extracción de alta presión y equilibrada a la temperatura deseada. Luego se deja que el fluido de extracción fluya dentro del vaso y sea presurizado al valor deseado. En este punto, se puede iniciar una extracción estática, dinámica o una combinación. Mientras los analitos son disueltos en el fluido supercrítico estos deben ser removidos por la fase supercrítica a una región separada. Normalmente, los analitos viajan a través del restrictor, donde el fluido supercrítico se descomprime y los analitos se depositan en una especie de trampa. Esta consiste a menudo en 5 a 15 ml de líquido o varios gramos de soporte sólido (esferas de acero inoxidable o material de empaque cromatográfico). Una vez que el analito ha sido o enjuagado a partir de la trampa

de fase sólida o depositado en la trampa líquida, está listo para el análisis cromatográfico o espectrométrico.

Para la CFS, los requerimientos de bomba y suministro de CO₂ son similares. El horno puede ser el mismo, pero debe ser suficientemente grande para acomodar la columna cromatográfica. Las columnas tubulares abiertas de sílica (1-50 m) y las columnas empaquetadas de acero inoxidable (10-25 cm) son las utilizadas rutinariamente. Las fases estacionarias para las columnas tubulares abiertas deben ser altamente de enlace cruzado porque el poder solvente del CO₂ a elevada densidad y temperatura puede producir sangrías en la columna. Las columnas normales para CG no son suficientes. Las columnas tubulares abiertas para la CFS son más estrechas que las columnas para CG (50 μ m en vez de 320 μ m) porque las velocidades lineales en la CFS son 10 a 100 veces más elevadas que la óptima. Una porción de esta pérdida de eficiencia es recuperada utilizando una columna de diámetro interno menor. Debe también hacerse notar que con un restrictor fijo, la velocidad lineal sigue aumentando a medida que aumenta la densidad con la consecuente pérdida de la eficiencia de la columna. Para una columna empaquetada, en donde la eficiencia es proporcional al diámetro de partícula, se pueden utilizar las columnas tradicionales para cromatografía de líquidos. Usualmente estas fases estacionarias son activadas de tal manera que para eluir analitos polares se necesita modificar el CO₂. Los materiales moderadamente polares pueden ser separados con CO₂ al 100% en estas columnas.

Las dificultades en la introducción de la muestra en CFS pueden variar dependiendo del tipo de columna utilizada. El problema es de gran importancia para usuarios de columna capilar. Una inyección de solo 200 nL en una columna de diámetro interno de 50 μ m

resulta en una pérdida de resolución del 10%. Los métodos de inyección dividida (división dinámica, división retardada y división limitada) proporcionan una solución simple al problema del volumen de inyección, pero tienen también efectos perjudiciales. La inyección de división dinámica, por ejemplo, puede mostrar discriminación de la muestra y no linealidad. Aunque la inyección de división limitada ha demostrado ser una excelente alternativa de la división dinámica, permanece el problema de la pérdida de muestra como resultado de la división. Si se va a utilizar la inyección dividida las muestras deben ser concentradas.

Los estudios más recientes en la introducción de la muestra se han enfocado en la optimización de métodos desarrollados para la eliminación del solvente. Como una alternativa, las muestras pueden ser disueltas en el propio fluido, como se realiza en la cromatografía de líquidos mezclando las muestras con la fase móvil.

La detección utilizando tanto detectores de alta información como detectores selectivos es un área activa de investigación. La ionización de flama con columnas tubulares abiertas y la espectroscopía ultravioleta con columnas empaquetadas de 4.6 mm son utilizados rutinariamente como detectores. Las columnas empaquetadas de diámetro interno pequeño pueden ser fácilmente utilizadas con detección de ionización de flama, mientras que la detección ultravioleta con columnas tubulares abiertas no se ha perfeccionado. La espectroscopía de masas, el infrarrojo, la emisión atómica y la resonancia magnética nuclear se han utilizado con diferentes columnas.

8. FACTORES QUE AFECTAN EN LA CFS

La retención y la selectividad en la CFS son una función compleja de muchas variables experimentales y no son tan sencillas de racionalizar como en el caso de la CL y la CG. La retención en CFS depende de la temperatura, la densidad y caída de presión, la composición de la fase estacionaria y la composición de la fase móvil. Muchas de estas variables son interactivas y no cambian de una manera simple ni son fácilmente predecibles.

8.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Los cambios en la retención a densidad constante son predecibles a partir de la ecuación de Vant Hoff⁴⁴. El logaritmo de los factores de capacidad es una función lineal del recíproco de la temperatura de la columna, aún por debajo de las condiciones subcríticas.

Normalmente la programación de temperatura en CFS se realiza aumentando la temperatura durante un programa de presión, densidad o eluyente, aunque programas de temperaturas negativas también pueden ser empleados para incrementar la densidad.

Aunque las condiciones de densidad son las mismas tanto por disminución de temperatura a presión constante o por incremento de presión a temperatura constante, lo último es preferible, ya que los coeficientes de difusión más altos a la temperatura constante más elevada favorece las propiedades de transporte de masa.

8.2. EFECTO DE LA CAÍDA DE PRESIÓN (CAÍDA DE DENSIDAD)

La selectividad es casi independiente de la presión en HPLC y CG, mientras que la presión (y su correspondiente densidad) es un parámetro importante para controlar la selectividad en CFS, particularmente si una presión significativa o una caída en la densidad ocurre a lo largo de la columna.

En general, las caídas de presión son bajas cuando se utilizan columnas tubulares abiertas, pero son significativamente más altas con columnas empaquetadas, por tanto, tienen un

efecto significativo en la resolución cromatográfica con sistemas de columna empaquetada⁴⁵.

Para mantener una selectividad constante conforme aumenta la caída de la densidad, la caída en la cabeza de la columna debe ser aumentada. Alternativamente, si la densidad en la cabeza de la columna se mantiene constante mientras que la caída de la presión aumenta, tanto la selectividad como la retención aumentarán.

8.3. EFECTO DE LA DENSIDAD TOTAL

La densidad de la fase móvil es uno de los parámetros más importantes utilizados para optimizar separaciones en CFS con densidad programada. La capacidad de retención K' ⁴⁶, decrece linealmente a densidades más altas con diferentes inclinaciones para diferentes clases de compuestos, produciendo cambios en la selectividad.

8.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL (MODIFICADORES POLARES)

El CO₂, es la fase móvil más comúnmente utilizada en CFS, debido a su bajo costo, baja toxicidad y baja temperatura y presión crítica. El CO₂ muestra una polaridad similar a la del hexano. El poder disolvente de los eluyentes usados en CFS es generalmente incrementado agregando pequeñas cantidades de un segundo modificador eluyente. La selección de los solventes óptimos puede ser lograda de manera semejante en que se hacen las selecciones para solventes para CLAR, es decir, utilizando un solvente de esquema polaridad/selectividad. Para ser útil un esquema de caracterización solvente debe determinar eficientemente la fuerza solvente o polaridad y la selectividad solvente. La polaridad de no electrolitos es la capacidad del solvente para todas las interacciones intermoleculares (dispersión primaria, inducción, orientación e interacciones de protón

receptor-donador). La selectividad disolvente es una medida de la capacidad relativa para entrar en cada interacción específica. Las tres interacciones específicas primarias evaluadas en todos los esquemas de caracterización disolvente son orientación (interacción dipolar), protón-donador (acidez), y protón-receptor. Uno de los esquemas más ampliamente utilizados es el triángulo solvente presentado por Snyder y reevaluado a través del tiempo. En la propuesta de Snyder⁴⁷, los factores de selectividad solvente X_n (utilizando nitrometano), X_e (usando etanol) y X_d (usando dioxano) son utilizados para caracterizar la importancia relativa de orientación, basicidad y acidez respectivamente. Cuando estos tres términos son graficados uno contra otro por los solventes comunes, se genera un triángulo de selectividad donde solventes con selectividad similar son encerrados en 8 grupos de selectividad mayor. Adicionalmente un índice de polaridad de solvente, P' es calculado para proporcionar una medida de polaridad relativa de cada solvente. La temperatura, la presión y la densidad pueden también influir en la selectividad en otras maneras. Por ejemplo, la solubilidad del agua en fluidos supercríticos generalmente aumenta con la temperatura, por lo tanto, la solubilidad de los analitos polares aumenta debido al incremento de la actividad de la fase estacionaria.

TABLA 2 CONSTANTES CRÍTICAS Y PARÁMETROS DE SELECTIVIDAD Y POLARIDAD PARA MODIFICADORES ORGÁNICOS COMUNES

SOLVENTE	Pc (psi)	Tc (°C)	P'	X _d	X _c	X _n	$\Sigma\alpha_2^H$	$\Sigma\beta_2^H$	$\Sigma\pi_2^H$
DIOXIDO DE CARBONO	1070.4	31.1					0.00	0.10	0.42
n- HEXANO	436.6	234.4					0.00	0.00	0.00
TRIEIL AMINA	439.5	262.0	2.19	0.08	0.66	0.26	0.00	0.79	0.15
DIETILE TER	527.9	193.7	3.15	0.13	0.53	0.34	0.00	0.45	0.25
CLORURO DE ETILENO	735.3	250.0	3.5	0.21	0.30	0.49	0.10	0.11	0.64
ISOPROPANOL	690.4	235.3	3.92	0.17	0.57	0.26	0.33	0.56	0.36
ACETATO DE ETILO	555.5	250.2	4.24	0.22	0.36	0.42	0.00	0.45	0.62
TETRAHIDROFURANO	752.7	267.1	4.28	0.19	0.41	0.40	0.00	0.48	0.52
ACETONA	681.7	235.1	5.40	0.24	0.36	0.40	0.04	0.49	0.70
CLOROFORMO	778.9	263.4	4.31	0.35	0.31	0.34	0.15	0.02	0.49
PIRIDINA	816.6	347.0	5.53	0.22	0.42	0.36	0.00	0.52	0.84
ACETONITRILLO	700.5	272.5	5.64	0.25	0.33	0.42	0.07	0.32	0.90
ACIDO ACETICO	839.8	319.7	6.13	0.30	0.41	0.30	0.61	0.44	0.65
METANOL	1173	239.6	6.60	0.19	0.51	0.30	0.43	0.47	0.44
AGUA	3208	374.3	10.2	0.37	0.37	0.25	0.82	0.35	0.45

Los datos de la Tabla 2 incluyen la sumatoria de la escala de acidez del enlace-hidrógeno ($\Sigma\alpha_2^H$), la escala de basicidad ($\Sigma\beta_2^H$), y el descriptor dipolaridad/polaridad ($\Sigma\pi_2^H$).

9. APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE FLÚIDOS SUPERCRÍTICOS

9.1. ÁREAS DE APLICACIÓN

La figura 6 nos resume las áreas de aplicación de la CFS destacando la aplicación en el área farmacéutica con un 52% del total de los artículos revisados.

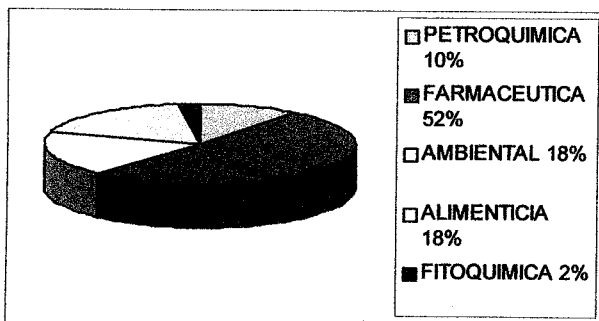
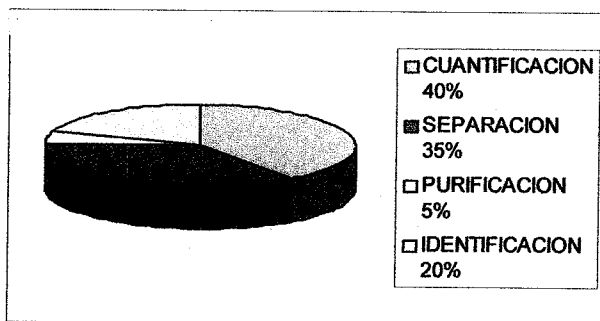


Fig. 6. Gráfica que muestra los porcentajes de las áreas de aplicación de la CFS

Después de revisar varios artículos publicados entre los años 2000 y 2003 se encontraron diversas aplicaciones de la CFS relacionadas con la cuantificación, la separación, la purificación y la identificación de diferentes analitos. Esta proporción se resume en la figura 7, la cual nos muestra que la cuantificación y la separación son las dos aplicaciones principales de esta técnica.

Fig.7. Gráfica que muestra los porcentajes en los que se usa la CFS



A continuación se comentan algunos de los artículos encontrados en las áreas alimenticia, ambiental y farmacéutica que son las que se encontró que tienen un mayor porcentaje de aplicación.

9.2. APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN ALIMENTOS

El método estandar para la determinación de ácidos grasos libres (AGL) en aceites es la titulación⁴⁸. Como alternativa, la CFS proporciona información cualitativa y cuantitativa útil sobre la composición de los ácidos grasos, junto con información valiosa sobre otras clases de lípidos y en muchos casos, sin necesidad de derivación o esterificación de los ácidos libres. En los últimos años, el interés en los ácidos grasos poliinsaturados ha aumentado debido a sus efectos fisiológicos benéficos. Para estudiar estos ácidos, la CFS se ha utilizado para la separación analítica y para la fragmentación preparativa de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente etil ésteres⁴⁹. La CFS ofrece algunas ventajas comparada con la cromatografía de líquidos y la de gases. El uso de temperaturas elevadas

en cromatografía de gases es una desventaja para la separación de compuestos termolábiles y los ácidos grasos libres son más difíciles de separar por cromatografía de gases debido a su elevada polaridad y baja volatilidad. La CFS ofrece la posibilidad de separaciones altamente eficientes de llevarse a cabo a temperaturas relativamente bajas y utilizando algunas veces un sistema de detección universal tal como los detectores de flama. El CO₂ es la fase móvil más comúnmente utilizada en CFS, debido a sus propiedades físicas y químicas como temperatura y presión bajas y su neutralidad química⁴⁶. La baja viscosidad de CO₂ resulta en una mayor eficiencia de columna y permite una mayor velocidad de flujo, dando tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, la falta de polaridad del CO₂ puro lo hace inaceptable como fase móvil para compuestos polares y de peso molecular elevado tal como los ácidos grasos libres en columnas empaquetadas. Consecuentemente, la CFS, con CO₂ requiere de la adición de pequeñas cantidades de solventes más polares o modificadores para incrementar la fuerza solvente de la fase móvil, desactivar los sitios activos en la superficie del material de empaque y permitir la elución de compuestos polares como ácidos grasos con elevada eficiencia⁵⁰. Desafortunadamente cuando se utilizan partículas con base sílica, el efecto de los modificadores solos es a menudo insuficiente para evitar los problemas producidos por la polaridad de los grupos silanol residuales en la separación cromatográfica de analitos polares. Para superar estas limitaciones se han desarrollado nuevos métodos para obtener material de empaque menos polar (más inerte) para la CFS⁵¹. Algunos de estos métodos están basados en el uso de procedimientos más eficientes para desactivar las partículas de sílica y en el recubrimiento de polímeros en la superficie de partículas desactivadas. De este modo, las propiedades físico-químicas de la superficie de partícula, pueden ser cambiadas para extender el intervalo de aplicación aún con CO₂ puro como fase móvil. Las columnas capilares

empaquetadas han mostrado su potencial en CFS, porque combinan ventajosamente las características positivas de las columnas empaquetadas en términos de la velocidad de análisis y capacidad de muestra, con rangos de velocidad bajos, bajo consumo de fase móvil y sobretodo altas eficiencias que son características de las columnas tubulares abiertas. Las columnas capilares empaquetadas en la CFS sufren de pérdida de adsorción de la muestra cuando se necesita la separación de compuestos polares debido a las fuertes interacciones silanofílicas entre moléculas solubles polares y los grupos silanol residuales, especialmente cuando son utilizados materiales de empaque de base sílica y CO₂ puro, como fase móvil. La CFS puede utilizarse para realizar separaciones de ácidos grasos metil ésteres a temperaturas más bajas que con la cromatografía de gases y con mayor eficiencia y sensibilidad que con la cromatografía de líquidos⁵². Skaki⁵³ en 1993 estudió la separación de ácidos grasos metil ésteres por CFS utilizando aminopropil unido a materiales de empaque de sílica y diversas densidades de unión. Sugirió que el comportamiento cromatográfico de los ésteres puede ser descrito por dos tipos de selectividades; de acuerdo a la longitud de cadena y de acuerdo al grado de insaturación. La selectividad asociada a la longitud de cadena mejoró con el aumento de la densidad del aminopropil mientras que lo opuesto fue observado cuando el grado de insaturación fue considerado.

La CFS para los ácidos grasos poliinsaturados es un área de interés creciente ya que ha sido utilizado tanto para la separación analítica y para la fragmentación preparativa de los ácidos grasos poliinsaturados para estudiar los efectos fisiológicos benéficos y encontrar nuevas fuentes naturales de ácidos grasos poliinsaturados⁵⁴. Alkio et al.⁵⁵ reportaron la purificación de ácidos grasos poliinsaturados a partir de aceite de atún mediante CFS, utilizando columnas empaquetadas C18 de 10 mm X 250 mm. Después de la optimización del proceso, los autores obtuvieron ester acido docosahexanoico en concentraciones de pureza

arriba del 95% en peso en un paso cromatográfico utilizando CO₂ como fase móvil a 65°C y 145 bar.

Nomura et al.⁵⁶ investigaron el comportamiento cromatográfico del octadecil sílica gel para la CFS teniendo varias estructuras de poro para el análisis de ácidos grasos libres y ácidos grasos metil ésteres utilizando CO₂ como fase móvil sin un modificador. Los autores observaron que cuando el CO₂ fue utilizado como fase móvil sin modificador, los grupos silanol residuales de sílica gel interactúan con compuestos polares produciendo serios problemas tal como la adsorción irreversible o no específica, o el retraso considerable de la elución de la muestra. Ellos sugirieron la utilización de sílica gel con un diámetro de poro mayor y cobertura de los grupos silanol residuales después de la modificación de superficie primaria, para preparación de empaques inertes. Esta investigación representa un trabajo pionero en la separación ácidos grasos libres en la columna empaquetada utilizando CO₂ como fase móvil sin modificador. En el estudio de aceites de pescados y mariscos, la distribución cualitativa y cuantitativa de varias clases de lípidos, incluyendo los ácidos grasos en su forma libre natural, es de gran importancia. La aplicación de cromatografía de gases de alta temperatura puede ser difícil debido al riesgo de degradación térmica de sus componentes altamente insaturados⁵⁷. Por esta razón, la hidrogenación parcial o total es necesaria para eluir completamente los aceites, lo cual produce pérdida de la información de la estructura del aceite de pescado. Como lo demuestran diferentes autores,⁵⁸ la CFS es superior para separar los componentes lipídicos del aceite de pescado incluyendo los ácidos grasos, colesterol, tocoferoles, escualeno y triglicéridos, con un tiempo de análisis corto, mientras que la CLAR, no ofrece separaciones suficientes de los componentes del aceite de pescado.

9.3. APLICACIONES FARMACÉUTICAS

En el año 2003 Gauri Patel et al.⁵⁹ publicaron un método para medir los niveles de bencidina en el plasma sanguíneo. La separación se realizó con una columna Nucleosil-RP-C 18 con 7.4% de metanol (v/v) como modificador del CO₂ supercrítico (2.5 mL min⁻¹) como fase móvil. Vessela Buss,⁶⁰ investigó el uso de la cromatografía de fluidos supercríticos en columnas empaquetadas, utilizó una columna Zorbax Pro 10-60 CN para separar mezclas de α -tocoferol, las vitaminas D₂ y D₃. La separación se llevo a cabo con CO₂ y etanol al 12% como modificador a 13.8 Mpa y 313.15 K. Se obtuvieron purezas > 99% para la vitamina D₃ y 60 % de α -tocoferol. K. Nerurkar⁶¹ estudió la velocidad, resolución y selectividad de columnas empaquetadas como una técnica viable para la separación isobárica isotérmica de cuatro fármacos antigripales, pseudoefedrina, succinato de doxilamina, dextrometorfan y acetaminofen. Utilizó una columna Hypersil Ph (250x4.6 mm) 5 μ m. Los analitos fueron detectados con un detector UV a 220 nm. Este trabajo muestra la posibilidad de reemplazar la CLAR con CFS para la separación y análisis de fármacos de diferentes familias.

Se utilizó la ecuación cinética de primer orden para reacciones irreversibles para determinar la barrera de enantiomerización de algunos enantiómeros de la 3-hidroxi-1,4-benzodiazepina mediante la CFS. El loracepan, el oxacepan y el temacepan fueron separados por CFS en una columna quiral (R,R)-Whelk-01 con CO₂ supercrítico conteniendo metanol al 12.5% y dietilamina al 0.5% como fase móvil⁶².

Kenan Dost et al ⁶³ publicaron un método para la detección y cuantificación de las seis sulfonamidas principales con detección ultravioleta (UV) y espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica. Esta técnica mostró ser lineal en un intervalo de

concentración de 0.1 a 50 μ g/ml utilizando una corriente de ión total. El monitoreo de ión selectivo produjo límites de detección de: sulfadiazina 41, sulfametoxazol 45, sulfamerazina 47, sulfametizol 59, sulfametazina 181 y sulfadimetoxina 96 μ g/L, los cuales son mas bajos que las cantidades permitidas en los productos de leche. Este sistema tiene un alto grado de reproducibilidad. La técnica fue aplicada para determinar las sulfonamidas mencionadas anteriormente en leche. Carlo Bicchi et al⁶⁴ publicaron en el 2000 el análisis de ácidos valerianicos mediante la CFS en columna empaquetada utilizando detector UV. La separación fue optimizada variando las condiciones (columnas, tipos de modificadores etc.). Los resultados cualitativos y cuantitativos de la CFS empaquetada son comparables a la CLAR, pero los análisis son más rápidos con CFS que con CLAR. XJ Wang et al⁶⁵ reportaron la separación de seis fosfolípidos, fosfatidil colina (FC), fosfatidil-etanolamina (FE), fosfatidil-serina (FS), fosfatidil-inositol (FI), ácido fosfotídico (AF), liso-fosfatidil-colina (liso-FC), en lecitina de soya con CFS. Se utilizó una columna C18 y CO₂ modificado con etanol conteniendo trietilamina al 0.05% (v/v) como fase móvil. El análisis cuantitativo de la fosfatidil-colina ha sido realizado con un método estándar. La curva de calibración para la FC fue lineal en el intervalo comprendido entre 0.020 g/L y 0.075 g/L y el límite de detección fue de 0.2 microgramos. Este método ha sido aplicado al análisis de la FC en lecitina de soya.

J D Pinkston et al⁶⁶ publicaron un artículo comparando la cromatografía de fluidos supercríticos en columna empaquetada con detección con espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos con espectrometría de masas para la determinación bioanalítica de los enantiómeros (R)- y (S)- del ketoprofen (kt), un fármaco antiinflamatorio no esterooidal, en plasma sanguíneo. Los enantiómeros kt fueron separados en una columna

analítica Chirox 3005 utilizando condiciones isocráticas. Los datos de validación y el estudio de los datos de la muestra en pacientes a los que se les administró ketoprofen se realizó tanto por CFS en columna empaquetada como por CL para comparar y contrastar estos métodos analíticos. Se encontró que ambas técnicas tienen características comparables en cuanto a sensibilidad, exactitud, precisión, excepto en que la separación con CFS en columna empaquetada proporciona una reducción en tiempo de análisis. Se demostró un ahorro significativo en el tiempo de análisis para un gran número de muestras farmacocinéticas utilizando CFS con columna empaquetada.

C. Radcliffe et al⁶⁷ publicaron un artículo en el 2000 con aplicaciones de la extracción y la cromatografía de fluidos supercríticos en la ciencia forense. Las aplicaciones de estas dos técnicas en la ciencia forense han cobrado gran importancia. El área de su uso es la preparación de muestras y la separación de drogas de abuso, particularmente opiáceos, cannabinoides, cocaína y sedantes. La tecnología de fluidos supercríticos puede ser utilizada tanto para el análisis de drogas relacionado con el tiempo de muerte y para obtener información relacionada con el abuso de drogas por tiempo prolongado. Esta tecnología se está convirtiendo en una parte principal de las investigaciones forenses y en una técnica analítica invaluable.

9.4. APLICACIONES AMBIENTALES DE LA CFS

Debido a que los fluidos supercríticos tienen un poder solvente semejante al de los líquidos y propiedades de transferencia de masa comparables a las de los gases, la CFS es considerada como un puente entre la CG y la CL y posee muchas ventajas sobre la CG y la de líquidos como se resume en la tabla 3. Por ejemplo, la CFS puede separar compuestos no volátiles, termolábiles y de alto peso molecular en tiempos de análisis cortos. Otra

ventaja de la CFS es su compatibilidad con detectores tanto de la CG como de la CLAR. Debido a estas ventajas de la CFS hay un gran número de aplicaciones en análisis ambientales⁴².

El análisis de pesticidas y herbicidas ha sido hecho principalmente a través de la CG con detectores selectivos o por la CLAR con detección UV. Como se resume en la tabla 3, la CG está limitada a compuestos volátiles térmicamente estables, mientras que la CLAR con UV sólo puede detectar compuestos con cromóforos. Estas limitaciones tanto de la CG como de la CLAR llevaron al uso de la CFS en el análisis de pesticidas y herbicidas. Muchos detectores han sido utilizados para detectar pesticidas y herbicidas en CFS⁶⁸. Entre estos detectores, el detector de ionización de flama (FID) es más comúnmente utilizado para la detección de un amplio número de pesticidas y herbicidas, con un intervalo límite de detección desde 1 ppm (para el carbofurano) a 80 ppm (para herbicidas Karmex, Harmony, Glean y Oust). El detector UV ha sido utilizado frecuentemente para la detección de compuestos con cromóforos. La espectrometría de masas ha sido utilizada también en muchas aplicaciones como técnica de detección universal³⁶. Otros detectores utilizados para la detección de pesticidas y herbicidas incluyen detectores termoiónicos, infrarrojos, fotométricos y de emisión atómica. Se ha empleado una variedad de columnas tanto empaquetadas como tubulares abiertas para la separación de pesticidas y herbicidas. Las columnas fueron utilizadas tanto separadamente como unidas en serie para realizar mejores separaciones.

9.5. OTRAS APLICACIONES

Pierre A. Mourier et al⁶⁹ describieron en 1985 la separación de 5 pares enantioméricos de óxidos fosfinos. La fase estacionaria es una unión covalente de (R)-N-(3,5-dinitrobenzoil) fenilglicina en sílica gel aminopropil. La fase móvil que se utilizó fue CO₂, cuya polaridad

es cercana a la del hexano, con varios modificadores polares que consisten en alcoholes puros (MeOH, EtOH, 2-PrOH) o en mezclas de alcohol-agua 95:5 (v/v). La obtención de las separaciones es muy rápida (<2 min) y la resolución es muy alta.

En 1986 se publicó la separación de diversos oligómeros metilpolisiloxano cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 400 y 700 Da⁷⁰. El cromatograma fue obtenido utilizando una columna capilar de sílice fundida de 10 m x 100 μ m de diámetro interno y recubierta con una película de fenil polisiloxano al 5 % de 0.25 μ m de espesor. La fase móvil utilizada fue de CO₂ a 140 °C y se utilizó la siguiente programación de presión: 80 atmósferas durante 20 minutos, seguido de un gradiente lineal de 80 a 280 atmósferas a razón de 5 atm/min. Se utilizó un detector de ionización de llama.

En 1986 C.M. White⁷¹ separó hidrocarburos aromáticos policíclicos extraídos de carbón. La detección se llevó a cabo mediante fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes. El cromatograma fue obtenido utilizando una columna capilar de sílice fundida de 40 m x 50 μ m de diámetro interno y recubierta con una película de fenil polisiloxano al 50% y 0.25 μ m de espesor. La fase móvil utilizada fue pentano a 210 °C y seguido de la siguiente programación: la densidad inicial de la fase móvil se sitúa a 0.07 g/mL durante 24 minutos y después un programa de aumento asintótico de la densidad hasta llegar a 0.197 g/mL.

En 1987 R.D. Smith⁴⁶ separó los oligómeros de una muestra del tensoactivo no iónico Triton X 100. La detección implica la medida de la corriente iónica producida por ionización química en espectrometría de masas. La fase móvil fue CO₂ que contiene un 1% en volumen de metanol. La columna utilizada fue una columna capilar de 30 m que está recubierta con una película de 1 μ m de fenilpolisiloxano al 5%. La presión de la columna se aumentó linealmente a una velocidad de 2.5 bares/minuto.

TABLA 3. EJEMPLOS DE COMPUESTOS ANALIZADOS POR CFS Y CONDICIONES

ANALITO	COLUMNA	MODIFICA- DOR	DETECTOR	REFERENCIA
DIACETILBEN- CIDINA	NUCLEOSIL- RP-C18	METANOL 7.4% v/v	UV-VIS a 280 nm	PATEL, GAURI et al 2003 ⁵⁹
FARMACOS Y POLIMEROS DE BAJO PESO MOLECULAR	EMPAQUETA- DA (1-2 m)	NO ESPECIFICA- DO	NO ESPECIFICA- DO	PINKSTON, J.D. et al 2003 ⁷⁰
SURFACTAN- TES NO IONICOS	EMPAQUETA- DA	NO ESPECIFI- CADO	NO ESPECIFI- CADO	RUMBELOW et al 2003 ⁷³
α - TOCOFEROL, VITAMINA D2, VITAMINA D3	ZORBAX PRO 10-60 CN	-12% EN PESO DE ETANOL	NO ESPECIFICA- DO	BUSS, VESSE- LA. 2003 ⁶⁰
P- DICLOROBEN- CENO, TOLUE NO	SILICA GEL	NO ESPECIFICA- DO	NO ESPECIFICA- DO	YANG, X. et al 2003 ⁸⁰
PSEUDOEFE- DRINA, SUCCINATO DE DOXILAMINA, DXTROME- TORFAN, ACETAMINO- FEN	HYPERSIL PH (250 X 4.6 mm) 5 μ m	14.49 % v/v DE METANOL	UV a 220 nm	NERURKAR, K et al 2002 ⁶¹
ENANTIOME- ROS DEL 3- HIDROXI-1,4 BENZODIACE PINA	(R,R)- WHELK- 01	12.5 % DE META- NOL Y 0.5% DE DIETILAMINA	NO ESPECIFICA- DO	OSWALD, P. et al 2002 ⁶²
ACIDOS GRASOS EN ALIMENTOS	20 m X .05 mm, 0.2 μ m CP-SIL 5 CB	NO ESPECIFI- CADO	FID	STABY. 1993 ⁵⁸

ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS	10 mm X 250 mm KROMASIL 5-C18 KROMASIL 10-C18	NO ESPECIFICADO	UV DIODO	ALKIO et al 2000 ⁵⁵
ACIDOS GRASOS	C7 a C18	1% DE ACIDO FORMICO	FID	E. IBANEZ et al 1995 ⁸¹
COMPUESTOS POLIFENOLICOS	DOS COLUMNAS DIOL TANDEM	METANOL Y ACIDO CITRICO	UV	KAMANGERP OUR et al 2002 ⁸²
FOSFOLIPIDOS	C 18	ETANOL	NO ESPECIFICADO	WANG, X et al 2001 ⁶⁵
ACEITES DE SILICON	COLUMNAS CAPI LARES MICRO-EMPAQUETADAS	NO ESPECIFICADO	FID	CHMELIK, J. et al 2002 ⁸³

(R)- Y (S)- KETO-PROFEN	CHIREX 3005	NO ESPECIFICADO	NO ESPECIFICADO	HOKE, S. et al 2000 ⁶⁶
SULFONAMIDAS	EMPAQUETADA	NO ESPECIFICADO	UV	DOST, K. et al 2000 ⁶³
ACIDOS VALERIANICOS	EMPAQUETADA CN	METANOL:AGUA (95:5)	UV	BICCHI, C. et al 2000 ⁶⁴
COMPUESTOS QUIRALES	CHIROBIOTIC-T	METANOL DESDE 7 HASTA 67 % (v/v)	NO ESPECIFICADO	LIU, Y. et al 2002 ⁸⁴
ALQUILFENOLAS POLIETOXILADO	EMPAQUETADAS	NO ESPECIFICADO	UV	HOFFMAN, B. et al 2002 ⁸⁵
SULFADOXINA	NUCLEOSIL (250-4.6 mm)	METANOL AL 7.4 % v/v	UV	BHOIR., S.I. et al 2001 ⁸⁶

10. COMPARACIÓN DE LA CFS CON OTRAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Un importante campo de aplicación de la química analítica involucra el aislamiento, identificación y cuantificación de componentes en muestras complejas. La cromatografía es una de las técnicas más utilizadas, porque los métodos cromatográficos modernos tienen un excelente poder de separación, son versátiles y pueden ser utilizados con muchas técnicas de detección⁴². Durante las últimas dos décadas, las aplicaciones de los fluidos supercríticos (CFS y EFS) han mostrado un rápido avance: entre otros, desde una perspectiva histórica, la CFS se desarrolló después de que la CG quedó bien establecida y cuando comenzaba la CLAR. El interés por la CFS ha crecido con el desarrollo de la CG y la CLAR y las innovaciones tecnológicas que han ocurrido independientemente de las investigaciones sobre la CFS. Ésta se ha aplicado al análisis ambiental,⁷² alimentos, polímeros, investigación farmacéutica e industrial. Este proceso genera productos complejos que han sido analizados por diferentes medios cromatográficos, incluyendo la CFS. Considerando la complejidad de estas muestras, se requiere una técnica de alta resolución. Aún considerando que la CFS en columna empaquetada tiene algunas ventajas en ciertos casos,⁷³ las columnas capilares recubiertas con fases poliméricas presentan más eficiencia (N) por columna, siendo más adecuadas para muestras complejas. Como un ejemplo, en el análisis de productos naturales, la CFS ofrece perspectivas en el análisis de muchas clases de compuestos que presentan dificultades en la CL convencional o en la CG⁴². En esta área es muy común que los analitos no tengan grupos cromóforos, haciendo así difícil la detección a través de UV-Vis, el detector más popular para CLAR. Al mismo tiempo, muchos de ellos no son suficientemente volátiles para ser analizados por CG. En este caso, el uso de la CFS con columnas capilares y detección con FID es una herramienta valiosa.

Los esteroides, drogas de abuso, productos farmacéuticos,⁷⁴ compuestos agrícolas y ambientales⁷⁵ y los productos alimenticios son polares y/o no volátiles, de manera que la CG no puede aplicarse para el análisis de estas muestras sin la derivatización de los analitos². La CLAR ha sido una técnica muy popular para el análisis de compuestos polares, no volátiles y de alto peso molecular. Los métodos de CLAR tanto de fase invertida como de fase normal han sido ampliamente utilizados para el análisis de muestras tales como productos alimenticios, fármacos y pesticidas. Actualmente la CFS ofrece una atractiva alternativa para la separación de material volátil, no volátil y termolábil. Se ha demostrado que la gran difusividad y baja viscosidad proporcionadas por un fluido supercrítico comparadas con las de un líquido produce separaciones más rápidas y eficientes y las densidades semejantes a las de los líquidos permiten que muchos compuestos térmicamente inaccesibles sean solubilizados. Algunas ventajas específicas de la CFS sobre la CLAR incluyen la mayor resolución por unidad de tiempo, el menor tiempo de análisis total, el desarrollo de métodos mucho más rápidos e interfase más simple con cualquier detector. Varias clases de compuestos polares han sido analizadas tanto por columnas capilares como por columnas empaquetadas. El análisis rápido de muchas drogas de abuso se ha realizado en una columna empaquetada de diámetro interno de 2.1 mm utilizando CO₂ modificado con metanol como fase móvil⁷⁶. Derivados de oligo y polisacáridos que contienen más de 18 unidades de glucosa fueron analizados en una columna capilar y se asignó un grado de polimerización (GP) a los derivados del azúcar. Se utilizó una columna capilar de bifenil al 25% altamente desactivada para la elución de un antibiótico polar derivatizado. Columnas similares se utilizaron para el análisis de ácidos grasos, triglicéridos y lípidos. Se ha reportado la CFS con columna capilar para el análisis de surfactantes, polioles y alcaloides⁷⁷. Se separó una mezcla de fármaco antimalárico y

compuestos relacionados en una columna empaquetada utilizando ácido fórmico al 0.3% en CO₂ como fase móvil. Mezclas de esteroides, barbitúricos y tetrahidrocanabinol con sus metabolitos fueron analizados en columnas capilares. El análisis de muchos lípidos y esteroides ha sido reportado por muchos investigadores utilizando una fase móvil de N₂O bajo condiciones isoconférticas. Una columna capilar con n-hexano modificado con alcohol como fase móvil fue utilizada para separar mezclas de vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles utilizando espectrometría de masas para su detección⁷⁸. Se separó una mezcla de cinco pesticidas y herbicidas en una columna capilar con un detector UV multicanal obteniéndose un espectro UV completo para cada soluto (ver apéndice). Se ha aplicado exitosamente la espectrometría de masas al análisis con CFS de pesticidas porque provee límites de detección muy bajos y también conduce a la identificación positiva de los analitos. Las mezclas de carbamatos y pesticidas organofosforados han sido analizadas tanto por columnas empaquetadas como por columnas capilares y los espectros de masa se obtienen con límites en el intervalo de nanogramos⁶⁸. Se separó una mezcla de triterpenos que contienen un grupo funcional -COOH (ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido polpunónico). Estos compuestos son un buen ejemplo de la clase de compuestos que presentan actividad biológica y son difíciles de analizar por CG o por CLAR sin un paso de derivatización adicional. Takeshi Bamba et al.⁷⁹ describieron en 2001 las aplicaciones de la CFS al análisis de poliprenoles, la resolución cromatográfica de los homólogos poliprenol y sus isómeros geométricos se mejoró notablemente con el uso de la CFS. En comparación con la obtenida por el uso de la CLAR convencional. Se separaron bajo condiciones optimizadas de CFS, homólogos individuales de 10 mer a 100 mer. Fue también posible separar cada isómero geométrico de los homólogos poliprenol desde 13 mer hasta 20 mer utilizando CFS. Kenan Dost et al³⁶ publicaron una técnica analítica para

la determinación de pesticidas en suelo con CFS en columna empaquetada. La técnica provee un método versátil para la detección y cuantificación de pesticidas pertenecientes a las clases más comunmente utilizadas, triacinas (ametrina, atracina), carbamatos (carbofurán) y sulfonilureas (clorsulfurón, metsulfurón Me y benzsulfurón metil). La popularidad de la CFS en columna empaquetada se ha incrementado en la última década. La adición de un agente tal como el CO₂ produce muchas ventajas para las separaciones quirales. Por ejemplo, las velocidades de flujo más elevadas de la fase móvil pueden ser alcanzadas sin pérdida concomitante de la eficiencia cromatográfica desde el momento en que las velocidades óptimas son típicamente más elevadas en la CFS con columnas empaquetadas. La tabla 4 muestra una comparación de las características principales entre la CG, la CL y la CFS.

TABLA 4 COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CG, LA CFS Y CL

	CG	CFS	CL
Conveniencia para compuestos polares y termolábiles	Baja	Alta	Alta
Tamaño de molécula del analito	Pequeño-med.	Pequeño-grande	Pequeño-grande
Capacidad de muestra	Baja	Alta	Alta
Posibilidad de introducir selectividad en fase móvil	Baja	Alta	Mediana
Toxicidad de la fase móvil	No	No (con CO ₂) Baja(con modificador)	Alta
Eficiencia	Alta	Media-alta	Baja
Uso de detectores de fase gaseosa	Si	Si	No
Tiempo de análisis	Medio	Medio	Largo

11. RESÚMEN

La CFS no debe ser vista como competencia de la CG y la CLAR. La CFS es complementaria a esta dos técnicas analíticas de separación, y en cada caso debe decidirse que técnica utilizar. Debido a su posición intermedia, la CFS combina diversas ventajas tanto de la CG como de la CLAR. Una ventaja significativa de la CFS comparada a la CLAR es el hecho de que además de los detectores normalmente utilizados en CL (detector UV por ejemplo), los detectores selectivos para CG y universales (FID, detector de captura de electrones, por ejemplo) son aplicables si se utiliza CO₂ supercrítico como fase móvil. Además, en la CFS en columna empaquetada, se puede utilizar la misma variedad de fases estacionarias como en la CL con la ventaja adicional de que el tiempo de análisis es significativamente más corto⁸⁷. La CFS es superior a la CG si se deben separar solutos termolábiles. Sin embargo, esto es cierto si el fluido supercrítico tiene una temperatura crítica relativamente baja como el CO₂ (31⁰C), por ejemplo. La CFS también tiene sus desventajas; por ejemplo, sólo un número limitado de muestras son solubles en fluidos supercríticos. Por ejemplo, únicamente solutos relativamente no polares son solubles en CO₂ supercrítico. Generalmente, los solutos que son solubles en solventes orgánicos que tienen una polaridad menor o igual a la del n-heptano son usualmente también solubles en CO₂ supercrítico. Las muestras que son solubles en agua son insolubles en CO₂. Si la fuerza de elución de un fluido supercrítico no es suficiente, puede incrementarse agregando un modificador orgánico. De esta manera, especialmente en combinación con columnas

capilares, la aplicabilidad de la CFS se extiende a analitos más polares. El metanol es el modificador más comúnmente utilizado porque presenta la solubilidad más amplia para muestras que son insolubles en CO_2 . Si se requiere un aumento de selectividad se debe escoger un solvente menos polar. Aparentemente, el modificador tiene al menos dos efectos: primero, altera dramáticamente las propiedades solventes del fluido (usualmente incrementa la solubilidad de la muestra); segundo, bloquea sitios más activos de retención del empaque de la columna de manera que la fuerza de retención de un analito es reducida así como su tiempo de análisis. Aunque los modificadores tienen ventajas significativas, limitan la selección de detectores compatibles (por ejemplo el metanol como modificador interfiere en el FID). Mientras que en la CFS, concentraciones del modificador de 1 a 5% son usualmente suficientes, en la CFS capilar, concentraciones del modificador arriba del 20% pueden ser necesarias. Para la separación de muestras básicas o ácidas puede ser de ayuda un aditivo al modificador o fase móvil. Esto mejora la forma del pico y a menudo acorta considerablemente el tiempo de análisis. Un aditivo típico para muestras ácidas es el ácido trifluoroacético (TA) mientras que para muestras básicas, se utilizan a menudo aminas primarias. La función de un aditivo todavía no es clara, aunque parece homogeneizar la fase estacionaria (bloquea efectivamente grupos silanol), para mejorar la solubilidad del soluto en ambas fases, y para suprimir la ionización del soluto. Una desventaja de la CFS es el hecho de que aunque se usen los mismos detectores que en la CG, la sensibilidad del detector no es tan buena. En la CFS capilar, esto resulta de los volúmenes de muestra tan pequeños (10-250 n L) que deben ser inyectados en la columna. En el caso de las columnas empaquetadas, se pueden inyectar volúmenes de muestra más grandes pero la salida de columna que va hacia el detector de combustión (por ejemplo FID, NDP), debe ser dividida. Si no se aplica dicha división, las velocidades de flujo

extremadamente altas, producidas por la expansión del fluido supercrítico, tienden a extinguir la flama del detector de combustión.

Comparada con la CLAR, la CFS proporciona separaciones rápidas sin el uso de solventes orgánicos. Debido a que la CFS generalmente utiliza dióxido de carbono colectado como un subproducto de otras reacciones químicas o directamente de la atmósfera, esto ayuda a no aumentar el nivel de químicos en el ambiente. Además, las separaciones con CFS pueden ser más rápidas que con CLAR porque la difusión de los solutos en los fluidos supercríticos es alrededor de 10 veces mayor que en los líquidos. Esto resulta en una disminución en la resistencia a la transferencia de masa en la columna y permite separaciones rápidas de alta resolución. Comparada con la CG, la CFS capilar puede proveer una cromatografía de alta resolución a temperaturas más bajas. Esto permite análisis rápidos de compuestos termolábiles.

12. CONCLUSIONES

12.1 RESPECTO AL TRABAJO EN GENERAL

De acuerdo a los objetivos planteados inicialmente, en este trabajo se logró:

- A. Llevar a cabo una revisión bibliográfica, hemerográfica y en internet exhaustiva sobre la CFS.
- B. Hacer una reseña histórica del desarrollo de la CFS como técnica analítica, proporcionando al lector un breve compendio de lo que hasta ahora se ha hecho sobre la CFS, así como sus implicaciones y perspectivas.
- C. Describir los fundamentos de la técnica explicando qué es el estado supercrítico.
- D. Hacer un listado de las sustancias útiles como fluidos supercríticos y sus correspondientes parámetros críticos, mencionando en particular las características del dióxido de carbono como la fase móvil más utilizada.

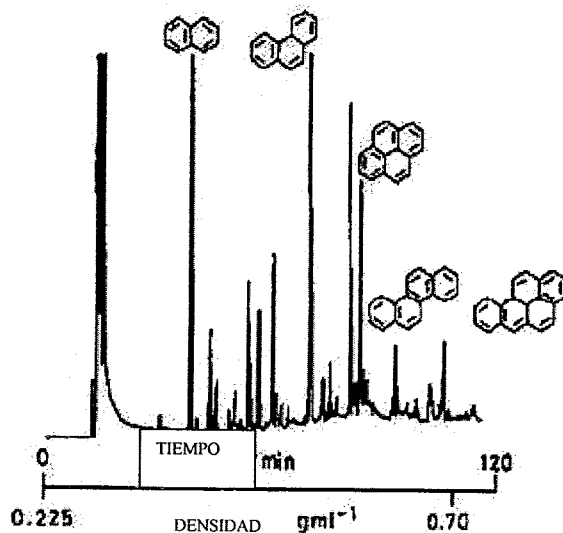
- E. Describir el equipo y las condiciones de trabajo para la CFS.
- F. Hacer una comparación de la CFS con respecto a otras técnicas analíticas, especialmente la CLAR, evidenciando sus ventajas.
- G. Definir las diferentes áreas en las que la CFS ha sido empleada como técnica analítica.

12.2 RESPECTO A LA CFS COMO TÉCNICA ANALÍTICA

- A. La CFS ha ido ganando popularidad en los últimos años como técnica analítica, como se evidencia con el creciente número de artículos publicados y la información encontrada en internet.
- B. De acuerdo a la búsqueda realizada, las principales áreas de aplicación son la farmacéutica, la ambiental y la alimenticia.
- C. La CFS puede ser considerada como una técnica analítica complementaria a la CLAR y a la cromatografía de gases.
- D. La CFS ofrece diversas ventajas que la hacen atractiva con respecto a otras técnicas como:
 - En algunos casos, es posible reducir los tiempos de análisis, logrando separaciones más rápidas y eficientes que con CLAR, debido a la alta difusividad y baja viscosidad de los fluidos supercríticos.
 - La interfase es más simple con cualquier detector.
 - Empleo de una menor cantidad de solventes orgánicos, con la consecuente repercusión en costos de análisis y en el cuidado del ambiente.

13. APENDICE

CFS- GRADIENTE DE PRESION



El cromatograma muestra la separación de cinco pesticidas y herbicidas habiendo empleado dióxido de carbono supercrítico como fase móvil y una columna capilar como fase estacionaria. Se utilizó un detector UV multicanal.

14. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ácido docosanoico: Ácido graso saturado que contiene una cadena de 22 átomos de carbonos que se encuentra como componente minoritario en aceites de cacahuete y de nabo silvestre.

Analito: Compuesto químico que se ha cuantificado y/o caracterizado en una muestra.

Atmósfera: Unidad de presión equivalente a la presión normal de nuestra atmósfera a nivel del mar.

Bomba: Las bombas utilizadas tanto en CLAR como en CFS impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde ahí hacia la columna.

Columna: Es el lugar donde ocurre la separación.

Columna empaquetada: Columna de cromatografía llena de partículas de fase estacionaria.

Columna tubular abierta: Columna capilar cuyas paredes están recubiertas de fase estacionaria.

Corrosión: Reacción química o electroquímica entre un metal y su medio ambiente.

Cromatografía: Es la técnica para separar los componentes o solutos de una mezcla sobre la base de las cantidades relativas de cada soluto, distribuidos entre un fluido que se mueve, llamado fase móvil, y una fase estacionaria adyacente. La fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

Cromatografía de afinidad: Técnica basada en la retención de un soluto en una columna en virtud de interacciones específicas con una molécula covalentemente unida a la fase estacionaria.

Cromatografía de fluidos supercríticos: Cromatografía que usa un fluido supercrítico como fase móvil. Es capaz de separaciones muy eficaces de solutos volátiles y no volátiles y se puede usar con detectores de gases o líquidos.

Cromatografía de gases: Forma de cromatografía cuya fase móvil es un gas.

Cromatografía de intercambio iónico: Técnica basada en la interacción de iones del soluto con los puntos cargados, con carga opuesta, que hay en la fase estacionaria.

Cromatografía de líquidos de alta resolución: Técnica cromatográfica que utiliza partículas muy pequeñas de fase estacionaria y una gran presión para forzar al disolvente a través de la columna.

Cromatografía en capa fina: Técnica basada en el uso de una fase estacionaria que recubre una placa de vidrio plano, de aluminio o de plástico. El soluto se deposita cerca de la base de la placa cuyo borde se pone en contacto con el disolvente y que sube por capilaridad.

Cromatograma: Es un gráfico en el que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución.

Cromóforos: Grupos funcionales que absorben radiación en la región del UV y/o visible.

Derivatización: Alteración química mediante la unión de un grupo a una molécula de modo que se pueda detectar convenientemente.

Densidad: Cantidad de materia contenida en un volumen determinado.

Detector: Es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en el tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Detector de ionización de llama: Detector de cromatografía de gases también utilizado en cromatografía de fluidos supercríticos basado en la combustión del soluto en una llama de hidrógeno/aire para producir iones CHO^+ . La corriente transportada a través de la llama por estos iones es proporcional a la concentración de especies susceptibles que se encuentran en el eluato.

Detector UV: Detector muy utilizado tanto en CLAR como en CFS. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo.

Eluato: Lo que sale de una columna cromatográfica.

Elución: Proceso por el cual se obliga a los componentes de la muestra a recorrer la columna.

Eluyente: Es la fase móvil usada para llevar a cabo la separación.

Enantiómero: Una de las dos imágenes de espejo formadas por una molécula activa.

Espectrometría de masas: Técnica que consiste en ionizar las moléculas gaseosas, acelerarlas en un campo eléctrico y luego separarlas de acuerdo con sus masas.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado.

Extracción: Es una técnica de separación que usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra.

Extracción con fluidos supercríticos: Extracción de compuestos normalmente a partir de sólidos, con un disolvente fluido supercrítico.

Factor de tiempo de retención (k): Es la relación de tiempo que invierte el soluto en las fases estacionaria y móvil.

Fase estacionaria: En cromatografía, la fase que no se mueve a través de la columna.

Fase móvil: Fase que atraviesa la columna.

Fluido supercrítico: Fluido por encima de su punto crítico.

Intercambio iónico: Tipo de separación cromatográfica donde la fase estacionaria es un intercambiador iónico (e.g. una resina de intercambio iónico).

inyector: Dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema.

Isocrático: Se dice del sistema en el que la composición de la fase móvil no cambia durante el análisis.

Menisco: Superficie libre curva de un líquido.

Métodos de análisis: Se basan en propiedades químicas del analito. Se incluyen las gravimétricas, las volumétricas y los métodos de análisis cualitativo clásicos.

Métodos de separación: Se incluyen en este grupo los métodos cuya finalidad es la separación de compuestos para eliminar interferencias y facilitar las medidas.

Modificador: Pequeña cantidad de un solvente orgánico que se agrega a un fluido supercrítico para cambiar sus propiedades de polaridad.

Molécula polar: Molécula en la que las cargas eléctricas no están distribuidas simétricamente; la carga positiva está separada de la carga negativa.

Partición: En cromatografía es la separación de componentes de una muestra por afinidad química o física en dos fases (fase móvil y estacionaria).

Polaridad de la fase móvil: Característica fisicoquímica del disolvente empleado como fase móvil, dada por la concentración de moléculas disociadas en iones con carga eléctrica y la electronegatividad de los mismos.

Presión: Fuerza por unidad de área, medida normalmente en pascales (N/m^2) o en atmósferas.

Precisión: Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie.

Resolución: Es una medida de la eficiencia que tiene la columna para separar dos compuestos.

Sensibilidad: Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito.

Septo: Disco normalmente hecho de goma de silicona que cubre la entrada del inyector de un cromatógrafo. La muestra se inyecta mediante una jeringa a través del septo.

Solubilidad: Concentración máxima de soluto en una solución a una temperatura dada.

Sustancias tóxicas: Cualquier sustancia que tiene la capacidad de dañar, alterar o interferir en el sistema metabólico de los seres vivos.

Tiempo de retención: Es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna.

Viscosidad: Fricción interna o resistencia al flujo de un fluido.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Harris, D.C. Michelson Laboratory. 2^o Ed. China Lake California. Editorial Reverte S.A. pp 628. 2001.
- (2) Frank Settle (Ed.), Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Volumen 1. pp 151-153, 185,192. 1997.
- (3) <http://www.supercriticalfluids.com> (2004)
- (4) R.M. Smith, Supercritical Fluids in separations science-the dreams, the reality and the future. J. of Chromatogr. A 856 (1999) 85-94
- (5) Cunico, Robert; M. Gooding, Kanen; Wehr, Tim. Basic HPLC and CE of Biomolecules. Bay Bioanalytical Laboratory. Richmond, CA. 1998
- (6) Cagniard de la Tour, C Ann. Chim (1822), 22 pp 4100
- (7) www.jascoinc.com (2004)
- (8) Banister J.A., Ph D Organometallic Reactions In Supercritical Fluids. Department of a Flow Reactor, pp 7
- (9) S.T. Sie, W. Van Beersum, G.W.A. Rijinders, sep. Sci.1 (1966) 459
- (10) J.C. Giddings, M.N. Myers, L. McLaren , R.A. Keller, Science 162 (1968) 67.
- (11) T.H. Jouw, R.E. Jentoft, J. Chromatogr. Chromatogr. Rev. 68 (1972) 303
- (12) G.M. Schneider, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17 (1978) 716
- (13) M. Novotny, S.R. Springston, P.A. Peaden, J.C. Fjeldted y M.L. Lee. Anal. Chem. 53: 407 A- 414 A (1981)
- (14) H. Gunzler, A. Williams (ed.) Handbook of Analytical Techniques. Volumen 1. 2001, pp 308-316
- (15) Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: thermodynamic definitions. Carrilho, Emanuel; Tavares, Maria Cecilia H; Lancas, Fernando M. Inst. Quim. Sao Carlos, Univ. de Sao Paulo, Sao Carlos, Brazil. Quimica Nova (2001), 24(4), 509-515
- (16) O'Leary K. Environmental Sampling & Monitoring Primer. 1997
- (17) D.A. Skoog, Principios de Analisis Instrumental. McGraw-Hill, 5^a ed., 2001, pp 730-31, 831-840

- (18) Supercritical fluids: their properties and applications. Sengers, J.M. Levelt. Physical and Chemical Properties Division, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA- NATO Sciences Series E: Applied Sciences (2000),366 (Sup. Fluids), 1-29
- (19) Department of Pharmaceutical Technology, Eberhard-karls- University, Tübingen, Germany. Pharmazie (2001), 56 (12), 907-926
- (20) Dixon, D.J. and Johnston, K.P., "Supercritical Fluids", In Encyclopedia of Separation Technology, Ruthven, D.M., Editor, John Wiley, 1997, 1544-1569
- (21) www.criticalprocesses.com (2004)
- (22) Chester, T.L., Parcher, J.F., Eds. American Unified Chromatography. ACS Symposium Series, 748; Chemical Society: Washington, D.C, 1999
- (23) www.nottingham.ac.uk/supercr/scacoust.htm (2003)
- (24) Cagniard de la Tour, C Ann. Chim (1822), 22 pp 410
- (25) www.chemsoc.com/chemytes/aireports/ail-MB06.htm (2003)
- (26) Chester, T.L.; Pinkston, J.D. Supercritical fluid and unified chromatography. Anal. Chem. 2000, 72, 129-135
- (27) Wells, P.S.; Zhou, S.; Parcher, J.F. Unified chrom. with CO₂- based binary mobile phases. Dep. Chem, Univ. Mississippi, University, MS, USA. Analytical Chemistry (2003), 75 (1), 18-24
- (28) Clifford, Anthony A.; Williams, John R. Introduction to supercritical fluids and their applications. School of Chemistry, University of Leeds, UK. Methods in Biotechnology (2000), 13 (Supercrit. Fluids), 1-16.
- (29) Vela, N.P.; Caruso, J.A. Element selective detection for supercritical fluid chromatography. Forensic Chemistry Center, US Food and Drug Administration, Cincinnati, OH, USA Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2000), 43 (1-3), 45-48
- (30) Tang, Ying; Zhou, Gong-wei; Shi, Jian. Application of chiral selectors in chromatographic analysis. Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, Peop. Rep. China. Fenxi Kexue Xuebao (2001), 17(4), 327-333.
- (31) Kotnik, Petra; Hadolin, Majda; Knez, Zeljko. Fak-za kim. Preparative supercritical chromatography. In Kem. Technology, Univ. v Mariboru, Maribor, Slovenia. Editor(s): Glavia, Peter; Brodnjak-Voncina, Darika. Zbornik Referatov s Posventovanja Slovenski Kemijski Dnevi, Maribor, Slovenia, Sept. 20-21, 2001 (2001), (Part 2), 666-671

- (32) Svensson, Lars A.; Owens, Paul K. Enantioselective supercritical fluid chromatography using Ristocetin A chiral stationary phases. Analytical Dev. AstraZeneca R&D Molndal, Moeindal, Swed. Analyst (Cambridge, United Kingdom) (2000), 125 (6), 1037-1039
- (33) Wenclawiak, B.; Otterbach, A. Carbon-based quantification of pyrethrin by supercritical fluid chromatography. Department of Analytical Chemistry, University of Siegen, Germany. Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2000), 43 (1-3), 197-207
- (34) Wang, Xuejun; Zhao, Suoqi; Wang, Renan Progress in preparative chromatography. State Key Lab. Of Heavy Oil Processing, Petroleum University, Changping, Beijing, Peop. Rep. China. Qingdao Daxue Xuebao, Gangcheng Jishuban (2001), 16 (4), 92-97
- (35) Zhong, Weik; Hao, Ji'n; Fan, Yaobo; Wang, Minjian. Development in pesticide residue analysis of food. Research Center for Eco-Environment Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, Peop. Rep. China. Fenxi Huaxue (2000), 28 (7), 904-910
- (36) Dost, Kenan; Jones, David C.; Davidson, George. Determination of pesticides in soil samples by supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. Sch. Chem., University of Nottingham, Nottingham, UK. Analyst (Cambridge, United Kingdom) (2000), 125(7), 1243-1247
- (37) Berger, Terry A.; Fogelman, Kimber D. Method for sample introduction for supercritical fluid chromatography systems. (Berger Instruments, Inc. USA). U.S. (2002), pp 9
- (38) A.F. Buskhe, B.E. Berg, O. Gyllenhaal, T. Greibrokk, HRC & CC. J. High Resolut. Chromatogr. 11 (1988) 16
- (39) M.L.Lee et al., J.Microcol. Sep. 1 (1989) 7
- (40) J.C. Moore, J.Polym. Sci. Part A2 (1964) 835
- (41) B.E.Richter: 1986 Pittsburgh Conference and Exposition on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy Atlantic City, N.J., March 10-14, 1986, paper 514
- (42) Cazes, Jack (ed.). Encyclopedia of Chromatography. Florida Atlantic University. Boca Raton, Florida. Marcel Dekker, Inc. 2001, pp 314-806
- (43) Turner, Charlotta; King, Jerry W.; Mathiasson, Lennart. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. Department of Analytical Chemistry, Lund University, Lund, Swed. Journal of Chrom. A (2001), 936 (1-2), 215-237

- (44) C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991. pp 601-643
- (45) X. Lou, H.-G. Janssen, H. Snijder, C.A. Cramers, *J. Chromatogr.* 718: 147 (1995)
- (46) R.M. Smith (ed.) *Supercritical Fluid Chromatography*, Royal Society of Chemistry, London, 1988.
- (47) S.C. Rutan, P.W. Carr, W.J. Cheong, J.H. Park, L.R. Snyder, 463: 21 (1989)
- (48) Bartle, K.D. and Clifford, T.A. Supercritical fluid extraction and chromatography of lipids and related compounds. In *Advances in Applied Lipid Research*, Vml. 1, pp 217-264 (edited by F.B. Padley, JAI Press, London) (1992)
- (49) Jochum, M.; Pieper, A.; Determination of omega-3 fatty acids in supplemented food samples. Engelhardt H. *Instrumentelle Analytik*, Universitat des Saarlandes, Saarbrucken, Germany. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (2001), 97 (8), 285-295
- (50) Christie WW (1989) *Gas Chromatography and Lipids*, The Oily Press, Dudee.
- (51) Blomberg, L.G. Demirbucker, M. And Andersson, M. Characterization of lipids by supercritical fluids chromatography and supercritical fluid extraction. In *Lipid Analysis in Oils and Fats*, pp 34-58
- (52) Senoranz, F.J.; Ibanez, E. Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography. Facultad de Ciencias, Tecnologia de Alimentos, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. *Analytica Chimica Acta* (2002), 465 (1-2), 131-144
- (53) K. Sakaki, *J. Chromatogr.* 648 (1993) 451
- (54) Borch-Jensen, C. And Mollerup, J. Analysis of natural products. A review of chromatographic techniques. *ACS Symposium Series*, 670, 154-170 (1997)
- (55) M. Alkio, C. Gonzalez, M. Jantti, O. Aaltonen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 315
- (56) A. Nomura, J. Yamada, K.-I. Tsunada, K. Sakaki, T. Yokochi, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2076
- (57) Hayes, D.G. Analysis of unusual triglycerides and lipids using supercritical fluid chromatography. In *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*, pp 163-182 (edited by R.E McDonald and M.M Mossoba, AOCS Press, Champaign) (1997)

- (58) A. Staby, C. Borch-Jensen, S. Balchen, J. Mollerup, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 355
- (59) Patel, Gauri; Agrawal, Y.K. Separation and trace estimation of benzidine and its macromolecular adducts using supercritical fluid chromatography. School of sciences, Department of Biochemistry, Gujarat University. *Journal of Chrom. B: Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences* (2003), 795 (2), 157-165
- (60) Buss, Vessela. Preparative supercritical fluid chromatography as an example of vitamin separation Aschaffenburg, Germany. *Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik* (2003), 778 i-xiii, 1-138
- (61) Nerurkar, K.; Dhorda, U.J.; Bhoir, I.C.; Sundaresan, M. C.B. Application of packed column supercritical fluid chromatography to the simultaneous determination of four component anti-cold multisymptomatic pharmaceutical dosage form. Patel Research Centre for Chemistry and Biological Sciences, Mumbai, India. *Indian Drugs* (2002), 39 (8), 410-414
- (62) Oswald, Peter; Desmet, Koen; Sandra, Pat; Krupcik Jan; Majek, Pavol; Armstrong, Daniel W. Determination of the enantiomerization energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical chromatography. Department of Analytical Chemistry, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia. *Journal of Chrom. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2002), 779 (2), 283-295
- (63) Dost, Kenan; Jones, David C.; Davidson, George. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. Sch. Chem., University of Nottingham, Nottingham, UK. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* (2000), 125 (7), 1243-1247
- (64) Bicchi, Carlo; Binello, Arianna; Rubiolo, Patrizia. Packed column SFC/UV versus HPLC/UV analysis of valerianic acids and valepotriates in extracts of *Valeriana officinalis* L. Dipartimento di scienza e Tecnologia del Farmaco, Turin, Italy. *Phytochemical Analysis* (2000), 11(3), 179-183
- (65) Wang Xue-jun; Zhao, Suo-qi; Wang, Ren-an. Analysis of soybean lecithin by supercritical fluid chromatography. State Key Laboratory of Heavy Oil Research, Petroleum University, Beijing, Peop.Rep. China. *Sepu* (2001), 19 (4), 344-346
- (66) Pinkston, J. David; Hoke, Steven H.; Bailey, Ruth E.; Tanguay, Suzanne L.; Eichhold, Thomas H. Comparison of packed-column supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for bioanalytical determination of (R) - and (S) - ketoprofen in human plasma following automated 96-well solid-phase extraction. Health Care Research Center, Procter & Gamble Company, Mason, OH, USA, *Analytical Chemistry* (2000), 72 (17), 4235- 4241

- (67) Radcliffe, C.; Maguire, K.; Lockwood, B. Application of supercritical fluid extraction and chromatography in forensic science. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Manchester, Greater Manchester, UK. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2000), 43 (1-3), 261-272
- (68) Tribaldo, Evaristo Ballesteros. Residue analysis of carbamate pesticides in water. Department of Physical and Analytical Chemistry, E.U.P. of Linares, University of Jaen, Jaen, Spain. *Food Science and Technology (NY)* (2000), 102 (Handbook of Water Analysis), 537-570
- (69) Mourier, Pierre A.; Eliot, Eric; Caude, Marcel H.; Rosset, Robert H.; Tambute, Andre G. Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers. *Lab. Chim. Anal. Ec. Super. Phys. Chim. Paris, Paris, Fr. Analytical Chemistry* (1985), 57 (14) 2819-23
- (70) Pinkston, J. David; Mangels, Michele L. SFC/MS in the worlds of pharmaceuticals and low-molecular-weight polymers. The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA. Abstracts of papers, 226th ACS National Meeting, New York, NY, United States, September 7-11, 2003 (2003)
- (71) C.M. White (Ed.), *Modern Supercritical Fluid Chromatography*, Huthing, Heidelberg, 1988, p. Vi
- (72) Tao, Xiao-gong; Mei, Cheng-xiao Wang, Ting. Application research of supercritical fluid in environmental protection. Lin'an, Zhejiang, Peop. Rep. China. *Huangong Kuangwu Yu Jiagong* (2003), 32(4), 33-37
- (73) Rumbelow, Stephen J.; Pinkston, J. David; Hoffman, Brian J.; Taylor, Larry T. Developments in applying packed column supercritical fluid chromatography for surfactant analysis. Technical Center, Uniqema, New Castle, DE, USA. Abstracts of papers, 226th ACS National Meetings, New York, N.Y., United States, September 7-11, 2003.
- (74) Bonoshito, Masao. Application of SFC to drug analysis and food component analysis: Dept. of Development, Nippon Bunko K.K., Japan. Editor(s): Arai, Yasushito, Chorinkai Ryutai no Subete (2002), 447-50
- (75) Bonoshita, Masao. Application of SFC for environmental analysis and environmental contamination related component analysis. Dept. of Development, Nippon Bunko K.K., Japan. Editor(s): Arai, Yasushiko, Chorinkai Ryutai no Subete (2002), 444-46
- (76) Kaiser, C.S.; Rompp, H.; Schmidt, P.C. Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. Department of Pharmaceutical Technology, Eberhard-Karls-University, Tubingen, Germany. *Pharmazie* (2001), 56 (12), 907-926

(77) Beesley, T.E.; Lee, J.T. Updates in the technology and application of chiral stationary phases. *Advanced Separation Technologies*, Whippany, NJ, USA. 2003

(78) R.D. Smith, B.W. Wright and C.R. Yonker, *Anal. Chem.*, 60 (1988), 1323 A.

(79) Bamba, Takeshi; Fukusaki, Ei-ichiro; Nakazawa, Yoshihisa; Sato, Hiroaki; Ute, Koichi; Kitayama, Tatsuki; Kobayashi, Akio. Analysis of polyprenols by supercritical fluid chromatography. Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Yumadaoka, Suita, Osaka, Japan. *Kobunshi Ronbunshu* (2001), 58 (12), 642-649

(80) Yang, Xiaoning; Mathews, Michael A. Equilibrium and kinetics properties of p-dichlorobenzene and toluene on silica gel in dense CO₂ by chromatography analysis. College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Peop. Rep. China. *Chemical Engineering Journal (Amsterdam, Netherlands)* (2003), 93 (2), 163-172

(81) E. Ibanez, W. Li, A. Malik, M.L. Lee, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 559

(82) Kamangerpour, A.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L.T.; McNair, H.M.; Chorida, L. Supercritical fluid chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract. Department of Chemistry, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. *Chromatographia* (2002), 55 (7/8), 417-421

(83) Planeta, Joseph; Rehulka, Pavel; Chmelik, Joseph. Sample deposition device for off-line combination of supercritical fluid chromatography and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Rep. *Analytical Chemistry* (2002), 74 (15), 3911-3914

(84) Liu, Ying; Berthod, Alain; Mitchel, Clifford R.; Xiao, Tom Ling; Zhang, Bo; Armstrong, Daniel. Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases. Iowa State University, Department of Chemistry, Ames, IA, USA. *Journal of Chromatography, A* (2002), 978 (1-2), 185-204

(85) Hoffman, Brian J.; Taylor, Larry T. A study of polyethoxylated alkylphenols by packed column supercritical fluid chromatography. Department of Chemistry, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. *Journal of Chromatographic Science* (2002), 40 (2), 61-68

(86) Bhoir, S.I.; Bhoir, I.C.; Bhagwat, A.M.; Sundaresan, M. C.B. Determination of sulfadoxine in human blood plasma using packed-column supercritical fluid chromatography. Patel Research Centre for Chemistry and Biological Sciences, Mumbai, India. *Journal of Chromatography, B; Biomedical Sciences and Applications* (2001), 757 (1), 39-47

(87) Stevens, Joan M.; Hamstra, Ala. General SFC method: Conquering the requirements. Technical Support, Gilson, Inc., Middleton, WI, USA. *Abstracts of Papers-American Chemical Society* (2000), 220th ANYL-021