



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**DESARROLLO INSTRUMENTAL DE UN SISTEMA DE  
CROMATOGRFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

CRISTÓBAL RAFAEL CAICEDO MEDINA



TUTOR: M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO  
AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

Lista de símbolos	iv
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	ix
1. Generalidades de la Cromatografía de Fluidos Supercríticos	1
1.1 El dominio de la CFS	4
1.2 Instrumentación básica	6
2. Objetivos	7
3. Antecedente de la CFS	8
4. Fundamentos Teóricos de la CFS	49
4.1 Propiedades de los fluidos supercríticos	49
4.2 Cromatografía con fluidos supercríticos	61
5. Metodología	74
5.1 Tipo de estudio	74
5.2 Parte Experimental	74
5.2.1 Materiales y Equipos	74

5.2.2 Montaje del sistema de Cromatografía de Fluidos supercríticos	75
5.2.3 Evaluación del sistema de CFS con columnas empacadas	76
5.2.4 Evaluación del sistema de CFS con columnas capilares	77
5.2.5 Preparación de columnas capilares.	79
6. Resultados y Discusión.	83
7. Conclusiones	118
8. Bibliografía	121

## LISTA DE SIMBOLOS UTILIZADOS

Atm.	Atmosfera (s).
CCF	Cromatografía de capa fina.
CFS	Cromatografía de Fluidos Supercríticos.
CG	Cromatografía de Gases, cromatografo de gases.
CLAR, HPLC	Cromatografía de Líquidos de alta resolución.
CL	Cromatografía de líquidos. Cromatógrafo de líquidos.
d.e.	diámetro externo.
d.i.	diámetro interno
dp	diámetro de partícula.
Dm	coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil.
Ds	coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.
DFI	inyección directa del fluido.
DILL, FID	Detector de Ionización de llama.
DLI	Introducción directa del líquido
EFS, SFE	Extracción con fluido supercríticos.
EM, MS	Espectrometría de Masas, espectrómetro de masas.
EMTF, MSFT	Espectrometría de Masas con transformada de Fourier
FIA	Indicador de Absorción de Fluorescencia.
H	Altura equivalente de un plano teórico.

HAPN	Hidrocarburos aromáticos polinucleares.
HFR	Alta velocidad de flujo.
HP	Hewlett Packard.
IIE	Ionización de impacto electrónico.
IQ	ionización química.
IRTF	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.
K'	Factor de Capacidad.
LS	Detector de Dispersión de la luz.
ng	nanogramos.
N	Número de platos teóricos.
NPD	Detector de Fosforo y Nitrógeno.
p-p	presión programada.
ppb	partes por billón.
ppm	partes por millón
psi	libras por pulgadas cuadradas.
P	Presión.
P. eb.	Punto de ebullición.
Pc	presión critica.
PTFE	politetrafluoroetileno.
RMN	resonancia magnética nuclear.

SIMDIS	Destilación simulada.
$t_0$	tiempo muerto.
T	Temperatura.
$T_c$	Temperatura crítica.
u	velocidad lineal de la fase móvil.
$u_{op}$	velocidad óptima del flujo de fase móvil
UV	Ultravioleta.
$\alpha$	Selectividad
$\eta$	viscosidad.
$\mu\text{L}$	microlitros.
$\mu\text{m}$	micrómetros.
$\rho$	densidad.
$\rho_c$	densidad crítica.

## **RESUMEN**

Aunque hace más de cuatro décadas aparecieron los primeros informes sobre Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFS), las aplicaciones más exitosas de la técnica se han logrado en las dos últimas décadas. Las limitaciones tecnológicas que impidieron inicialmente la evolución de la CFS fueron superadas por el desarrollo instrumental Cromatografía de Líquidos (CLAR), la tecnología de las columnas capilares y el desarrollo de los métodos acoplados. Así en los últimos años ha aumentado notablemente el número de publicaciones relacionadas con la CFS y han aparecido diversos equipos comerciales en el mercado. La CFS con CO<sub>2</sub> como fase móvil es una técnica que permite separaciones de solutos de alto peso molecular o con baja estabilidad térmica en tiempos cortos de análisis y puede acoplarse a diversos detectores tanto de cromatografía de gases, CG, como de CLAR.

En el trabajo se realizó el montaje experimental de un sistema de CFS, acoplando una bomba tipo jeringa a un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama y se evaluaron parámetros cromatográficos con una columna microempacadas y columnas capilares preparadas en el laboratorio, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico con fase móvil. Se estudiaron los efectos de la presión y temperatura sobre la retención eficiencia y selectividad en la primera y la posibilidad de separación de parafinas de C<sub>20</sub> – C<sub>50</sub> a presión programada, en la segunda, con velocidad de compresión constante. También se diseñaron divisores de flujo a la entrada y restrictores a la salida de las columnas con tubos de sílice fundida de 5–13 µm de diámetro interno. El sistema funcionó bien con las columnas microempacadas y capilares, pero fue difícil el control del flujo y de la presión con las columnas empacadas de diámetro interno grande (1-4 mm). La programación de presión si bien era casi lineal con el flujo, no fue reproducible. El sistema de enfriamiento permitió una gran economía de disolvente.



## **ABSTRACT**

Although the first paper related to Supercritical Fluid Chromatography (SFC) appeared in the early sixties, the more successful applications were in the two last decades. It was due to the new developments in the area of HPLC, capillary columns and hyphenated methods, which outpassed the initial limitations. This has given course to an increasing number of papers related to SFC, and the advancement of the many commercial equipments. The SFC using CO<sub>2</sub> as a mobile phase offers many advantages, because it allows for the separations of heavy thermolabile molecules easily in a short time, using several HPLC and GC detectors.

The experimental design consisted in a syringe pump connected to a gas chromatograph with a flame ionization detector and it was tested with home-made micropacked and capillary columns, using a supercritical CO<sub>2</sub> as a mobile phase. The effects of pressure and temperature on the retention, efficiency and selectivity was studied with the micropacked column; the factibility of separation parafines C<sub>20</sub>-C<sub>50</sub> using programmed pressure was studied at a constant compression velocity with the capillary column; the results gave a better resolution using the slowest programmed pressure velocity. Splitters at the entrance to and restrictors at the end of the columns were designed with fused silica capillary tubing having a small internal diameter (5-13 μm). The system had a good performance with micropacked and capillary columns, but it was very difficult to control the flow and the pressure through the columns with larger inner diameter (1-4 mm); the design and construction of restrictors was a very difficult task. The programmed pressure was nearly lineal to the flow but it was not reproducible. The cooling system allowed for econommy in the use of the solvent.

## INTRODUCCION

La cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) es una técnica de separación relativamente nueva, que ha tenido un vertiginoso desarrollo en las últimas décadas. Aunque los fluidos supercríticos han sido investigados desde el siglo antepasado y las primeras ideas sobre su uso como fase móvil en cromatografía fueron planteadas en un simposio internacional sobre cromatografía de gases en 1958, fue solo en 1962 cuando Klesper, Corwin y Turner<sup>1</sup> publicaron resultados experimentales del uso de diclorodifluorometano y monoclorodifluorometano supercríticos, como fases móviles, en la separación de isómeros de etioporfirinas de níquel.

A pesar de que se desarrollaron varios trabajos sobre la CFS, el interés de los investigadores por esta técnica disminuyó debido a las limitaciones instrumentales que presentaba, así como también al rápido crecimiento y desarrollo tecnológico de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y de la cromatografía de gases (CG) capilar; avances que hoy en día son compartidos con la CFS, lo que la hace aparecer como una técnica híbrida.

El primer trabajo sobre CFS capilar apareció en 1981, desarrollado por Novotny y colaboradores<sup>2</sup> en la separación de una mezcla de hidrocarburos aromáticos usando n-pentano en condición supercrítica como fase móvil. La rapidez y la eficiencia demostrada despertaron nuevamente el interés por la CFS. A partir de este momento el uso de columnas capilares de sílice fundida de tubo abierto y microempacadas ha sido amplio en CFS. Igualmente se han diversificados los sistemas de detección, así como el uso de la fase móvil.

La década del 80 fue una década de pleno auge, de un exitoso desarrollo de la CFS; eso es apreciable por el crecimiento casi exponencial de la literatura al respecto y por el interés comercial en la técnica. Ha sido aplicada a la solución de

un gran número de problemas de separación y aparecieron los primeros equipos comerciales. Además hubo reconocimiento oficial de la técnica en los Estados Unidos por la oficina de marcas y patentes<sup>3</sup>.

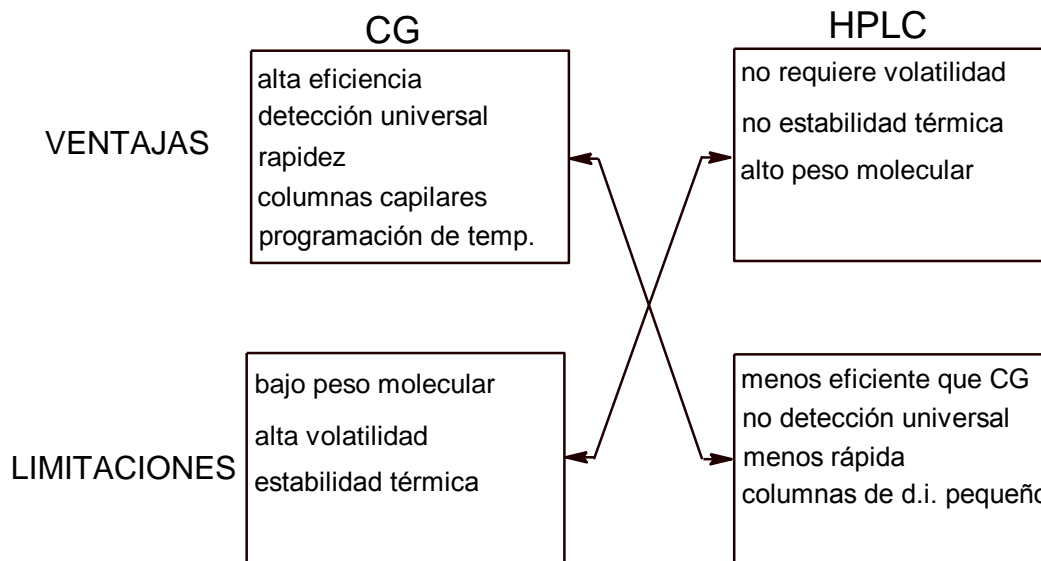
Hoy en día la CFS ha tenido un gran desarrollo, ha logrado vencer las limitaciones instrumentales inicialmente existentes que la hacían depender casi totalmente de la CG y de la HPLC y por tanto ha superado el escepticismo inicialmente existente sobre ella. Su aplicación a una gran variedad de muestras en diferentes campos de actividad química: industrial, farmacéutico, alimentos, síntesis químicas, etc; el desarrollo de fases estacionarias quirales para la separación de mezclas racémicas; el desarrollo de métodos acoplados a diferentes sistemas de detección como el espectrométrico de masa; la disponibilidad de numerosos equipos comerciales en el mercado y su uso como una técnica cromatográfica verde cuando se utiliza con CO<sub>2</sub>, amigable con el ambiente, hacen de la CFS una técnica confiable y segura, capaz de resolver aquellos problemas de separación que no pueden resolverse por aplicación de la CG y HPLC.

El presente trabajo tiene como propósito, acoplar la instrumentación disponible para la construcción de un sistema de CFS. En el montaje del sistema se diseñaron los divisores de flujo del sistema de inyección y los restrictores de flujo en el acople entre la columna y el detector. Se evaluó la eficiencia de las columnas capilares empacadas con sílice de 5 µm y de las columnas capilares de tubo abierto recubiertas con SE-54 por el método estático. Se evaluó la respuesta del Detector de ionización de llama (DILL) y se estudió el efecto de la presión y temperatura sobre la retención y selectividad de algunos solutos. La fase móvil empleada fue CO<sub>2</sub> en condición supercrítica.

## **1. GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.**

La Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFS) es una técnica híbrida que combina elementos teóricos e instrumentales de la Cromatografía de Gases (CG) y de Líquidos (HPLC). La aplicación de la CG presenta limitaciones cuando los componentes de las mezclas por separar presentan escasa volatilidad o baja estabilidad térmica, mientras que la HPLC (CLAR) se corre a temperatura ambiente o moderadamente elevada, no presenta problemas significativos con la estabilidad térmica y la volatilidad no es necesaria porque el transporte de masa se produce en fase líquida. Por otro lado, el sistema de detección en HPLC presenta problemas debido a la ausencia de un detector universal, sensible, simple y compatible con las fases móviles orgánicas o mezcladas usadas; algunos detectores como el de índice de refracción son universales pero poco sensibles. Por el contrario, la CG utiliza sistemas de detección universal como el Detector de Conductividad Térmica, TCD y el Detector de Ionización de Llama, FID. Además, la sensibilidad de la detección en HPLC requiere que en el soluto se encuentren grupos funcionales especiales; los detectores de absorción UV y de fluorescencia son muy usados y ello requiere la presencia de grupos cromóforos o fluoróforos en el soluto.

La HPLC es un complemento casi ideal de la CG, sin embargo, además de la detección, otra limitación es la eficiencia. La eficiencia de las columnas de HPLC es mayor que la de las columnas de CG, sin embargo en el análisis de mezclas complejas, la HPLC con columnas empacadas no es tan eficiente como la CG con columnas capilares de alta eficiencia. (fig. 1)



**Figura 1.** Ventajas y limitaciones comparativas de CG y HPLC

Cuando la CG y la HPLC no pueden resolver los problemas debido a las características de la muestra o a los sistemas de detección o a la eficiencia de la separación, puede utilizarse la técnica de la CFS, ya que ella permite combinar bajas temperaturas y fase móvil solvatante, alta eficiencia y detección universal. Sin embargo la CFS no pretende sustituir a la CG ni a la CLAR, por el contrario, surge como una técnica complementaria y como alternativa en aquellas situaciones en las que ellas no pueden actuar.

Con respecto a la eficiencia de la columna, es evidente que no hay superioridad de una fase móvil sobre otra. Una columna capilar de película delgada producirá aproximadamente la misma eficiencia con un gas, fluido supercrítico o líquido como fase móvil, si cada uno es usado a su velocidad óptima<sup>4</sup>. La velocidad óptima ( $U_{op}$ ) depende directamente del coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil ( $D_m$ ) y del diámetro interno de la columna (d.i.).

$$u_{op} = 4.2 \frac{D_m}{d.i.} \quad (1)$$

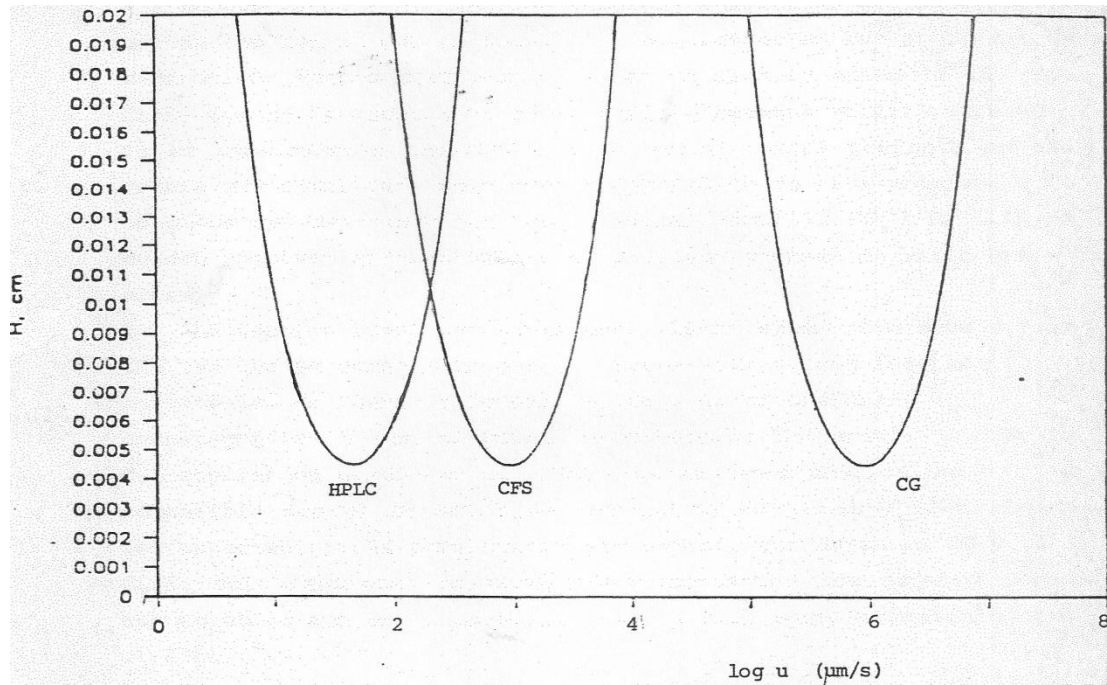
Las fases móviles gaseosas tienen un coeficiente de difusión relativamente alto y por lo tanto sus velocidades óptimas son un poco mayores (relativamente más rápidas). Los fluidos supercríticos y los líquidos tienen coeficientes de difusión menores y correspondientemente velocidades óptimas menores, es decir son más lentos. Cuando comparamos tiempos de análisis en una columna con las fases móviles capaces de eludir al soluto de interés, el tiempo de análisis varía según:

$$(mas\ rápido)CG < CFS < HPLC(mas\ lento)$$

Lo cual es evidente en la fig. 2.

Una comparación más práctica resulta cuando se fija un límite máximo en el tiempo de análisis. La fase móvil deberá tener alguna velocidad mínima a través de la columna que le permita mantenerse en el límite fijado del tiempo de análisis. Una fase móvil gaseosa podrá ser usada cerca de su velocidad óptima; pero un fluido supercrítico requerirá desplazarse algo más rápidamente que su velocidad óptima para mantener el mismo tiempo de análisis; de la misma forma, una fase móvil líquida necesitará viajar a una velocidad por encima de su velocidad óptima. Como la eficiencia de la columna se pierde cuando la velocidad de la fase móvil excede a su velocidad óptima, para una columna dada, tenemos que la eficiencia será:

$$(mas\ eficiente)CG > CFS > HPLC(menos\ eficiente)$$



**Figura 2.** Altura de plato,  $H$  vs.  $\log$  velocidad lineal de fase móvil,  $u$ , para una columna de  $50 \mu\text{m}$  de d.i. con líquido, fluido supercrítico y gas como fase móvil ( $D_m = 5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-1} \text{ cm}^2/\text{s}$  respectivamente).

En CFS se requieren columnas de diámetros pequeños (con altas velocidades óptimas) para mantener tiempos de análisis comparables con la CG. Son comunes los diámetros internos de  $50 \mu\text{m}$  y se usan siempre a velocidades algo superiores a la óptima. No es común HPLC con columnas de tubo abierto debido a que el tiempo de análisis sería excesivamente grande.

### 1.1 El dominio de la CFS

Aunque la CG y la HPLC son técnicas analíticas que se complementan, ellas no logran cubrir todas las necesidades de los problemas de separación; muchos de ellos caen en ese espacio vacío de las limitaciones, entre la CG y la HPLC, como lo muestra la figura 1. Cuando la muestra no es lo

suficientemente volátil para aplicar CG (o es térmicamente inestable) y el soluto está presente en una mezcla muy complicada requiriendo separación de alta eficiencia (o no puede ser detectado en fase líquida), aquí ni la CG, ni la HPLC pueden resolver eficientemente el problema, generándose ese vacío.

La técnica ideal necesaria para cubrir esas limitaciones es la CFS, ya que se desarrolla a bajas temperaturas, con fase móvil solvatante, de fuerza o potencial de separación programable, de alta eficiencia cromatográfica y con sistemas de detección universal. Cuando la CFS capilar es usada con  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  u otras fases móviles, es compatible con el detector de ionización de llama, FID y tiene todas las características para cubrir ese espacio que dejan la CG y la HPLC; solo requiere como condición importante que los solutos sean solubles, aun mínimamente, en la fase móvil compatible con el FID.

Algunos parámetros como el coeficiente de difusión, la densidad y la viscosidad del disolvente o fase móvil, pueden ser controlados durante una separación. El parámetro más utilizado en CFS es el de la presión programada y el potencial ganado es análogo al de temperatura programada en CG y al de gradiente de elución en HPLC. La densidad da al fluido supercrítico la capacidad de solubilizar la muestra de tal forma que el transporte de masa en la fase móvil pueda realizarse sin necesidad de volatizarla.

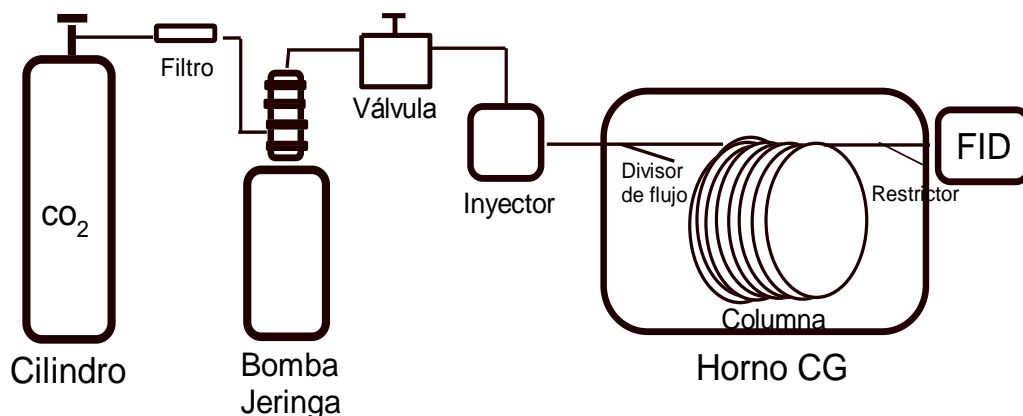
La viscosidad permite el uso de velocidades de flujo razonables sin que se produzcan altas caídas de presión. Como resultado de la viscosidad se producen altos coeficientes de difusión de la muestra, los cuales permiten el uso de velocidades de flujo rápidas o altas, debido a que el equilibrio a través de la columna es rápido.



## 1.2 instrumentación básica.

El principal problema de la CFS ha sido precisamente la instrumentación; problema que se ha ido resolviendo debido a que, por una parte se utiliza la instrumentación disponible para CG y HPLC y por otra parte se están produciendo actualmente, cromatógrafos de fluidos supercríticos con todos los avances tecnológicos e instrumentales disponibles.

De manera general, la instrumentación básica de un sistema de Cromatografía de Fluidos Supercríticos consta de un depósito o reserva de fase móvil (tanque de CO<sub>2</sub> por ejemplo), una bomba de alta presión que permite a la fase móvil alcanzar las condiciones supercríticas y que la impulsa a través del sistema, un sistema de inyección, la columna cromatográfica; el horno, el restrictor de flujo a la salida de la columna para mantener presurizado el sistema, el detector y el registrador. El equipo básico es similar al de CG con la excepción de la bomba impulsora del fluido supercrítico y del restrictor a la salida de la columna. La Figura 3 representa el esquema de la instrumentación básica para la CFS capilar, con un detector de ionización de llama, FID,



**Figura 3.** Esquema de un sistema de Cromatografía de Fluidos Supercríticos con detección FID.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1 OBJETIVOS GENERAL.**

Diseñar, construir y experimentar un sistema de Cromatografía de Fluidos Supercríticos, CFS.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Acoplar la instrumentación disponible para construir un sistema de CFS.
- Evaluar el sistema de CFS construido en la separación de mezclas de hidrocarburos, utilizando CO<sub>2</sub> a condiciones supercríticas como fase móvil y detección de ionización de llama, FID.
- Evaluar la eficiencia de las columnas empacadas de HPLC en el sistema de CFS construido.
- Evaluar la eficiencia de las columnas capilares, de tubo abierto, recubiertas con SE.54.
- Evaluar la eficiencia de las columnas capilares empacadas con sílice de 5 µm.
- Recubrir una columna capilar con SE-54 por el método estático
- Diseñar los divisores de flujo del sistema de inyección.
- Diseñar los restrictores de flujo en el sistema de detección.
- Estudiar el efecto de la presión y de la temperatura sobre la retención de algunos solutos.
- Evaluar la respuesta del detector de ionización de llama FID, en el sistema de CFS.

### 3. ANTECEDENTES DE LA CFS

Las primeras ideas sobre CFS fueron planteadas en un Simposio Internacional sobre CG en 1958. Lovelock uno de los pioneros investigadores en CG sugirió el uso de una fase móvil en condiciones supercríticas<sup>7</sup>. En 1961 Klesper y otros<sup>1</sup> publicaron resultados experimentales del uso de diclorodifluorometano ( $T_c = 112^\circ\text{C}$ ) y monoclorodifluorometano ( $T_c = 96^\circ\text{C}$ ) en la separación de etioporfirinas de níquel a una presión por encima de las 1000 psi para el primer gas y de 1400 psi para el segundo. Se utilizó una columna de vidrio de 30 pulgadas de longitud empacada con carbowax 20M sobre chromosorb W, 60/80 como soporte inerte.

El trabajo de Klesper fue seguido con mayor profundidad por Rijnders y Sie en lo que denominaron Cromatografía de Gases Densos<sup>8</sup>. Rijnders y Sie estudiaron los efectos de la presión sobre los coeficientes de partición y la eficiencia de la columna en cromatografía gas-liquido; para ello utilizaron básicamente columnas de 1m de longitud, de d.i. variable ( 3-6 mm), varias fases estacionarias (escualeno, PEG 6000, apiezon L) sobre Sil-o-cel 100/120; como fase móvil utilizaron  $\text{CO}_2$  a  $40^\circ\text{C}$  y 78 atm. y un detector UV. El Tolueno , p-xileno y cis-decalina fueron separados en 130 min, y el tolueno n-octano, cumeno y sec-butylbenceno en 60 min. También utilizaron n-pentano e isopropanol, como fase móviles. Gidding y colaboradores<sup>9,10,11,12</sup> estudiaron la influencia de algunos parámetros como la presión y su control en las separaciones de componentes no-volátiles, la baja viscosidad y alta difusividad de los gases “densos” sobre la velocidad de la separación y la sensibilidad y precisión en la detección. Ellos mostraron los resultados experimentales de migración de algunos polímeros y biomoléculas a presiones de 2000 atm conseguidas con bombas para líquidos, usando columnas de d.i. pequeño (0.5 mm) y un compresor para alcanzar

velocidades lineales de 10 cm por seg. Como fases móviles se utilizaron CO<sub>2</sub> a 40°C y 70-2000 atm y amoníaco a 140°C y 100-340 atm. La detección fue realizada utilizando una unidad de detección de llama. Giddings llama a este tipo de separaciones cromatografía de Gases de Alta Presión.

A comienzos de la década del 70, Jentoft y Gouw<sup>13,14</sup> realizaron una importante revisión sobre CFS, estudiando la influencia de algunos parámetros de la columna en la eficiencia de las separaciones y propusieron el empleo de la presión programada, por medio de las bombas usadas para HPLC y el uso de capilares como descompresores, antes de que el fluido llegue al sistema de detección. Posteriormente los mismos Jentoft y Gouw<sup>15</sup> aplicaron la CFS al análisis práctico de mezclas constituyentes del gas de escape de los automóviles, aislándose diferentes hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPNs) tales como benzo(a)pirenos y benzo(a)antracenos de una matriz predominantemente de HAPNs. Las columnas fueron de acero inoxidable de 3.5 m x 0.21 cm de d.i. empacadas con permaphase-ETH de fase inversa. La fase móvil fue CO<sub>2</sub> a presiones entre 1500 y 3000 psi y temperatura promedio fue de 35°C; como sistema de detección emplearon un espectrofotómetro UV y contador de centelleo, ya que usaron tritio como estándar interno. En 1978 Klesper<sup>16</sup> describe los avances más recientes en CFS y propone la construcción de un equipo capaz de mantener una velocidad de flujo constante, mientras la presión en el sistema es programado progresivamente. Usando este aparato fueron separados 42 oligómeros de muestras de poliestireno de peso molecular de 2200 en un periodo de 18 horas aproximadamente. Se emplearon columnas empacadas con porasil; n-pentano (T<sub>c</sub> = 196 °C) y mezcla de pentano-metanol (90-10 v/v, t<sub>c</sub> = 207°C) como fluidos supercríticos. La presión fue programada desde 25 hasta 98 bar, con un programa lineal de 4.9 bar/h; la temperatura fue mantenida constante a 235 °C. y la detección fue por espectroscopia UV.

En el mismo año 1978 Randall y Wahrafting<sup>17</sup> describen la primera combinación de CFS-EM. Una interfase de vapor molecular permitió obtener, los espectros de masa de varios compuestos como antraceno, trifenilbenceno, fenantreno y azobenceno; la fase móvil consistió en CO<sub>2</sub> y etano. Graham y Rogers<sup>18</sup> extendieron la aplicación y tecnología de la CFS a una variedad de separaciones. Oligómeros de poliestireno fueron separados a presión programada por etapas, en columnas de acero empacadas con porasil con diámetro de partícula entre 122 y 205 μm. La máxima resolución se encontró cuando se usó 5% de isopropanol en pentano como fase móvil supercrítica a una temperatura de 240°C. Se observó que la resolución depende de la relación entre la velocidad de incremento de la presión y la velocidad de flujo de la fase móvil; una resolución máxima se obtiene cuando a un incremento rápido de presión le corresponde una alta velocidad de flujo; se consideraron necesarias además operaciones a velocidades lineales que producen flujo turbulento para encontrar la máxima resolución. La presión fue programada por etapas de 3.45 a 4.14 MPa, 5.8 a 7.6 a 12 MPa y el sistema de detección fue UV. En una revisión del desarrollo de la CFS, hasta 1979, van Wasen, Swaid y Schneider<sup>19</sup> señalan los avances instrumentales logrados en la CFS y las aplicaciones analíticas y preparativas, así como las fisicoquímicas. En esta revisión se observa que los sistemas de detección mayormente empleados son los de absorción UV y en algunas ocasiones el FID y como fases móviles se han utilizado CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>O, etano, eteno, propano, pentano y clorotrifluorometano. Además, a comienzos de la década del 80 no se encuentra disponible en el comercio, ningún cromatógrafo de fluidos supercríticos. La literatura solo describe entre varios elaborados y propuestos, los de karayannis<sup>20</sup>, Jentoft y Gouw<sup>14</sup>, Klesper<sup>16</sup>, Hartman y el de Van Wassen.

### 3.1 LA DÉCADA DE LOS OCHENTA.

La década del 80 presenta un buen comienzo para la CFS. La implementación de columnas capilares, permite en 1981 a Novotny y otros<sup>2</sup> separar una mezcla de HAPNs con rapidez y alta eficiencia. El trabajo se realizó usando n-pentano como fase móvil a 210°C y 32 atm. Las columnas capilares usadas fueron de 0.2 y 0.3 mm de d.i. por 58 m de longitud, recubiertas de fenilmetilpolisiloxano como fase estacionaria. Los sistemas de detección usados fueron UV y fluorimetría. Un tubo capilar de 50 µm de d.i. después de la detección se usó para mantener presurizado el sistema.

La teoría y la técnica de la CFS tuvo avances significativos en los trabajos de Gere Dennis y col.<sup>21</sup> quienes evalúan las columnas de HPLC empacadas con partículas de 3, 5 y 10 µm, separando HAPNs a 33° C y 321 bar; para ello utilizaron un equipo de cromatografía de líquidos HP 1084B modificado; CO<sub>2</sub> como fase móvil y columnas empacadas de 4.6 mm de d.i. de varias longitudes. El equipo consta de dos bombas de diafragma, una para CO<sub>2</sub> y otra para modificadores; el sistema de detección fue absorción UV.

Peaden y otros<sup>22</sup> describen los aspectos instrumentales de la CFS capilar y señalan como los componentes básicos una bomba de alta presión con programador de presión, un sistema de inyección de muestra de volumen pequeño, un horno de temperatura constante y un detector de pequeño volumen. Como sistema de introducción de muestra considera la inyección con división de flujo como el mejor. En el análisis de alquitrán se utilizó como fase móvil el n-pentano a 210°C y 18 atm por 30 min, incrementada linealmente hasta 36 atm, por un periodo de dos horas. El detector de fluorescencia fue operado a 300-360 nm. En el análisis de un extracto de carbón en cloruro de metileno, se usó una columna de 60 m por 0.13 mm, de d.i. recubierta con SP 2340, a 210°C y una programación de presión de 27 a

40.3 atm a 5 atm/h. La instrumentación usada fue un sistema de presión controlada como lo hizo Van Lenten y Rotman<sup>23</sup>; un cromatografo sin su sistema de inyección; un espectrofluorímetro para detección del soluto. Un espiral de 1 m por 0.76 mm de d.i. dentro del horno sirvió para precalentar la fase móvil antes de la válvula; esta fue colocada dentro del horno con salida externa, el restrictor, de 35 a 50  $\mu\text{m}$  de d.i., fue colocado al final de la columna después del detector para mantener presurizado el sistema.

Una interfase de inyección directa de fluido (DFI) fue descrita por Smith, Fjeldsted y Lee<sup>24.25</sup> para el sistema acoplado CFS/EM. La instrumentación incluye una columna capilar, una interfase de inyección directa del fluido con una fuente de ionización de impacto electrónico (IIE). Con el objeto de desarrollar la interfase, de determinar parámetros para el diseño de la interfase óptima y el rango de aplicación, separan mezclas de hidrocarburos aromáticos y oligómeros de estireno usando n-pentano e isopropanol como fases móviles, a una temperatura ligeramente mayor que la crítica (147°C para isobutano,  $T_c = 135^\circ\text{C}$  y  $210^\circ\text{C}$  para n-pentano,  $T_c = 196^\circ\text{C}$ ) para reducir efectos sobre la fase móvil por variaciones térmicas. La presión se programó en un intervalo de 20 a 75 atm. Las columnas capilares se prepararon por cruzamiento de las fases SE-52 y SE-54 como lo describe Grob. El sistema utiliza una bomba de jeringa varían 8500 de alta presión, un inyector con división que permite inyecciones de 0.2  $\mu\text{L}$ , un cromatografo de gas HP que ha sido modificado para programar presión y el restrictor que fue diseñado de dos formas, una, un tubo de sílice fundida con orificio de 1.2  $\mu\text{m}$  hecho con un laser y otra, un tubo de platino-iridio extendido y aplanado en un extremo. El mismo Fjeldsted y otros<sup>26</sup> continuando las investigaciones sobre CFS capilar hacen un estudio de la programación de densidad de la fase móvil, usando n-pentano supercrítico como fase móvil en la separación de oligómeros de poliestireno a diferentes condiciones de elución. La

columna capilar fue de sílice fundida de 10 m por 0.1 mm de d.i. recubierta con un 50% de fenilmetilpolisiloxano. La muestra fue introducida a la columna con una válvula de 0.2  $\mu$ L con divisor y se empleó un detector y se empleo un detector UV de longitud de onda variable. Para aumentar la eficiencia de la fase móvil, se introdujo en un capilar de mayor diámetro (0.25 mm d.i.) como celda de flujo al detector y el flujo fue constante manteniendo presurizado el sistema a través de un tubo de vidrio de 40 m x 0.04 mm de d.i. usado como restrictor. Drushel<sup>27</sup> señala que la alta sensibilidad del FID lo hace disponible para ser usado por la nueva generación de columnas capilares de sílice fundida, ya que la pequeña capacidad de las columnas requiere de divisores para reducir el tamaño de las muestras a 10 o 15  $\mu$ g. Lauer, McManigil y Board<sup>28</sup> utilizando un equipo de cromatografía líquida hacen un estudio de la difusión y separación. Cafeína, nicotina, teofilina y otras muestras fueron analizadas. El CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub> fueron utilizados como fases móviles y varias columnas fueron probadas.

La primera demostración práctica del sistema acoplado CFS-FTIR es hecha por Shafer y Griffiths<sup>29</sup> al usar columnas capilares de sílice fundida con CO<sub>2</sub> supercrítico. Un detector UV, una celda de flujo FTIR y FID fueron montados en serie, demostrando el uso simultáneo de la detección en CG y HPLC con CFS. El sistema fue montado con una bomba de jeringa de alta presión enfriada con una mezcla recirculante de metanol-agua en un baño de hielo seco; una válvula de inyección de 1  $\mu$ l; una columna de 60 m por 0.33 mm de d.i. recubierta con una película de 1  $\mu$ m de DB-5, una fase estacionaria ligeramente polar; y un cromatógrafo de gas. El efluente fue pasado a través de un espectrofotómetro UV, luego a un FTIR y a un FID. La demostración típica del sistema se hizo corriendo una mezcla de anisol, acetofenona y nitrobencono a 50°C y 1500 psi. Smith y Udseth<sup>30</sup> describen una nueva alternativa a los métodos de análisis espectrométricos de masa de



compuestos no-volátiles o térmicamente lábiles, conjuntando el uso de fluidos supercríticos o “gases densos” con el método convencional de ionización química (IQ), buscando una eficiente transferencia de materia a la fase gaseosa en la fuente de ionización. Se utilizó como interfase el método de DFI-EM. El CO<sub>2</sub> supercrítico es impulsado por una bomba Varían 8500; una válvula de inyección es usada y colocada al final del orificio del DFI. Con éste método se obtuvieron los espectros de masa de micotoxinas del grupo ticoteceno y de T-2 toxinas, usando isobutano como gas reactivo de la fuente de IQ. Schmitz, Hilgers y Klesper<sup>31</sup> publican los resultados de la aplicación de gradientes de elución a oligómeros de estireno y 2-vinilpiridina, usando éteres y alcanos como eluyentes primarios. Las columnas fueron de acero inoxidable de 25 cm por 4.6 mm de d.i. empacadas con Lichrosorb Si 100 de 10 y 7 µm, detector UV a la temperatura del horno a 240, 250 y 275°C. Las fases móviles utilizadas fueron: dietiléter-etanol, dietiléter-dioxano, pentano-ciclohexano, propano-dioxano y pentano-metanol. Los resultados mostraron que los alcanos y éteres son eluyentes adecuados para CFS, mientras que los alcoholes son menos adecuados por su capacidad de disolución de la fase estacionaria de sílica-gel. Fjeldsted y otros<sup>32</sup> diseñan y ponen a prueba un detector de barrido de fluorescencia para CFS capilar. El detector es evaluado a longitud de onda fija y en barrido, con pireno y coroneno, provenientes del análisis de un extracto de carbón. Las columnas fueron de sílice fundida de 10, 50 y 75 µm de d.i. recubiertas con una película de 0.25 µm de espesor de SE-54 o 50% de fenilpolisiloxano. La fase móvil fue n-pentano mantenida a 210°C. La presión fue controlada por microcomputadora, pero no se dan datos.

En algunas aplicaciones selectas, el mismo Fjeldsted, Kong y Lee<sup>33</sup>, demuestran la utilidad de los detectores de cromatografía de gases, acoplando sucesivamente el FID y el detector termoiónico de nitrógeno en

CFS capilar. El diseño experimental consistió en una bomba de jeringa de HPLC acoplada a un cromatógrafo de gases con detector FID y NPD (detector de Nitrógeno-Fósforo); las muestras fueron introducidas con una válvula de 0.2  $\mu\text{L}$  a la columna capilar de sílice fundida de 50 o 75  $\mu\text{m}$  de d.i. recubiertas con una película de 0.25  $\mu\text{m}$  de SE-54; un capilar de sílice fundida de 9 cm x 10  $\mu\text{m}$  de d.i. fue colocado al final de la columna y unido al detector de llama por medio de un conector de volumen muerto cero. El extremo del restrictor fue colocado en la base del detector a través de un capilar de 300  $\mu\text{m}$  de d.i., aproximadamente 2 cm por debajo de la llama. La temperatura del horno se mantuvo constante: a 40°C para  $\text{CO}_2$  y 46°C para  $\text{N}_2\text{O}$ ; la del detector a 350°C. Los solutos separados con  $\text{CO}_2$  como fase móvil y programación de densidad fueron fracciones alifáticas de refinados de carbón y hulla y mezcla de azocompuestos (compuestos termolábiles). Con  $\text{N}_2\text{O}$  como fase móvil mezcla de HAPN<sub>8</sub> y heterociclos-N. Fjeldsted y Lee<sup>34</sup> describen las características del diseño instrumental y la instrumentación moderna necesaria para realizar CFS capilar, especialmente a nivel de detectores, aprovechando la ventaja de la compatibilidad de la CFS capilar con los detectores convencionales de CG y HPLC; sin embargo, los volúmenes de la celda de detectores ópticos deben ser extremadamente pequeños y capaces de soportar altas presiones, y los detectores de llama deben ser modificados para que la descompresión y expansión ocurra en el jet de la llama. Requisitos similares se deben aplicar a los sistemas acoplados CFS-EM y CFS-FTIR. En las aplicaciones con programación de densidad sugieren el uso de computadoras para la programación no lineal de densidad. Para el mejoramiento de la sensibilidad en los detectores de UV y fluorescencia sugieren el retorno del fluido al estado líquido antes de entrar a la celda del detector; la celda es de diseño simple y puede ser adaptada a cualquier aparato comercial. El FID no requiere modificaciones importantes

ya que el flujo del acarreador es similar al utilizado en CG; se realiza un barrido del soluto debido a la expansión del flujo en el restrictor, obteniendo resultados satisfactorios. Ante la necesidad de un detector con respuesta sensible y universal, Rawdon<sup>35</sup> describe las modificaciones necesarias para adaptar un FID de CG a CFS, con la ventaja del uso de CO<sub>2</sub> como fase móvil, ya que no ofrece respuesta a este detector. El equipo utilizado es un CG equipado con dos bombas de alta presión, una válvula de inyección manual, un compartimiento para calentar la columna, un intercambiador de calor instalado entre la columna y el detector y un baño de enfriamiento el cuerpo de la bomba por donde circula una solución de agua-glicol a -20°C. El CO<sub>2</sub> libre de aire, grado seco, es suministrado por cilindros con sifón y es secado al pasar a través de sílica-gel activada. Con este FID modificado y manteniendo suficiente presión, se separan poli-isobutilenos y diesel, utilizando columnas de 25 cm x 4.6 mm de d.i., empacadas con sílica de 5 µm, a un flujo de 2 mL/min, 30°C y 180 bar.

Kong y otros<sup>36</sup> describen la preparación de columnas capilares de sílice fundida, de d.i. pequeño, recubiertas con fases estacionarias no extractables. Tubos de 25, 50 y 100 µm de diferentes longitudes fueron recubiertos sin modificación previa de la superficie. Usaron tres tipos de fases estacionarias SE-33, SE-54 y 50% fenil, 49% metil y 1% de vinilpolisiloxano. Las columnas fueron recubiertas por el método estático, a temperaturas entra 30-80°C; el azoterbutano fue usado como radical libre de entrecruzamiento, logrando una película de 0.25 µm de espesor. Para la evaluación de las columnas como CG y CFS se utilizó una solución estándar de C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub> en cloruro de metileno a 0.1 mg/ml cada uno, con una relación de división de flujo mayor que 100:1. En la evaluación por CFS se utilizaron como fases móviles, el CO<sub>2</sub> con los estándares C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub>, y el n-pentano con una solución estándar de fenantreno y pireno en cloruro de metileno a 0.1 mg/mL. Un

extracto de carbón fue analizado para demostrar la eficiencia de la columna recubierta con 50% de fenil polisiloxano. Hirata y Nakata<sup>37</sup> utilizando columnas de d.i. pequeño (menor de 0.5 mm) empacadas, describen un gradiente de elución simple en HPLC basado en un sistema de mezclado en una cámara y operado a presiones constantes mayores de 300 Kg/cm<sup>2</sup>, utilizando un espectrofotómetro de UV como detector. La columna es un tubo capilar de sílice fundida de 50 m por 0.2 mm de d.i. empacado con Develosil ODS-5. Uno de los tópicos más recientes en HPLC ha sido el desarrollo de microcolumnas debido a que tienen más alto poder de resolución y más baja velocidad de flujo que las columnas convencionales. Tsuda y otros<sup>38</sup> publican que el diseño más favorable de las columnas capilares empacadas es aquel que tiene el dp de sílica-gel muy pequeño, un valor muy grande de la relación d.i./dp y cualquier longitud de columna. Sobre esta base se diseñó una columna empacada por el método de suspensión (slurry), con una relación d.i./dp = 3 - 12, utilizando como material de empaque Develosil 10-60; la columna se probó con un sistema de HPLC, usando un LC-4A (Shimadzu) o FLC-A-700 (Jasco). Un espectrofotómetro de UV fue usado como detector. Como interfase se puede usar un tubo de PTFE de 0.07 mm de d.i. y 20 mm de longitud, o un tubo capilar de sílice fundida, de 12 cm por 50 µm de d.i. N-alquilanilinas y dialquifthalatos fueron separados y determinada la relación H-u, utilizando como eluyentes una mezcla de metanol, acetonitrilo, diclorometano agua y hexano. Hirata y Nakata<sup>39</sup> aplican el sistema de columnas capilares empacadas a la CFS y describen los resultados iniciales. La velocidad de flujo es del orden de unos cuantos µL/min y el calentamiento de la fase móvil se hace en la misma columna analítica. El sistema cromatográfico consta de dos bombas, una microválvula de inyección de 0.1 µL y un espectrofotómetro UV. La fase móvil usada en la separación de una mezcla de HAPNs fue n-hexano con un 10% de etanol; la columna fue de

sílice fundida de 58 cm por 200  $\mu\text{m}$  de d.i., empacada con sílica-gel de 10  $\mu\text{m}$ . Takeuchi y otros<sup>40</sup> describen la instrumentación necesaria para CFS con microcolumnas empacadas con partículas finas usando  $\text{CO}_2$  como fase móvil en la separación de HAPN<sub>8</sub> y oligómeros de estireno. La columna de sílice fundida de 15 cm por 0.34 mm de d.i. por 0.42 mm de d.e., fue pegada a un tubo de acero inoxidable de 0.51 mm de d.i. por 0.81 mm de d.e. con resina epóxica. Como detector se usó un espectrofotómetro UV. La presión fue de 150  $\text{Kg/cm}^2$  y la temperatura a 35°C.

Springston y Novotny<sup>41</sup> describen las medidas del coeficiente de difusión de varios HAPN<sub>8</sub> en alcanos supercríticos ( $\text{C}_3\text{-C}_5$ ), utilizando columnas capilares no recubiertas de 150  $\mu\text{m}$  de d.i. Norris y Rawdon<sup>42</sup> separan hidrocarburos saturados olefínicos y aromáticos de la gasolina y querosina, utilizando  $\text{CO}_2$  como fase móvil, y detección FID como técnica alternativa al indicador de absorción de fluorescencia (FIA). Para ello utilizan un cromatógrafo de líquidos y un FID modificado como indica (35). Las columnas son de 25 cm por 4.6 mm de d.i. empacada con sílica de 5  $\mu\text{m}$  y RSIL-5 recubierta con 20% de nitrato de plata. Chester<sup>43</sup> informa el uso de restrictores capilares con el objeto de reducir el ruido de alta frecuencia en la CFS-FID. Utilizando una columna de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. y BP-10, metilsilicona y CPS-2 como fases estacionarias, y un restrictor de 20 cm por 14  $\mu\text{m}$  de d.i., ahusado en los últimos 5 cm que evita la condensación y amplía el intervalo de pesos moleculares; obtiene los cromatogramas de triestearato de glicerol a condiciones isobáricas y parafina de crudos, ácidos grasos y surfactantes etoxilados, usando  $\text{CO}_2$  como fase móvil a presión programada. El alargamiento del restrictor mantiene la presión alta haciendo el gradiente más abrupto a la salida; cuando existen problemas de condensación se aumenta la temperatura en el restrictor tanto como sea posible. Smith y colaboradores<sup>44</sup> demuestran que la CFS capilar y CFS-EM son unas

poderosas herramientas para producir separaciones rápidas y de alta resolución; la mayor ventaja de la CFS capilar sobre la CFS con columnas empacadas, resulta del uso de la programación de presión para variar rápidamente el poder solvatante de la fase móvil. El sistema CFS y CFS-EM consiste en una bomba de jeringa de alta presión, una válvula de 0.1  $\mu\text{L}$ , una columna montada a temperatura constante a través del DFI y un restrictor de 0.4  $\mu\text{m}$  de d.i.; con columna de 50  $\mu\text{m}$  de d.i. recubierta y entrecruzada con fenil-metilfenilpolisiloxano y con  $\text{CO}_2$  como fase móvil, se pudo resolver una mezcla de HAPNs. También probaron la misma interfase en otro sistema CFS-EM<sup>45</sup> usando ionización de impacto electrónico (IIE), separando 4-aminofenilo, bencidina y 3,3-diclorobencidina, con mayor resolución que la obtenida por el método de introducción directa HPLC-EM. En otra aplicación<sup>46</sup> describen y comparan la CFS y CFS-EM en el análisis de muestras de combustible marino (HAPNs), alcanzando alta resolución en la separación, detección selectiva y alta calidad en los espectros de masa. Se usó isobutano como gas reactivo de ionización química.

Trabajando con columnas empacadas, Leyendecker y otros<sup>47</sup>, publican los efectos de temperatura, presión y velocidad de flujo sobre la retención y resolución de dialquiltálatos y oligoestirenos. Empleando dietileter y dimetileter como eluyentes muestran que en el estado gaseoso, sub o supercrítico, existe una temperatura óptima de separación por encima de la temperatura de ebullición y crítica respectivamente, donde la máxima resolución y factores de capacidad ( $k'$ ) son obtenidos. La influencia de la temperatura y presión sobre la separación resulta de dos efectos: el incremento en la presión de vapor por incremento de la temperatura y la dependencia de la densidad del eluyente debida a ambos. El incremento de la velocidad de flujo (1mL/min) conduce a una considerable disminución de la resolución. Continuando con la tecnología de columnas de sílice fundida

empacadas, Hirata<sup>48</sup> estudia el comportamiento de la sílice y fases químicamente unidas bajo condiciones supercríticas, usando n-hexano y n-hexano/etanol como fases móviles. Montando un sistema cromatográfico como el descrito en (39), con columnas capilares de 60-80 cm de largo por 200  $\mu\text{m}$  de d.i., empacadas con diferentes fases y a temperaturas desde la ambiente hasta 280°C y presión de 50 atm, se separan diversos oligoestirenos. La retención se incrementa con la temperatura, debido a que la densidad de la fase móvil disminuye. Sobre la sílice, el mecanismo predominante es la adsorción, en las fases químicamente unidas, el mecanismo de retención es la partición. Cuando se añade una pequeña cantidad de disolvente polar (etanol) al disolvente primario no polar (n-hexano), la retención disminuye cuando la concentración del modificador es del orden del 1%. Adiciones mayores incrementan la retención. La sílice sufre modificación con el etanol debido a la formación de etil-silil-éter. También fue estudiado el comportamiento de varias muestras con diferentes polaridades<sup>49</sup>.

En 1985 se realizaron muchas aplicaciones de la CFS. Smith y colaboradores<sup>50</sup> describen la separación y análisis de micotoxinas de tricotecenos por CFS-EM, demostrando la aplicación de los métodos de presión programada usando columnas cortas y columnas largas de alto poder de separación y rapidez. El sistema consistió de una bomba de alta presión, un inyector de 0.1  $\mu\text{L}$ , una relación de división 1-10 para las columnas largas y 1-40 para las cortas. El restrictor al final de la columna fue un tubo de ~25 mm por 5  $\mu\text{m}$  de d.i. Las columnas fueron recubiertas con una película de 0.25  $\mu\text{m}$  de SE-54 y las separaciones fueron obtenidas a 100°C. La fase móvil  $\text{CO}_2$ , fue impulsada a una presión de 70-350 atm.

Fields y Lee<sup>51</sup>, utilizando los coeficientes de difusión de la fase móvil publicados en la literatura, predicen la eficiencia para benceno, naftaleno y cafeína en CO<sub>2</sub> con una columna de 50 µm de d.i. Hidrocarburos normales (C<sub>10</sub>, C<sub>24</sub> y C<sub>36</sub>) se usaron para medir la eficiencia de la columna recubierta con SE-54 sobre intervalos de densidades programadas para 50 y 100°C. El sistema consistió en una bomba de jeringa modificada para control de presión; un CG modificado y equipado con FID; un inyector de 0.2 µL; un tubo corto de sílice fundida (~5 cm) de 5 µm de d.i., o un tubo ahusado, como restrictor; el CO<sub>2</sub> grado CFS fue filtrado y destilado antes de su uso; la velocidad lineal fue ~2 cm/s. Se estudió el efecto de la densidad sobre la eficiencia, usando los valores de Dm para naftaleno a 0.28, 0.45 y 0.79 g/mL; el efecto de la retención sobre la eficiencia, usando Dm para benceno y cafeína a 0.79 g/mL; lo mismo que el efecto de la temperatura sobre la eficiencia. Blilie y Greibrokk<sup>52</sup> describen el uso de bombas reciprocantes en la construcción de gradientes de flujo-presión, gradientes de modificadores, y gradientes combinados de presión-modificadores para la separación de un grupo de HAPN<sub>8</sub> y un grupo de Nitro-HAPN<sub>8</sub>. Ambos grupos contienen componentes que dieron picos asimétricos y otros que fueron totalmente retenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico solo, sobre columnas en fase inversa de C<sub>18</sub>. La instrumentación incluye un sistema de bombas; un HPLC con detector UV; columnas CP-Spher C<sub>18</sub> de Chrompack de 25 cm por 1.3 mm de d.i., las cuales dieron una caída de presión menor de 7 bar. Se estudió el efecto del modificador (MeOH) de la fase móvil (CO<sub>2</sub>), sobre la retención de los solutos y la combinación de las cantidades y velocidades del uno y otro. Otros modificadores fueron estudiados<sup>53</sup>: el hexano tuvo poco efecto, acetonitrilo, dioxano y THF, redujeron la retención de HAPN<sub>8</sub> y Nitro-HAPN<sub>8</sub>. El metil butil éter tuvo un efecto similar al hexano. Lundanes y Greibokk<sup>54</sup> examinan la posibilidad de usar CO<sub>2</sub> supercrítico como fase móvil en la separación de



fracciones de petróleo de alto punto de ebullición (>350°C); la cuantificación directa puede ser obtenida con un FID sin modificación. Las fracciones de alto punto de ebullición, residuos y crudos pueden separarse en saturados, aromáticos y polares sobre un sistema de triple columna; ciano, sílice y sílice impregnada de plata. La ciano-columna separa los componentes polares y aromáticos y la columna de sílice impregnada con plata ofrece una completa separación entre saturados y aromáticos que no se obtiene sobre la columna de sílice sola. Las muestras fueron disueltas en CS<sub>2</sub>, que supuestamente no da respuesta al FID e inyectadas con una microválvula para HPLC. Un detector UV y un FID fueron usados en serie; el FID fue usado a 350°C. El restrictor consistió de un tubo de platino (0.1 mm d.i.) aplanado en un extremo. Las columnas fueron: dos de 250 por 1.3 mm d.i. de CP-Spher sílice de 8 µm y dos columnas de 30 por 2.1 mm d.i. Spheri-5 ciano de 5 µm. Una de las columnas de sílice fue impregnada con AgNO<sub>3</sub>. M. Konishi y otros<sup>55</sup> describen una nueva columna de vidrio, empacada y encamisada en un tubo de acero inoxidable, para HPLC. Las microcolumnas son de 10-30 cm de longitud y 0.3-0.5 mm de d.i. y 1/16 de pulgada de d.e., empacadas con Spherisorb ODS-2 de 3-5 µm por el método de suspensión. También utilizaron columnas capilares de sílice fundida en 250 µm d.i. empacadas con partículas de 5 µm. Chester y otros<sup>56</sup> desarrollaron un sistema para producir un nuevo tipo de restrictor de sílice fundida, ahusado, basado en el adelgazamiento de las paredes del tubo para prevenir el ruido de alta frecuencia y hacer más amplio el intervalo de pesos moleculares detectables en el sistema CFS-FID. Estos restrictores no pueden ser elaborados manualmente, por lo tanto, se desarrolló un procedimiento para reproducir el ahusamiento usando un robot de laboratorio. Los restrictores se probaron por CFS capilar, usando una bomba Varían 8500 modificada para control de alta presión y un divisor de flujo a la entrada de la columna, que consistió de un

tubo de sílice fundida de 50 cm por 50  $\mu\text{m}$  de d.i. (relación de 10:1), un cromatógrafo de gas, una columna de 5 m por 65  $\mu\text{m}$  d.i. y  $\text{CO}_2$  como fase móvil. La velocidad de la fase móvil fue de 3.6 cm/s a 330 atm y se aumentó a 4.0 cm/s a 360 atm. Crowther y Henion<sup>57</sup> describen la viabilidad de un sistema de CFS-EM con columnas empacadas para analizar drogas polares, utilizando  $\text{CO}_2$  como fase móvil y metano como modificador. Se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masa equipado con una interfase DLI (Direct Liquid Introduction) que divide el flujo; las columnas de 200 por 2.1 mm fueron empacadas con sílice de 5  $\mu\text{m}$ , fase amino de 5  $\mu\text{m}$  y fase nitrilo. Los estándares usados fueron cocaína, codeína, cafeína, metocarbamol, fenilbutazona y oxifenbutazona. Los resultados muestran que la velocidad de análisis en CFS es mayor que en HPLC especialmente para las columnas de sílice, lo mismo que la ventaja de CFS-EM sobre HPLC-EM. Mourier y otros<sup>58</sup> utilizando CFS con columnas empacadas y  $\text{CO}_2$  sub y supercrítico como fase móvil con modificadores polares (agua, metanol, etanol, 2-propanol) mejora la resolución en la separación de enantiómeros sobre fases estacionarias quirales por selección de condiciones apropiadas y modificadores adecuados son obtenidas mayores resoluciones por unidad de tiempo que en la cromatografía de líquidos. Utilizando un aparato como el descrito en (21) con una bomba para  $\text{CO}_2$  y otra para los modificadores, un detector UV, columnas de acero inoxidable de 100 por 4.6 mm d.i. empacadas con sílica gel covalentemente unida al agente quiral (Lichrosorb  $\text{NH}_2$ ), separan los óxidos de fosfinas y utilizan el óxido metil (4-metilnaftil) fenilfosfina, para el estudio de la selectividad, eficiencia y resolución. Se resalta la influencia del estado físico del  $\text{CO}_2$  sobre la eficiencia y se determina que la mejor densidad es a valores mayores que 0.7 g/mL y el mejor modificador es el más polar. La mejor resolución se obtiene a condiciones subcríticas. Wright, Kalinoski y Smith<sup>59</sup>

estudian y comparan la influencia de varias fases móviles,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$  y  $\text{CO}_2\text{-MeOH}$ , sobre la retención y selectividad, bajo condiciones cromatográficas equivalentes, operando a la misma presión y temperaturas reducidas (1.27 y 1.06 respectivamente). Utilizando fenil (polimetilsiloxano) como fase estacionaria se miden los efectos sobre una mezcla polar, determinando la selectividad y los índices de retención de Kovats. La columna utilizada fue de 18 m por 50  $\mu\text{m}$  de d.i., recubierta con SE-54, con un espectrómetro de masa como detector. Como el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{N}_2\text{O}$  tienen parámetros críticos semejantes, se esperaban propiedades solvatantes semejantes, sin embargo el  $\text{N}_2\text{O}$  tiene un momento dipolar débil (0.17 D) y el  $\text{CO}_2$  es ligeramente ácido en presencia de trazas de agua, afectando sus propiedades solvatantes y selectividad cromatográfica. La mezcla  $\text{CO}_2\text{-MeOH}$  es el mejor disolvente para solutos polares debido a la alta polaridad del MeOH y a las posibles interacciones soluto-disolvente. Smith, Chapman y Wright<sup>60</sup> hacen una detallada investigación y describen los aspectos teóricos y experimentales de la programación de presión (p-p) en CFS capilar, derivando relaciones simples para la predicción de los tiempos de retención y la calidad de la separación en programación de densidad lineal. Así mismo describen métodos numéricos para situaciones más complejas. Estas relaciones muestran las interacciones entre densidad inicial, programación de velocidad de densidad, tiempo de retención y las constantes que describen la dependencia de  $k'$  con la densidad. Los resultados también señalan que la p-p proporciona separaciones extremadamente rápidas y combinadas con columnas cortas de diámetro pequeño dan mejores separaciones a menor tiempo. Las columnas cortas permiten altas velocidades de programación de densidad y a menudo producen separaciones de alta calidad por unidad de tiempo, así como se incrementa la velocidad de separación. El sistema utilizado es similar al descrito en (25,

44). Las columnas fueron menores de 5m por 25-50  $\mu\text{m}$  de d.i. recubiertas con SE-54 y entrecruzadas con azoterbutano. Como restrictor se usó un tubo corto de sílice fundida de aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  de d.i.; una mezcla de cuatro componentes naftaleno, fenantreno, pireno y benzo (a) pireno, fue utilizada como soluto y  $\text{CO}_2$  supercrítico como fase móvil. El metano se usó para determinar  $t_0$ .

Continuando la investigación sobre métodos acoplados, Hughes y Fasching<sup>61</sup> desarrollan un cromatógrafo de fluidos supercríticos con un sistema de detección FTIR y lo utilizan en la separación de una mezcla de cetonas, usando  $\text{CO}_2$  como fase móvil. Obtienen separaciones de cetonas aromáticas, acetofenona, metil-2-propanona y benzofenona. También lo aplican a la separación de una mezcla de lípidos no polares: colesterol, palmitato de colesterol y tripalmitina. La CFS-FTIR demostró ser ideal para este último tipo de separaciones ya que los lípidos no polares son compatibles con el  $\text{CO}_2$ . Ogden y McNair<sup>62</sup> describen el uso de mezclas comercialmente disponibles de siloxanos cíclicos puros y lo comparan con los diclorosilanos como materiales iniciadores en la síntesis de fases estacionarias para cromatografía de gases y de fluidos supercríticos.

1986 se caracteriza por el desarrollo de trabajos dedicados a un mejor sistema de detección en CFS; es así como Shafer y otros<sup>63</sup> describen una interfase automatizada para el sistema acoplado CFS-FTIR usando una columna de diámetro pequeño en la que la fase móvil es eliminada rápidamente y la reflectancia difusa (DR) del soluto es medida. La interfase fue aplicada al análisis de una mezcla sintética de 2-metil-2,4-naftoquinona, acenaftoquinona y fenantrenoquinona, sobre una columna empacada con sílice de 5  $\mu\text{m}$ . Las separaciones fueron realizadas con una microbomba Brownlee MPCL y un inyector Rheodyne 7413 de 0.5  $\mu\text{l}$ , un detector Tracor

960 operado a 254 nm. Todas las separaciones fueron realizadas con 5% de metanol en CO<sub>2</sub>, calentado a 50°C y presurizado a 3.000 psi. French y Novotny<sup>64</sup> proponen el uso de una fase móvil “exótica” para mejorar la separación y la detección; el uso de xenon como fase móvil en CFS-FTIR. Aunque el Xe es una fase móvil cara y con velocidades típicas de sistemas de CFS capilar, ocupa una posición única entre los gases nobles debido a sus parámetros críticos ( $T_C = 289.8\text{K}$ ,  $P_C = 58.0\text{ atm.}$ ,  $\rho_C = 1.105\text{ g/mL}$ ) y a su transparencia espectral. Una mezcla de aldehidos y fenoles es separada en una columna capilar de sílice fundida de 17 m por 150  $\mu\text{m}$  de d.i. recubierta con una película de 1.0  $\mu\text{m}$  de SE-54 inmovilizada con azoterbutano. El fluido fue impulsado por una bomba Brownlee y la muestra introducida por una válvula Valco EX14U.2 de 0.2  $\mu\text{L}$  acompañada con un divisor de flujo 2:1. Las medidas de retención en Xe y CO<sub>2</sub> fueron hechas a la misma densidad reducida de 1.10. Las medidas sobre Xe fueron realizadas a 27°C, 1059 psi y una velocidad lineal de 3.5 cm/s y sobre CO<sub>2</sub> a 41°C, 1300 psi y una velocidad de 4.7 cm/s. Hensley y McNair<sup>65</sup> describen el desarrollo instrumental de un cromatógrafo de fluidos supercríticos con columnas capilares y sistema de detección FID; para ellos utilizan CO<sub>2</sub> grado SFC, una micro bomba ISCO para HPLC, un sistema de inyección en el que evalúan dos válvulas: una MACS 500 de 0.5  $\mu\text{L}$  y otra Valco C14W de 0.1  $\mu\text{L}$ ; un divisor de flujo, un cromatógrafo de gas Sigma 2000 de Perkin Elmer equipado con FID; la columna de sílice fundida es de 10 m por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. recubierta con OV-1701; como restrictor se usó un tubo de 4 cm por 10  $\mu\text{m}$  de d.i. Los solutos fueron parafinas, polidimetilsiloxano, triton X-100, policianometilsiloxano y ácidos grasos. Jordan y Taylor<sup>66</sup> comparan flujos de dos celdas que difieren en longitud y geometría, en un sistema de detección FTIR; la interfase es diseñada para CG pero modificada para trabajar a altas presiones. Se comparan dos fases móviles CO<sub>2</sub> y Freón (CHF<sub>3</sub>). Para la

separación se utiliza un cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV de longitud de onda variable y un FTIR Nicolet 6000C para coleccionar y resolver los espectros. Con este equipo Jordan<sup>67</sup> separa ácidos grasos libres por CFS-FTIR sobre PRP-1 de 5 y 10  $\mu\text{m}$ . El método proporciona ventajas sobre las demás técnicas analíticas, facilidad de análisis sin necesidad de derivar el respectivo éster y detección sensible que conduce a identificación a través de la información espectral. Nuevamente Pentoney<sup>68</sup> describe una interfase CFS-FTIR con eliminación rápida del disolvente usando un microscopio infrarrojo. Los compuestos son aspirados sobre una ventana de Zn-Se al final del restrictor. Guthrie y Schwartz<sup>69</sup> describen la forma de diseñar un restrictor "integral" para CFS que es fabricado directamente en el detector, resultando en un restrictor mecánicamente estable que no exhibe ruido de alta frecuencia sobre un amplio intervalo de muestras de peso molecular elevado. Usando columnas de 50 y 100  $\mu\text{m}$  de d.i. de sílice fundida y restrictores de longitudes cortas de 5 y 10  $\mu\text{m}$  de d.i., se consiguen separar muestras de ceras, lípidos, oligómeros de polisiloxano y extractos de orina.

Investigando el uso y efectos de los modificadores en CFS, Levy y Ritchey<sup>70</sup> exploran el uso analítico de los modificadores en columnas capilares empacadas, con varias clases de solutos y fases estacionarias. Observan que cambiando el modificador y las concentraciones, se producen cambios en la retención, selectividad y en la forma de los picos. Usando una instrumentación como la descrita en (21),  $\text{CO}_2$  como fase móvil, detección UV y FID, logran separar diferentes tipos de solutos como HAPNs, aminas aromáticas, dialquilftalatos, alquilbencenos, azocompuestos y clorobencenos, en tres tipos de columnas: sílice, sílice-diol y ciano-sílice. Los mecanismos son diferentes para cada columna. Usando un cromatógrafo de fluidos supercríticos (Lee Scientific 501) equipado con divisor de flujo, FID,  $\text{CO}_2$  como fase móvil y SE-33 como estacionaria en una columna de 50  $\mu\text{m}$  de

d.i., Later y otros<sup>71</sup> hacen una aplicación de CFS capilar al análisis de drogas de abuso (tales como tetrahidrocannabinol y sus metabolitos: cocaína, fenilciclidina, fenobarbital, metacualona, metadona y propoxifen); al análisis de drogas terapéuticas como tetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina y atenolol, además de esteroides anabólicos y corticales. Las separaciones fueron altamente eficientes y rápidas, demostrando además que la CFS puede ser utilizada para analizar compuestos de alto peso molecular, compuestos polares e isoméricos, sin los procedimientos de derivatización. Markides y colaboradores<sup>72</sup> también aplican CFS al análisis de ácidos carboxílicos libres, térmicamente lábiles, usando CO<sub>2</sub> supercrítico como fase móvil. Investigan los efectos de la temperatura y de la polaridad de la fase estacionaria sobre la eficiencia y la forma de los picos. La aplicación se hizo sobre ácidos de C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> y prostaglandinas, usando el SFC Lee Scientific 501, con columnas capilares de 50 µm de d.i. recubiertas con una fase no polar, polimetilhidroxilosano y una polar, cianopropilmetilpolixilosano. Smith y colaboradores<sup>73</sup> examinan varios aspectos del papel de los restrictores y establecen que para obtener mejores condiciones de flujo en CFS capilar, los restrictores deben ser de longitudes cortas, la expansión del flujo debe ser cercana a la adiabática y la entalpía suficientemente alta para evitar transición a través de una región de dos fases; la temperatura reducida mayor de 1.3 generalmente evita sistemas disolventes de dos fases. Para el estudio del diseño, longitud y diámetro de los restrictores usaron una bomba de jeringa de presión controlada, un CG y un inyector de 60 µL. El restrictor fue colocado al final de la columna y varios diseños, consistentes tubos de sílice fundida de 5-9 µm de d.i. o de 25 o 50 µm estirado o ahusado como lo describe Chester<sup>56</sup>, fueron investigados.

1987 se caracteriza por una creciente producción en los sistemas de detección, un mejoramiento de la interfase columna-detector, al igual que los

sistemas acoplados. Rokushika y otros<sup>74</sup> describen la construcción de un CFS acoplado a espectrometría de movilidad iónica, usando CO<sub>2</sub> como disolvente y como gas conductor en la movilidad del ión. La instrumentación utilizada consistió en una bomba JASCO LC P-350 de 200 mL, un inyector Valco C14W de 60  $\mu$ L, un horno Shimadzu, una columna capilar de 10 m por 100  $\mu$ m de d.i. recubierta con SPB-1 entrecruzada y como solutos se usaron una serie de ésteres metílicos y benzoatos. Smith y Udseth<sup>75</sup> desarrollaron y evaluaron dos nuevas interfases para el sistema CFS-EM, permitiendo ambos diseños una operación más práctica y reemplazo rápido del restrictor, operación a altas velocidades de flujo, mejor control de la temperatura y ampliación de la sensibilidad para compuestos menos volátiles. En uno de los diseños el fluido se expande en una región detrás de la fuente de ionización química. Todos los restrictores usados son de aproximadamente 5-10 cm de longitud y de 25-50  $\mu$ m de d.i. con una región de estiramiento de 3-10 mm en el extremo con un diámetro de salida de 8-10  $\mu$ m. La interfase puede ser usada con columnas de diámetro pequeño y capilares. El sistema fue eficiente en el análisis de surfactante no iónico, triton X-100 y mezcla polar de pesticidas. Giddings y colaboradores<sup>76</sup> exploran la posibilidad de usar fluidos supercríticos (gases densos) en lugar de líquidos como disolventes en la técnica Thermal Field-Flow Fractionation (Thermal FFF), alcanzando gradientes de densidad muy altos, especialmente cerca del punto crítico, determinando el gradiente de concentración del soluto como una función del gradiente de densidad. Wright y otros<sup>77</sup> utilizan fluidos supercríticos como CO<sub>2</sub>, isobutano y CO<sub>2</sub> modificado, en los procesos de extracción y los compara con los métodos que utilizan Soxhlet; la extracción con fluidos supercríticos (EFS) proporciona una eficiencia comparable a los métodos soxhlet y una extracción muy rápida. Jahn y Wenclawiak<sup>78</sup>, describen una válvula de control de presión especialmente diseñada para



programas de presión y flujo constante en CFS con columnas empacadas y aplicada con éxito en el estudio y reproducibilidad de los tiempos de retención del tolueno. Wright y colaboradores<sup>79</sup> demuestran la aplicabilidad de una nueva metodología analítica, combinando EFS con CG capilar de alta resolución, con CO<sub>2</sub> supercrítico para el fraccionamiento y aislamiento de compuestos. El fluido supercrítico se descomprime a través de un restrictor para depositar y concentrar los analitos a la entrada de la columna de CG para su análisis. La operación completamente automatizada proporciona análisis rápidos y altas sensibilidades.

Mediante la combinación de CG y CFS capilar, Pentoney y otros<sup>80</sup> muestran la viabilidad de analizar solutos que contienen componentes volátiles y no volátiles haciendo una sola inyección y usando una sola columna analítica en tiempos de análisis razonables. En la separación de mezclas que contienen compuestos volátiles y no volátiles, utiliza un sistema constituido por dos cromatógrafos de gases uno equipado con FID y columnas capilares sin división de flujo; otro provisto de una bomba para impulsar el fluido para CFS. Un tubo de sílice fundida de 5 µm de d.i. se usó como restrictor, y las columnas fueron de 19.5 m por 100 µm de d.i. recubiertas con DB-5 (5% de fenilmetilsiloxano) de 0.4 µm de espesor. La muestra se introdujo en la columna de tres maneras, tipo CG, tipo CFS y combinando CG-CFS a través de una válvula de 60 ηL. La fase móvil, CO<sub>2</sub>, fue suministrada con un p-p de 1250-4100 psi, a 120°C, obteniéndose una velocidad lineal de 4.6 cm/s. Leyendecker y otros<sup>81</sup> usando n-pentano/1,4-dioxano como sistema disolvente binario en CFS y sílice como fase estacionaria, construye gráficos tridimensionales de los factores de capacidad k', selectividad α, número de platos teóricos N y resolución R, de cuatro HAPNs: naftaleno, antraceno, pireno y criseno, contra temperatura de la columna y composición del eluente. Las columnas utilizadas fueron de acero inoxidable de 25 cm por 4.6

mm de d.i. empacadas con Lichrosorb Si 100, 10  $\mu\text{m}$ . La detección fue UV a 254 nm. Yonker y Smith<sup>82,83</sup> estudian y relacionan los efectos de los gradientes de modificadores y presión-modificadores con la retención del soluto, mediante la combinación de los cambios en la densidad, con la adición de los modificadores, y los cambios químicos en las interacciones intermoleculares entre soluto y modificador, a medida que cambia la composición de la fase móvil. Los datos presentados muestran como principal ventaja la disminución de los tiempos de retención y la capacidad de modificar dinámicamente las propiedades fisicoquímicas de la fase móvil supercrítica como una función del tiempo. Los solutos estudiados fueron una serie homóloga de fenonas. La fase móvil  $\text{CO}_2$ , el modificador 2-propanol y la detección UV. Las columnas fueron de 15m por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. recubiertas con SE-54 y DV-17. Griffiths y otros<sup>84</sup> hacen la descripción de una bomba amplificadora neumática para EFS y CFS que permite relleno rápido y opera a presión constante o programada. La bomba es probada en un sistema de CFS, extrayendo primero la cafeína del café con  $\text{CO}_2$  líquido y luego pasar el fluido a través de columnas capilares de 19.5 m por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. recubiertas con DB-5 de 0.4  $\mu\text{m}$  de espesor, a una temperatura de 70 y 140°C y una p-p de 1940 a 4200 psi, a 20 psi/min. El inyector fue de 60  $\eta\text{L}$ . Greibrokk y colaboradores<sup>85</sup> discuten algunas implicaciones de las limitaciones que presenta la CFS, referidas a la solubilidad de grupos polares en fluidos tales como  $\text{CO}_2$ , el lento progreso de la disponibilidad comercial de aparatos para CFS y los sistemas de inyección directa en columnas capilares. Raymer y Pellizari<sup>86,87</sup> utilizan  $\text{CO}_2$  para desorber varios compuestos del sorbente polimérico tenax-GC y compara la desorción con fluidos supercríticos a la desorción térmica, usando el mismo sorbente; la recuperación se da en un rendimiento mayor del 90% y se demuestra a través de compuestos radiomarcados. Para verificar la estructura de los

compuestos desorbidos se usó cromatografía de capa fina (CCF) y espectrometría de masa. Rosset y otros<sup>88</sup> miden los valores de los coeficientes de difusión de algunos solutos en CO<sub>2</sub> supercrítico y estudian la influencia de la temperatura, presión y la adición de metanol a CO<sub>2</sub>. Shoenmakers y colaboradores<sup>89</sup> realizan un estudio simultáneo de los parámetros presión, densidad y temperatura usados en CFS con columnas empacadas, mostrando que la presión es aproximadamente lineal. La temperatura se incrementa ligeramente y la densidad disminuye a lo largo de la columna; las variaciones en densidad y temperatura son ampliadas usando partículas pequeñas o altas velocidades de flujo; los efectos de temperatura se reducen usando columnas con diámetro internos pequeños. Smith, Kalinoski y Udseth<sup>90</sup> describen los aspectos fundamentales y prácticos de los sistemas CFS-EM, señalando como los métodos basados en la interfase CFS-EM, continúan avanzando en la caracterización de sustancias para las que la CG y CLAR resultan técnicas inadecuadas. La sensibilidad y selectividad de la detección espectrométrica de masa es la principal atracción de esta combinación. Los métodos proporcionan herramientas para el estudio del fenómeno del fluido supercrítico, incluyendo reacciones de fases y procesos de extracción. La flexibilidad de la técnica analítica proporciona un tremendo potencial que puede ser mejorado si se entienden bien los principios de las solubilidades en fluidos supercrítico. Warner<sup>7</sup> señala que la CFS es una técnica analítica en ascenso en capacidad para resolver aquellos problemas que no puedan resolver CG-EM o HPLC-EM, pero que al igual que la HPLC-EM no llegaran a sustituir definitivamente a la CG-EM. Hawthorne y Miller<sup>91</sup> usan fluidos supercríticos en la extracción y recuperación de HAPNs de tres tipos de sólidos ambientales, polvo urbano, ceniza del aire y sedimentos del río. Cinco diferentes disolventes supercríticos etano, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>-MeOH y N<sub>2</sub>O-MeOH fueron probados

con las tres muestras. Los resultados demuestran que el uso de fluido supercrítico tiene ventaja sobre los métodos tradicionales que usan líquidos; en muchos casos presentó mejor recuperación que la extracción con Soxhlet. El N<sub>2</sub>O supercrítico con 5% de metanol dio las mejores recuperaciones de HAPNs en las tres muestras. Taylor y otros<sup>92</sup> aplican CFS con columnas empacadas a la separación de compuestos organometálicos, con especial atención al estudio de los ferrocenos y los complejos metalacetilcetona; el desarrollo cromatográfico fue evaluado con base en la retención; forma del pico y resolución. La instrumentación consistió de un HPLC modificado, CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>-MeOH como fase móvil, un detector UV de longitud de onda variable inyector de 10 µL. Carraud y colaboradores<sup>93</sup> utilizan CO<sub>2</sub> supercrítico y CO<sub>2</sub>-MeOH en la separación de varios compuestos con la instrumentación descrita en (58) con sistema de detección basado en la dispersión de la luz (Light-Scattering detector, LSD). Los solutos fueron docosano, pireno, mezclas sintéticas de trilaurina, triestearina; fructosa y sacarosa; narcotina y morfina. La fase estacionaria fue Zorbax BP Sil 5 µm, Aminopropil Spherisorb-NH<sub>2</sub> 3 µm, Micropack MCH octadecyl silica unida 3 µm.

El CO<sub>2</sub> también es utilizado como un medio en el cual se desarrollan reacciones de oxidación, tal como lo describe Dooley y Knoff<sup>94</sup>, al disolver tolueno y aire en CO<sub>2</sub> a 80 atm y 293-493°K, lo cual posibilita que el tolueno se oxide a velocidades bajas a benzaldehído, alcohol bencílico, isómeros del cresol y a una menor cantidad del productos de condensación y óxidos de carbón. Dooley<sup>95</sup> utiliza CO<sub>2</sub> supercrítico con tolueno o metanol para la extracción de DDT de suelo contaminado. La eficiencia de la extracción es función del disolvente y de la temperatura. La mezcla de CO<sub>2</sub> con 5% de tolueno, no mejoró la extracción de DDT obtenida con CO<sub>2</sub> solo, sin embargo, la remoción casi completa se dio con la mezcla CO<sub>2</sub>-MeOH a 40°C. Lahiere y Fair<sup>96</sup> estudian tres sistemas de extracción utilizando CO<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> líquido/2-

propanol/agua, CO<sub>2</sub> supercrítico/2-propanol/agua y CO<sub>2</sub> supercrítico/etanol/agua y los compara con un sistema convencional liquido-liquido: tolueno/acetona/agua; los estudios fueron hecho a pequeña escala. La extracción con fluido supercrítico, produjo una eficiencia global mayor que la extracción con líquidos. Los estudios fueron hechos con el objeto de establecer y cuantificar los parámetros que afectan la eficiencia de la transferencia de masa en la extracción a contracorriente. Fields y otros<sup>97</sup> también estudian los efectos de los modificadores 2-Propanol, acetonitrilo o diclorometano en CO<sub>2</sub> supercrítico como fase móvil en CFS capilar y observa la disminución de los tiempos de retención de los solidos de prueba a presión y temperatura constante. Los solutos fueron aromáticos y sustituidos. Goates y otros<sup>98</sup> detectan la formación de aerosol en el jet del detector por entrecruzamiento del jet con un rayo laser. La dispersión de la luz proporciona un diagnostico simple para establecer las condiciones de formación de aerosol de cualquier otro sistema particular.

El año 1988 se caracteriza por el desarrollo de sistemas acoplados, diseño de restrictores, disponibilidad comercial de los equipos de cromatografía de fluidos supercríticos, ampliación del uso del CO<sub>2</sub> tanto en extracciones como en cromatografía. McNally y Wheeler<sup>99</sup> hacen una adaptación instrumental que les permite acoplar en línea, extracción y cromatografía con fluidos supercríticos. Extraen productos agrícolas polares, de matrices complejas usando CO<sub>2</sub> supercrítico con pequeñas cantidades de modificadores polares como metanol. El disolvente pasa directamente por acción de una válvula y se monitorea por detección UV. La instrumentación fue un HPLC, un baño de enfriamiento de etilenglicol y detector UV. Las vasijas de extracción fueron columnas de HPLC de 25 cm por 4.6 mm de d.i. y botellas a presión; las columnas cromatograficas fueron de sílice y C<sub>18</sub>. Raynor y otros<sup>100</sup> aplican CFS al análisis de ecdisteroides, una familia de esteroides polihidroxilados.

Se analizan doce compuestos con una amplia variedad en polaridad, utilizando columnas empacadas y capilares y comparando sus eficiencias. La columna capilar de sílice fundida de 10 m por 50  $\mu\text{m}$  de d.i. es recubierta por una película de 0.25  $\mu\text{m}$  de cianopropilmetilpolisiloxano utilizando  $\text{CO}_2$  como fase móvil. La columna capilar produjo una resolución cuatro veces mayor que las empacadas. Lee y colaboradores<sup>101</sup> aplican CFS al análisis y separación de hidrocarburos saturados, olefínicos y aromáticos constituyentes de la gasolina, usando FID con fase móviles compatibles como  $\text{CO}_2$  y  $\text{SF}_6$ . Hawthorne y otros<sup>102</sup> aplican EFS-CG al análisis de olores y fragancias de una gran variedad de muestras de productos naturales, incluyendo especias, goma de mascar, cascara de naranja, madera de cedro, etc. demostrando que el método se puede desarrollar sin modificación de los aparatos disponibles. La extracción se hizo con  $\text{CO}_2$  supercrítico a 300 atm y 45°C usando una bomba SFT 250-TMP y se acopló directamente a un Cromatógrafo de Gases HP 5730. Se implementaron los sistemas EFS-CG-EM, usando ionización de impacto electrónico. Los resultados muestran que el sistema EFS-CG es también un poderoso método alternativo a los tradicionales de extracción, identificación y cuantificación de olores y fragancias de muestras solidas. Kalinoski y Smith<sup>103</sup> aplican HFR-CFS-EM al análisis de insecticidas organofosforados, desarrollando y aplicando una interfase de alta velocidad de flujo para CFS-EM, utilizando columnas de 100 por 1 mm, empacadas con Si de 5  $\mu\text{m}$  con fases unidas  $\text{C}_{18}$  y amino.  $\text{CO}_2$  como fase móvil. Fácilmente se obtienen niveles de  $10^{-3}$  ppm para estos compuestos de matrices naturales. Pinkston y otros<sup>104</sup> aplican también CFS-EM capilar al análisis de poli-dimetilsiloxanos y oligosacáridos, usando un cuadropolo de alta masa e inyección con división de flujo. Demuestran que la división en la inyección con columnas capilares de 50  $\mu\text{m}$  puede ser usada en CFS-EM a velocidades lineales similares a las usadas comúnmente en

CFS capilar. Especies moleculares pueden ser introducidas intactas a la fuente de ionización como soluto en CO<sub>2</sub> supercrítico a través de una simple interfase y ionizadas por EM de IQ. Mezclas complejas de hidrocarburos de alto peso molecular y gran polaridad fueron analizadas por Wright y otros<sup>105</sup> por CFS-EM con columnas capilares de diámetro pequeño empacadas usando una interfase para cada tipo de columna. Para las columnas capilares se usó DFI y para las empacadas HFR. Davies y otros<sup>106</sup> describen diferentes técnicas acopladas HPLC-CG, EFS-CG, CFS-CG, lo mismo que el diseño de interfases para CFS empacada/CG, CFS capilar/CG o CFS empacada/CFS capilar. Señalan también el sistema en línea EFS/CG, EFS/CFS o EFS/CFS/CFS y algunas aplicaciones. Clement y otros<sup>107</sup> hacen una revisión del desarrollo instrumental, avances tecnológicos y aplicaciones prácticas de la CG y CFS que abarca los años 1986-1987. Schwartz<sup>108</sup> investiga el uso de columnas de diámetro pequeño empacadas para CFS-SIMDIS (destilación simulada) y demuestra la utilidad de las columnas cortas. Utilizando una bomba Brownlee modelo SFC, un inyector Valco C14W de 0.1 µL, CO<sub>2</sub> como fase móvil y microcolumnas de 10 por 0.1 cm o 20 por 0.1 cm empacadas con polisiloxano, detector FID y un procesador SIMDIS, analizan muestras de polietileno, mostrando ventajas respecto a las columnas capilares de 50 µm. La columna permitió análisis rápido, buena reproducibilidad y cuantificación y no requirió división de flujo en la inyección ni en la detección. Chang y otros<sup>109</sup> evalúan el uso de polisiloxano cristalino líquido como fase estacionaria en CFS capilar. La resolución de HAPNs fue comparada a la obtenida en CG usando la misma fase estacionaria. Ashraf-khorassani y Taylor<sup>110</sup> separan exitosamente aminas aromáticas de una mezcla de compuestos nitrogenados utilizando columnas de HPLC de 4.6 mm de d.i. y columnas de diámetro pequeño empacadas, con detección UV, FTIR y FID. Estas separaciones son comparadas con las efectuadas en fase

normal e inversa en HPLC y resultaron con mayor resolución. Igualmente estudian<sup>111</sup> la estabilidad de una nueva fase estacionaria, polisiloxano entrecruzado con cianopropil (Deltabond), con CO<sub>2</sub> como fase móvil. La fase es probada en columnas empacadas y la actividad y eficiencia se compara contra la columna regular de ciano-propil. Schneiderman y otros<sup>112</sup> informan del uso de CO<sub>2</sub> supercrítico a 8000 psi y 60°C, para extraer un compuesto lipofílico, la menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) del alimento de ratas de laboratorio. La extracción cuantitativa solo dura 20 minutos. La menadiona es cuantificada usando HPLC en fase inversa, con un detector electroquímico. El método es rápido, selectivo y sensible. El extracto no requiere limpieza. Para confirmar la identificación de la menadiona aislada por EFS y cuantificada por HPLC se usa CG-EM. Strubinger y Selim<sup>113</sup> miden las isotermas de partición de n-pentano en 5% de fenilmetilsilicona, en presencia de 0, 0.5, 1.0 y 5.0% de metanol en n-pentano supercrítico a 220, 260 y 300°C y entre 500 y 850 psi de presión. Usando un equipo CG-EM modificado y columnas capilares de 22 m por 0.2 µm de d.i., observaron que la cantidad de n-pentano supercrítico absorbido por la fase estacionaria disminuyó cuando se incrementó la temperatura y la presión y fue solo ligeramente afectado por las concentraciones de metanol añadidas. La polaridad de la fase estacionaria fue afectada por la cantidad de metanol en ella.

En los ochenta, la CFS se encontraba en una etapa de establecimiento de las condiciones de diseño instrumental que permitieran ubicarla como una técnica analítica con reales ventajas complementarias de la CG y la HPLC. Aunque existían cromatógrafos de fluidos supercríticos como los presentados en la Conferencia de Pittsburg de 1986, manufacturados por Brownlee, Suprex, Isco, Milton-Roy, Lee Scientific y otros<sup>114</sup> las mejores condiciones instrumentales referidas al diseño de restrictores y de detectores no habían podido ser establecidas. El diseño de los restrictores de flujo que permitan



mantener presurizado el sistema hasta la detección, era una tarea a desarrollar por los investigadores, lo cual a su vez permitiría poder acoplar la técnica con detectores de alto rendimiento o universales tales como el de ionización de llama, FID y el espectrométrico de masa EM. Otra tendencia era acoplar CFS-NPD y CFS-TFIR, ya que existe una gran cantidad de trabajos al respecto.

La optimización de la eficiencia es notable también por el hecho de la utilización de columnas capilares de tubos abiertos de diámetro interno pequeño (25-100  $\mu\text{m}$ ), al igual que microcolumnas empacadas con partículas de diámetros pequeños (3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ ). Esto muestra la posibilidad de desarrollar sistemas de muy alta eficiencia. Por otra parte, el uso de fluidos supercríticos en los procesos de extracción en reemplazo de los disolventes orgánicos, muestra una tendencia a generalizarse, ya que además de producir mejores rendimientos, tiempos de análisis más cortos y acoplarse directamente a los procesos cromatográficos, representa disminución en costos (por el alto valor de los disolventes líquidos orgánicos) y en la contaminación del ambiente. Unir los procesos de extracción con fluidos supercríticos a los sistemas cromatográficos acoplados tales como EFS/CG/FID, EFS/CG/EM, EFS/CFS/FID, EFS/CFS/EM, EFS/CFS/TFIR, EFS/HPLC/EM, EFS/CCF era la tendencia de la década en el desarrollo de la técnica.

### **3.2 LA DÉCADA DE LOS NOVENTA**

La década de los 90 se caracteriza por un continuo crecimiento del potencial y de las aplicaciones de la CFS. Chester et al<sup>115</sup> en una detallada revisión del desarrollo de la técnica, muestran los avances logrados en CFS y EFS. Se avanza en el desarrollo de fases estacionarias quirales para separar racematos de sulfóxidos, aminoalcoholes y ácidos arilacéticos, a condiciones

sub y supercríticas. El uso del CO<sub>2</sub> se incrementó y experimentó la adición de modificadores como metanol y dioxano y su efecto en la separación y eficiencia de las columnas capilares y empacadas. También se amplía el uso de los detectores a los mas utilizados como el FID y el UV, los cuales son definidos como simples, confiables y sensibles; se suman el espectrométrico de masa, CFS-EM, usado con columnas capilares como interfase directa en el análisis de HAPNs y el sistema de detección CFS-FTIR. Se aplican sistemas CFS-FTIR y CFS-FTIR-FID. Otros detectores utilizados son el de ionización termoiónica, TID, en la separación de aminas, amidas y carbamatos con columnas capilares y utilizando N<sub>2</sub>O como fase móvil; el de espectrometría de movilidad iónica con columnas capilares y empacadas en la separación de benzofenonas usando CO<sub>2</sub> como fase móvil, modificada con metanol y con acetonitrilo; también se utilizó el detector de captura de electrones, ECD, con columnas empacadas en el estudio de mefloquina en sangre, utilizando n-pentano como fase móvil, modificada con butilamina y metanol.

La EFS y la CFS amplía su aplicación a diversas áreas de las ciencias; en productos naturales en la separación de isómeros de  $\alpha$  y  $\beta$  carotenos por CFS con columnas empacadas, de pesticidas, herbicidas, muestras ambientales, combustible fósil, compuestos de importancia biológicas, polímeros y aditivos, explosivos y propelentes, etc. De igual forma se producen en los noventa varios equipos de CFS.

V. Schurig y otros<sup>116</sup> separa enantiómeros de hexobarbital sobre una fase estacionaria chiral, Chirasil-DEX, empleando una misma columna de tubo abierto de 1m por 50  $\mu$ m de d.i. en CG, CFS, CF-Subcritica, HPLC y CEC, electrocromatografía capilar, utilizando CO<sub>2</sub> como fase móvil en los diferentes tipos de separaciones cromatográficas, estudiando los efectos de variación

de presión y temperatura sobre la eficiencia de la separación. A destacar, el uso del cromatógrafo de fluidos supercríticos, Carlo Erba SFC 3000. Whatley J.<sup>117</sup> establece la técnica cromatográfica analítica y preparativa para la separación de varios de compuestos análogos racémicos de glibenclamida, sobre fases estacionarias quirales de celulosa y amilosa, empacadas en columnas preparativas de 250 mm x 10 mm de d.i. Se observó la conveniencia de CFS sobre la HPLC en la separación, debido al poder disolvente de los fluidos supercríticos, en este caso CO<sub>2</sub>, fácilmente controlado por la presión y la temperatura. También a destacar el uso del equipo de CFS Gilson SFC 3. Wilkins S. M. y otros<sup>118</sup> preparan un derivado quiral de antrilamina y lo adsorbieron sobre la superficie porosa de grafito y lo evaluaron como una fase estacionaria quiral, en la separación de los enantiómeros de dos agentes antiinflamatorios comerciales, ibuprofeno y flurbiprofeno, sobre columnas empacadas por cromatografía de fluidos sub y supercríticos, usando CO<sub>2</sub> modificado con 2-propanol como fase móvil. Bartle Keith y otros<sup>119</sup> construyen un equipo de CFS preparativa y lo utilizan en el estudio de la separación de una mezcla de fluoreno y fenantreno y lo comparan con un estudio realizado por HPLC. Concluyen que por CFS logran mejores separaciones y mas rápidas porque pueden optimizar la solubilidad y la difusión por control de la presión y temperatura del fluido supercrítico. La fase móvil utilizada es CO<sub>2</sub> a un flujo de 25 mL/min a 300 bar, la columna preparativa de HPLC de 250 mm x 20 mm de d.i. y la detección UV. En otro estudio, Yamada Aya y otros<sup>120</sup>, observan el comportamiento en la elusión de las resinas ácidas; una resina natural obtenida de las coníferas cuyo principal constituyente es una mezcla de varios diterpenos de ácidos carboxílicos, conocida como resinas ácidas. La separación se dio en una columna de CL de 250 mm x 4.6 mm de d.i. con fase de silica gel ODS de tamaño de partícula de 5 µm, de tamaño de poro

de 120 angstrom. La fase móvil fue CO<sub>2</sub> inicialmente sin modificadores y posteriormente se le adicionaron tres tipos de modificadores: agua, 1,4-dioxano y metanol. Los mejores resultados de forma y resolución de los picos se obtuvieron con metanol. La detección fue UV y el flujo se controló con un restrictor de capilar 300 mm x 50 µm de d.i. De acuerdo a los resultados algunos isómeros fueron separados sin la necesidad de derivatizar.

### **3.3 LA CFS EN ELSIGLO XXI**

Si en la década de los 80's se hizo énfasis en el desarrollo de la CFS con columnas capilares y se usaron detectores de CG como el FID, ECD y NPD; el siglo XXI viene al rescate de las columnas empacadas, en particular de las columnas de HPLC y de los sistemas acoplados CFS-EM. En esta primera década del siglo XXI se desarrollan estudios de los efectos de la presión sobre la retención de los solutos en la fase estacionaria, sobre la selectividad y resolución de las columnas, así como la influencia de los modificadores polares en la densidad de la fase móvil y por tanto en la retención y en la eficiencia de la columna. También se amplía la aplicación de la CFS a las separaciones de enantiómeros y el uso de fases estacionarias quirales, así como la implementación de líquidos iónicos como fases estacionarias. Se introduce y desarrolla la Cromatografía de Fluidos Subcríticos, SubFC, en estudio de diversos parámetros cromatográficos. Taylor<sup>121</sup> en una breve revisión señala como la primera década del presente siglo, es ampliamente aceptado el uso de columnas empacadas e inyectores de HPLC en la separación de un amplio espectro de compuestos como polímeros de bajo peso molecular y surfactantes aniónicos por SFC. A pesar del uso de columnas de tubo abierto en la separación de productos farmacéuticos, se encontró que las columnas empacadas tuvieron mayor demanda por su fácil acoplamiento a los detectores de espectrometría de masa y ultravioleta.

También se usaron detectores de absorción con arreglo de diodos y se amplió el uso a CFS preparativa en el aislamiento y purificación de compuestos farmacéuticos en escala de mg y g. Las columnas empacadas se usaron igualmente en las separaciones quirales y aquirales con acoplamiento a masa.

Gaudin et al<sup>122</sup> estudian los parámetros de retención en la separación de ceramidas en Cromatografía de Fluidos Subcríticos con columnas empacadas (pSubFC), utilizando un equipo de HPLC (Jasco) con columnas de octadecil silica (ODS) de 250x4.6 mm de d.i. utilizando CO<sub>2</sub> con modificadores como fase móvil. Stringham<sup>123</sup> produce separación quiral de aminas por pSubFS. Las aminas son análogos de fenilalanina, para ello utiliza un equipo Berger de CFS, etanol modificado con un ácido fuerte (ácido etanosulfónico.AES) como fase móvil, lo cual mejora significativamente la separación; la fase estacionaria quiral es un polisacárido Chiralpak AD-H y Chiralcel OD-H de 250x4.6 mm; sistema de detección UV y se estudian y calculan factores de retención, selectividad y resolución de los picos. West y Lesselier<sup>124</sup> estudian los efectos de diferentes modificadores de la fase móvil CO<sub>2</sub> sobre las interacciones entre el soluto y los poros del grafito que se utiliza como fase estacionaria y el soluto y la fase móvil modificada, utilizando SubFS. El estudio se realiza sobre una muestra que contiene 49 compuestos derivados del benceno y del naftaleno; la fase móvil, CO<sub>2</sub> se utiliza con cada uno de los modificadores metanol, etanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, isopropanol, n-propanol y hexano; la fase estacionaria es una columna de grafito Hypercarb de 100x4.6 mm y la separación se realiza en un cromatografo de FS manufacturado por Jasco. Gurdlae y otros<sup>125</sup> miden el volumen muerto en la separación de una serie homóloga de alquilbencenos, C<sub>1</sub> a C<sub>19</sub>, utilizando acetonitrilo como marcador de volumen muerto. La separación por pSubFC se realiza en un equipo de CFS Gilson SF3 con

detección UV/Visible, usando CO<sub>2</sub> con modificadores, como fase móvil, cuya proporción influye en los parámetros de retención y separación y dos tipos de columnas ODS como fase estacionaria: Kromasil C18 e Hypersil ODS, ambas de 250 mm, 4.6 mm, 5 µm. La variación de la densidad de fase móvil y por tanto la adsorción de los componentes sobre la fase estacionaria induce a la variación del volumen muerto aparente, los cuales pueden ser medidos.

Hirata, Tsuda e Imamura<sup>126</sup> colocan en serie dos columnas capilares de diferente polaridad DB-1 y DB-WAX, acopladas por un restrictor y un controlador de presión, para separar una mezcla de n-alcanos (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), esterres metílicos de ácidos grasos y n-alcoholes (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>), utilizando un cromatógrafo de gases GC-14A de Shimadzu con dos detectores FID y como fase móvi CO<sub>2</sub>l. Se estudian los efectos de la diferencia de presión sobre la selectividad de las columnas, cambiando la presión con el selector cambia la selectividad. Rajendran et al<sup>127</sup> realizan un estudio sobre los efectos que la variación de concentración de modificadores, de la presión y de temperatura producen sobre la retención, la selectividad y la resolución, mediante la separación de una mezcla racémica de 1-fenil-1-propanol sobre una fase estacionaria quiral, Chiralcel OD, usando CO<sub>2</sub> modificado con MeOH como fase móvil y detección UV. Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones del modificador: 2.4, 4.7, 7.1 y 9.5 %(p/p); cuatro diferente presiones: 125, 155, 185 y 215 bar, a dso diferentes temperaturas, 30 y 40<sup>a</sup>C. se encontró que las separaciones se produjeron con mejor selectividad y resolución a los 30<sup>a</sup>C. Toribio y otros<sup>128</sup> realizan un estudio comparativo de separación enantiomérica de varias drogas antiulcerosas tales como omeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol, por HPLC y CFS. Para HPLC, se utilizó un cromatógrafo líquido Constantmetric II de Milton Roy con detección UV y como fase móvil una mezcla binaria de hexano-etano o

hexano/2-propanol y para CFS el cromatógrafo usado fue un HP 1205 de Hewlett-Packard con detección de arreglo de diodos (DAD) y CO<sub>2</sub> como fase móvil. La columna para ambos fue Chiralpak AD de 250x4.6 mm, empacada con silica-gel de 10 µm recubierta con 3,5-dimetilfenilcarbamato derivado de amilosa. La separación quiral por HPLC se alcanzó solo para omeprazol y pantoprazol y la CFS permitió la separación de todos los compuestos estudiados. Chou y otros<sup>129</sup> usan SubFS y CFS en la separación de compuestos ácidos, básicos y neutros, utilizando un líquido iónico funcionalizado como fase estacionaria. Acetaminofén, metropolol, fenoprofeno, ibuprofeno, naftaleno y testosterona fueron los compuestos separados, utilizando un equipo de CFS Jasco PU-1580 con un detector HP-1100 de arreglo de diodos; CO<sub>2</sub> como fase móvil, modificado con MeOH, EtOH, acetonitrilo (MeCN) y mezclas de MeOH/MeCN y MeOH/H<sub>2</sub>O y como fase estacionaria se utilizaron columnas de Synergi Fusion-RP (columna A) y Sunfire C18 (columna B), ambas de 250x4.6 mm y una columna de 250x3.2 mm que contiene el líquido iónico cloruro de 1-octyl-3-propilimidazol. Se estudian los efectos de la presión y la temperatura sobre la retención de los compuestos ácidos, básicos y neutros (en general el aumento de presión reduce los tiempos de retención de los solutos), así como el efecto de los modificadores y se observa que el CO<sub>2</sub>-MeOH produce la separación de todos los compuestos y el incremento de la concentración del co-solvente reduce significativamente el tiempo de retención de los solutos. Y en el estudio del comportamiento y resolución de la columna, se observó que la columna con líquido iónico presentó mejor resolución, fue claramente superior a la columna comercial de C18. Poe y Schrodén<sup>130</sup> estudian los efectos del tamaño de las partículas de relleno de la columna y las condiciones térmicas sobre la retención de los solutos en CFS, teniendo en cuenta la separación de una serie de n-alcanos. El sistema de CFS se

construyó con una bomba de jeringa ISCO modelo 260D, un cromatógrafo de gases Varian modelo 2740 con detector FID, un inyector Valco CI4W, el cual fue colocado en el horno de la columna para acondicionamiento térmico y un restrictor de 30 cm y 50  $\mu\text{m}$  de d.i. se conectó a la salida de la columna; tres columnas de acero inoxidable, empacadas con Spherisorb C8 de diferente diámetro de partícula y de 15 x 2 mm fueron la fase estacionaria y el  $\text{CO}_2$  supercrítico la fase móvil. Una mezcla de alcanos con igual masa de n-dodecano, n-tetradecano, n-hexadecano y n-octadecano fue la muestra a separar. Se observó que a bajo flujo y baja caída de presión, la separación en las tres columnas es buena, los picos bien definidos, bien resueltos; y a bajas densidades la forma de los picos y la eficiencia se afectan progresivamente. La pérdida de eficiencia asociada con las grandes caídas de presión obedece a los procesos normales de ensanchamiento de bandas, al gradiente axial de densidad que resulta de la caída de presión y al gradiente radial de temperatura. Desmorteux et al<sup>131</sup> demuestran que CFS es un excelente método para investigar la composición de los aceites esenciales, en la separación por CFS de las furocumarinas componentes de aceites esencial de limón, con  $\text{CO}_2$ -EtOH 90:10 (v/v) como fase móvil, sobre diversas fases estacionarias; se estudian los diferentes parámetros analíticos como velocidad de flujo, porcentaje del modificador, temperatura y presión de salida; el equipo utilizado fue un Berger Minigram con detector UV a 310 nm. De igual forma François y Sandra<sup>132</sup> separan fenacetil ésteres de aceite de pescado mediante un sistema cromatográfico en línea, usando Silver-ion (SI) CFS y cromatografía de líquidos en fase reversa (RP-LC) bidimensional, acoplando dos columnas en serie con una interfase que es una válvula de posición. La fase móvil utilizada fue  $\text{CO}_2$ .



### 3.4 TENDENCIAS ACTUALES

En el año 2010 se observa la misma tendencia de los inicios del siglo XXI: el estudio y desarrollo de fases quirales para la separación de mezclas racémicas; el desarrollo de sistemas acoplados CFS-EM; desarrollo de técnicas CFS con columnas empacadas, p-CFS; desarrollo de cromatografía de fluidos subcríticos, Sub-CF; CFS bidimensional; estudios de parámetros cromatográficos; aplicación de CFS en síntesis bioinorgánicas y laboratorios de química médica, CFS preprativa y desarrollo de tecnologías limpias en las separaciones analíticas, como alternativas analíticas amigables con el ambiente.

Pirzada y colaboradores<sup>133</sup> hacen la evaluación de seis fases estacionarias quirales en la separación de una mezcla racémica de 48 compuestos por CFS utilizando CO<sub>2</sub> como fase móvil. En un instrumento de CFS Berger Analytical de Mettler-Toledo, con CO<sub>2</sub> modificado con MeOH y un horno conteniendo seis columnas (Chiralpak AD-H, Chiralcel OD-H, Chiralpak IC, Regiscell, Sepapak-2, Sepapak-3, Sepapak-4 y Kromasil Cellucoat) de 25 cm x 4.6 mm y partículas de 5 µm y detección UV con arreglo de diodos, DAD, producen la enantoseparación de 48 compuestos racémicos. Xie et al<sup>134</sup> utilizando un cromatógrafo Berger SFC MiniGram de Mettler-Toledo con detección UV y CO<sub>2</sub> modificado con MeOH, EtOH, IPA y MeCN como fase móvil, separan por CFS y Sub-CF una mezcla racémica de siete  $\gamma$ -lactonas ( $\gamma$ -C<sub>6</sub> -  $\gamma$ -C<sub>12</sub>) sobre fases estacionarias quirales contenidas en columnas de 250 x 4.6 mm empacadas con partículas de 10 µm como Chiralcel OD-H, Chiralcel OB-H, Chiralcel OJ-H y Chiralpak AD-H. Estudian los efectos de temperatura, presión, flujo de fase móvil y modificadores sobre la eficiencia y selectividad. Aurigemma y Farrell<sup>135</sup> utilizan CFS como una técnica ortogonal a HPLC, en el proceso de establecimiento de procedimientos o rutas rápidas

en el aislamiento y purificación de compuestos bases libres de muestras de laboratorios de química médica. Utilizando un cromatógrafo de fluidos supercríticos (Aurora Systems) conectado a HPLC-MS (Agilent 1100) y CO<sub>2</sub> modificado con MeOH como fase móvil, se pasó por sistema de seis columnas unos compuestos de origen farmacéuticos donados por Pfizer y se observó la separación en cada columna de 15 cm x 4.6 mm de d.i. y con partículas de 5 µm. La reducción de tiempo en el análisis y la pureza de los compuestos obtenidos validan el proceso 'FastTrack' implementado. Adam y otros<sup>136</sup> establecieron un sistema cromatográfico tri-dimensional consistente en la unión en línea de un sistema de CFS con un sistema bi-dimensional de CG el cual resultó en una herramienta analítica de alta resolución para la separación de las fracciones medias del destilado de petróleo, el cual una vez fraccionado por CFS se pasa al sistema de CG con dos columnas colocadas en un mismo horno. Alcanos, iso-alcanos, alquenos, naftenos y aromáticos de muestras de diesel se obtienen en una inyección sencilla; previamente los compuestos saturados e insaturados han sido previamente separados por CFS usando una columna de sílica cargada de plata. Los alquenos y naftenos son recuperados permitiendo su identificación en las muestras de diesel. La fase móvil fue CO<sub>2</sub> y la columna LiChrosphere Si 60, de 250 mm x 4.6 mm y el diámetro de partícula de 5 µm; la columna para CFS fue instalada en el horno de CG 5890. Los parámetros de la interfase son estudiados en estándares de parafinas, olefinas y otros hidrocarburos. Kaczmariski, Poe y Guiochon<sup>137</sup> desarrollan un modelo numérico de los perfiles de elución de una muestra de metano diluida en CO<sub>2</sub>. Como la fase móvil (CO<sub>2</sub>) es compresible, esta genera un moderado gradiente de presión a lo largo de la columna y bajo ciertas condiciones experimentales se producen caídas de presión, su densidad disminuye y esto resulta en una expansión por absorción de calor externo que enfría la columna; como resultado de este

transferencia de calor se produce un gradiente axial y radial de temperatura que afecta la velocidad de la fase móvil y los parámetros fisicoquímicos del sistema como viscosidad, coeficientes de difusión, etc., lo cual afecta los factores de retención y de separación. La parte experimental hace referencia a un sistema de CFS hecho en casa: una bomba de jeringa ISCO 260D, un CG Varian 2740 con FID. Dos columnas de Spherisorb C8 fueron utilizadas con las mismas dimensiones y diferentes tamaños de partículas. La fase móvil es CO<sub>2</sub>-MeOH. En otro trabajo relacionado con la síntesis, Nguyen y otros<sup>138</sup> utilizan CFS en el proceso de síntesis y evaluación antibacterial del compuesto 2-hydroxi-1-(1H-indol-3-yl)-4-metilpentano-3-ona, obtenido vía CFS preparativa quiral, junto con su isómero por tratamiento del ácido 2-hydroxi-3-(1H-indol-3-3yl) propiónico, ya que no pudieron aislarse por HPLC. Una vez aislados por CFS semi-preparativa quiral se procedió a su caracterización por RMN protónica y de <sup>13</sup>C, EM y rotación óptica.

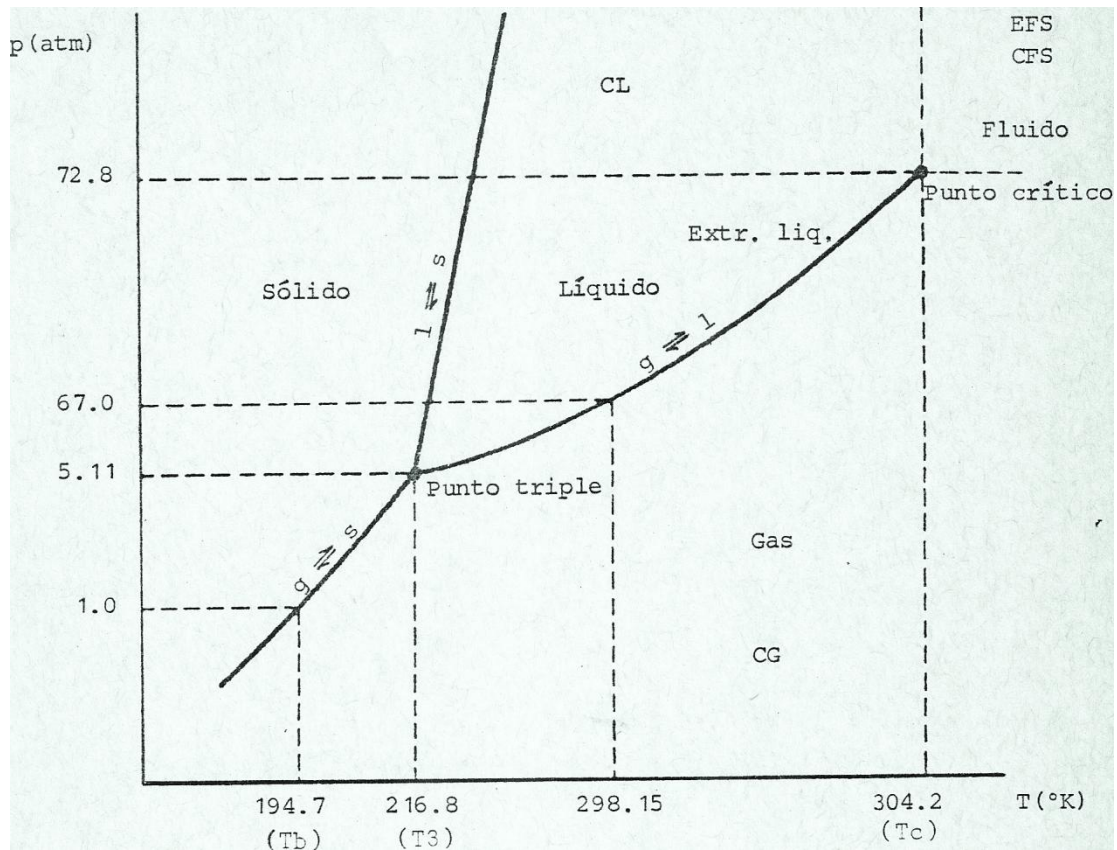
## 4. FUNDAMENTOS TEORICOS DE LA CFS.

### 4.1 PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRITICOS

A los fluidos supercríticos se les conoce también con los nombres de gases densos, gases de alta presión, gases de hiperpresión o gases de ultra alta presión. Las propiedades termodinámicas de un fluido, su estado crítico y sus características fisicoquímicas, que mencionaremos aquí, las referiremos al CO<sub>2</sub>, ya que como se pudo observar en la sección anterior, aparece como uno de los compuestos más importantes en extracción y cromatografía.

**4.1.1 Propiedades termodinámicas.** Las propiedades termodinámicas presión, volumen y temperatura (P, V y T), determinan el estado de un sistema y por tanto, entre estas tres variables existe una relación a través de la ecuación de estado,  $PV = nRT$ . Las únicas fases o estados utilizables como fase móvil en cromatografía son el líquido y el gaseoso, por el cual se tomarán en cuenta las relaciones P, T y P, V referidas a estos dos estados.

El diagrama de fases del CO<sub>2</sub> (P vs T)<sup>139</sup> de la figura 4, precisa los dominios en que se sitúan los tres estados de la materia: sólido (s), líquido (l) y gas (g). Las líneas representan las fronteras de los diferentes estados y corresponden a los equilibrios g-l, l-s y g-s. La frontera líquido-sólido indica que el punto de congelación se eleva a medida que se eleva la presión. En la curva gas-líquido, que separa el estado líquido del gaseoso, se nota que a una atmósfera el equilibrio líquido-gas no existe a ninguna temperatura, lo cual indica que el CO<sub>2</sub> sólido se sublima cuando se deja abierto a la atmósfera. Para que el CO<sub>2</sub> pase al estado líquido, es necesario ejercer por lo menos una presión de 5.11 atmósferas, correspondiente a su punto triple. Los tanques de CO<sub>2</sub> contienen por lo general CO<sub>2</sub> líquido, esto implica una presión de 67 atmósferas. La presión de sublimación, curva g-s y la presión



**Figura 4.** Diagrama de fases del Dióxido de Carbono

de fusión, curva l-s no son de interés para la CFS. A la temperatura  $T_3$  (216.8K) coexisten los tres estados líquido-sólido-gas. A una temperatura  $T_3 < T < T_C$  y una presión  $5.11 < p < 72.8$  el gas se condensa en liquido, distinguible de él por la presencia de una superficie visible. A  $T_c$  el líquido y el gas coexisten, tienen la misma densidad. La fase gaseosa y la fase líquida son continuas, no se puede distinguir una fase de otra. El estado es intermedio entre el líquido y el gaseoso y se le denomina crítico. A la temperatura  $T_C$  y presión  $P_C$  y por encima de ellas, un gas se convierte en líquido sin que aparezca una interfase. Si la temperatura y presión se alejan notablemente del punto crítico, es decir, si  $T$  y  $P$  son superiores a la temperatura y presión crítica, el estado se conoce como supercrítico.

La figura 5 muestra algunas características de las isothermas Presión-Densidad del CO<sub>2</sub>. En ella se observa que cuando la temperatura es inferior a la temperatura crítica existe dominio de la región de equilibrio liquido-gas y con ello una discontinuidad de las densidades de las fases líquida y vapor. El paso del estado líquido al gaseoso se hace a una temperatura que depende de la presión y esta es la presión en vapor saturado. A medida que se acerca a la isoterma crítica, la diferencia de densidades entre el líquido y el gas disminuyen, para anularse cuando se obtiene la temperatura crítica. Sobre la isoterma crítica la meseta se reduce al punto crítico.

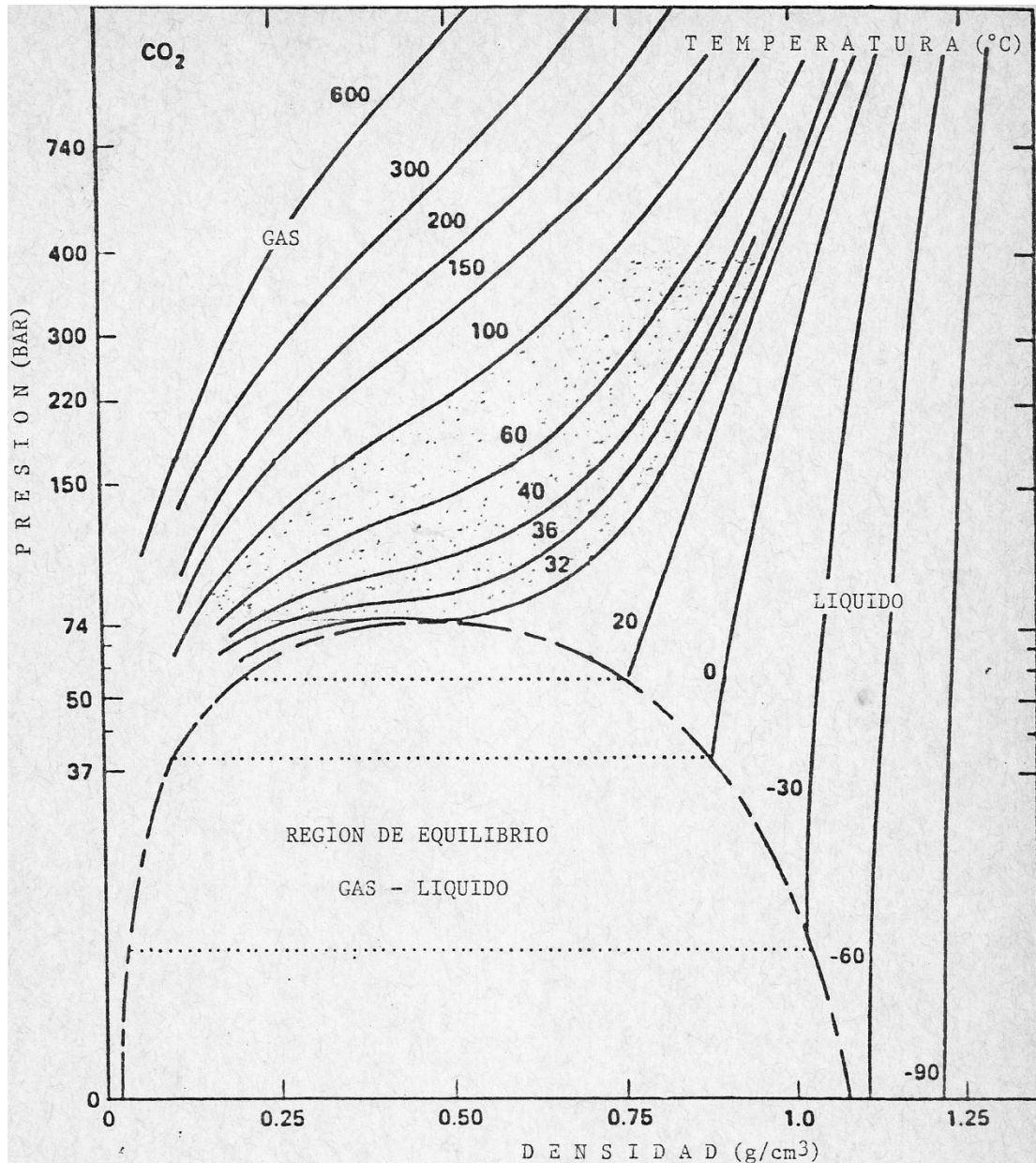
Para toda temperatura superior a T<sub>c</sub>, se puede observar que a un aumento continuo de la presión, corresponde un aumento de la densidad, con una variación continua de las propiedades fisicoquímicas del fluido.

La compresibilidad K<sub>T</sub>,

$$K_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T = \frac{1}{P} \left( \frac{\partial p}{\partial P} \right)_T \quad (2)$$

aumenta cuando la temperatura se aproxima a la temperatura crítica, esto se encuentra en la zona marcada de la figura 5. En el punto crítico K<sub>T</sub> tiende hacia el infinito; un ligero aumento de la presión produce un aumento importante en la densidad. Debido a que el poder solvatante para las sustancias poco volátiles se relaciona esencialmente con la densidad, este comportamiento es también de importancia fundamental para la CFS.

De acuerdo con la ley de los estados correspondientes<sup>140</sup>, todos los gases muestran relaciones PVT similares cuando son comparados en el mismo estado reducido; diagramas reducidos p-p similares al de CO<sub>2</sub> se tienen por otras sustancias las cuales se pueden usar como disolventes en EFS o como fase móvil en CFS. Algunas de ellas se presentan en la tabla I.



**Figura 5.** Isothermas p-ρ del CO<sub>2</sub> (P<sub>C</sub> 73.8 bar, T<sub>C</sub> 31°C). Las zonas de utilización para CFS aparecen sombreadas.

En realidad muchos de estos fluidos son poco utilizados, o son de uso restringido, especialmente los más polares, debido a que sus temperaturas

**TABLA I. Propiedades de algunos compuestos que pueden ser utilizados como disolventes en EFS o como fase móvil en CFS.**

Compuesto	T <sub>eb</sub> (°C)	T <sub>c</sub>	P <sub>c</sub>	ρ <sub>c</sub>
CO <sub>2</sub>	-78.5 <sup>a</sup>	31.3		0.448
NH <sub>3</sub>	-33.4	132.3	111.	0.24
H <sub>2</sub> O	100	374.4	226.	0.344
Metanol	64.7	240.5	78.9	0.272
Etanol	78.4	243.4	63.0	0.276
Isopropanol	82.5	235.3	47.0	0.273
SO <sub>2</sub>	-10	157.5	77.6	0.524
Hexafluoruro de azufre	-63.8 <sup>a</sup>	45.6	37.1	0.752
Etano	-88	32.4	48.3	0.203
n-propano	-44.5	96.8	42.0	0.220
n-butano	-0.5	152.0	37.5	0.228
n-pentano	36.3	196.6	33.3	0.232
n-hexano	69.0	234.2	29.6	0.234
2,3-dimetilbutano	58.0	226.8	31.0	0.241
Benceno	80.1	288.9	48.3	0.302
Diclorodifluorometano	-29.8	111.7	39.4	0.558
Diclorofluorometano	8,9	178.5	51.	0.522
Triclorofluorometano	23.7	196.6	41.7	0.554
1, 2-diclorotetrafluoroetano	3.5	146.1	35.5	0.582
Clorotrifluorometano	81.4	28.8	39.0	0.58
N <sub>2</sub> O	-89	36.5	71.4	0.457
Dietiléter	34.6	193.6	36.3	0.267
Etilmetiléter	7.6	164.7	43.4	0.272

<sup>a</sup> Sublimación.

críticas son muy elevadas y a que destruyen a la mayor parte de los solutos. Por ejemplo, se sabe que numerosos compuestos orgánicos son degradados

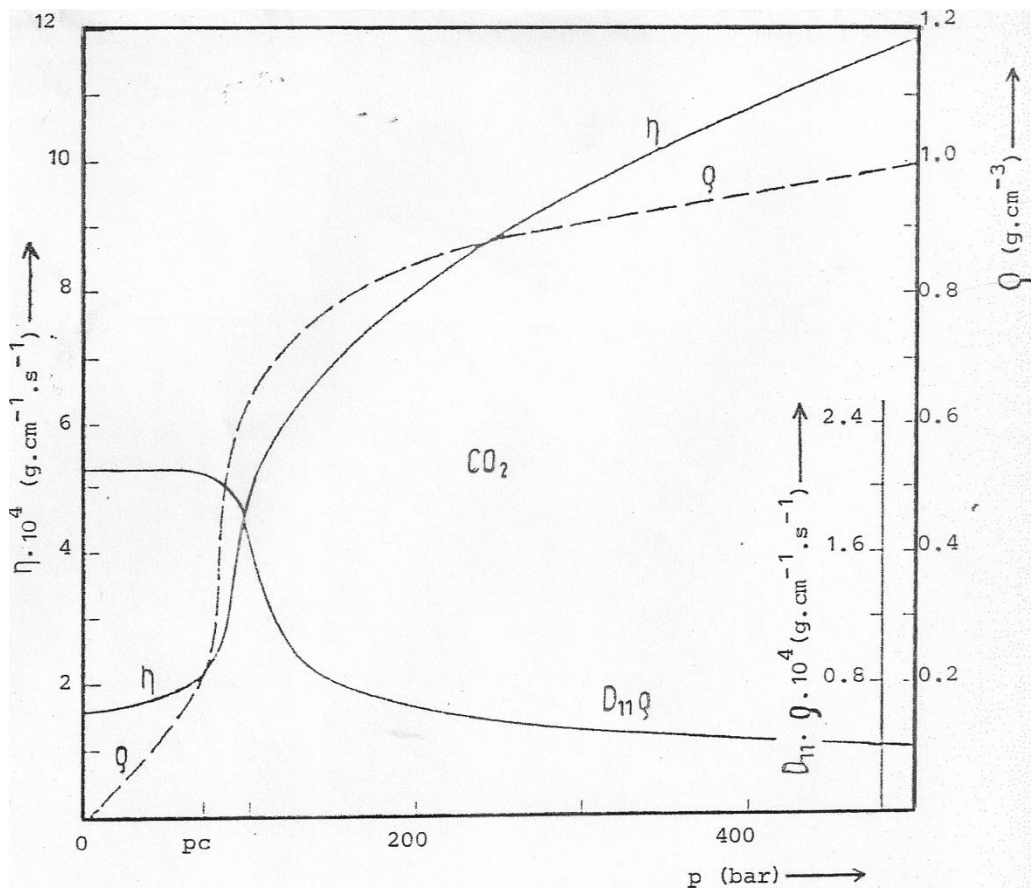


en el agua supercrítica; las fases de naturaleza orgánica, serían igualmente inutilizables. Una de las sustancias más usadas en EFS y CFS es el CO<sub>2</sub>, por las siguientes razones:

- Baja temperatura y presión crítica, 31°C y 73 atm., lo cual permite su uso sin mucha consideración instrumental especial.
- Alta capacidad de solvatación, lo cual lo hace un excelente disolvente de muchos materiales.
- Compatibilidad de su temperatura crítica con las fases químicamente unidas.
- Su baja temperatura crítica permite separar compuestos termolábiles.
- No ofrece riesgos o peligros en su manejo, porque no es tóxico, no es inflamable ni corrosivo.
- Es amigable con el medio ambiente
- No posee olor, ni color; es de bajo costo y de fácil producción.
- Se encuentra disponible en alto grado de pureza.
- La recuperación del soluto es una cromatografía preparativa es fácil.
- Es transparente a 200 nm.
- En estado líquido o en fluido supercrítico tiene baja viscosidad, lo cual permite altas velocidades de flujo y separaciones más rápidas.
- Tiene alta difusividad, lo que permite separaciones eficientes.
- Es compatible con un amplio rango de sistemas de detección.
- El CO<sub>2</sub> no es oxidable y permite el uso de FID o de NPD.
- Su ventana espectral permite el uso de detectores espectroscópicos (IR, UV, EM).

**4.1.2 Propiedades Físicoquímicas.** La influencia de la naturaleza y de la composición del fluido supercrítico es determinante en la calidad de una separación, por lo tanto es importante conocer las propiedades de transporte

de un método dinámico de separación, como la CFS cuya fase móvil consiste en un gas o líquido puro a condiciones supercríticas y los solutos a separar se encuentran en soluciones diluidas. La densidad  $\rho$ , la viscosidad  $\eta$  y el coeficiente de difusión  $D$  del fluido supercrítico se discutirán brevemente, señalando las propiedades de transporte de un gas, como el  $\text{CO}_2$ . La figura 6 representa las variaciones de estos parámetros en función de la presión.



**Figura 6.** Densidad  $\rho$ , viscosidad  $\eta$  y difusión  $D_{11}$  para el  $\text{CO}_2$  puro, como una función de la presión a  $40^\circ\text{C}$ .  $D_{11}$  es el coeficiente de autodifusión. (Fuente: Schneider G.M., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17, 716 (1978))

De acuerdo con esta figura, la viscosidad del CO<sub>2</sub> a 40°C (que está 9°C aproximadamente por encima de la temperatura crítica) permanece más o menos constante cuando se aumenta la presión hasta su valor crítico (aprox. 70 bars) y aumenta significativamente a presiones mayores hasta una viscosidad semejante a la de los líquidos. Correspondientemente el producto D.ρ es prácticamente constante hasta la presión crítica y varía fuertemente en la vecindad inmediata de esta y a altas presiones disminuye ligeramente. En el intervalo de presión entre p<sub>c</sub> y 200 bar aproximadamente, los coeficientes de autodifusión permanecen entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>. Estas propiedades se encuentran relacionadas en la tabla II, en la cual se comparan los órdenes de magnitud más importantes de los fluidos supercríticos con los valores característicos para gases y líquidos.

**TABLA II. Valores típicos de las propiedades fisicoquímicas de gases, líquidos y fluidos supercríticos.**

<b>PROPIEDAD</b>	<b>GASES (stp)</b>	<b>FLUIDOS SUPERCRTICOS</b>	<b>LIQUIDOS (stp)</b>
<b>Densidad, ρ (g/mL)</b>	0.6 - 2 x 10 <sup>-3</sup>	0.3 - 0.9	0.6 - 1.6
<b>Viscosidad, η (g/cm.s)</b>	1 - 3 x 10 <sup>-4</sup>	1 - 9 x 10 <sup>-2</sup>	0.002 - 0.03
<b>Coefficiente de difusión, D (cm<sup>2</sup>/s)</b>	1 - 4 x 10 <sup>-1</sup>	0.007 - 0.002	0.2 - 2 x 10 <sup>-9</sup>

Se observa que la densidad de un fluido supercrítico aunque depende de la presión, está mucho más cerca de la densidad de un líquido que de un gas y proporciona fluido la capacidad de realizar el transporte de masa sin necesidad de volatilizar el soluto.

La viscosidad tiene un valor ligeramente superior al del gas pero es 10 o 100 veces inferior a la del líquido. Esto es importante porque la viscosidad es responsable de la caída de presión en una columna cromatográfica (ley de Darcy). La viscosidad aumenta con la presión y se relaciona con la densidad del líquido por la siguiente expresión<sup>141</sup>:

$$\frac{1}{\eta} = \beta \frac{V - V_0}{V_0} \quad (3)$$

Donde  $V$  es el volumen molar del fluido;  $V_0$  el volumen molar del fluido cuando  $\eta$  tiende a infinito;  $\beta$  es una constante que depende del fluido y es aproximadamente igual a  $18 \text{ cP}^{-1}$  para los disolventes comunes. Como la viscosidad del fluido tiene un valor comparable a la de los líquidos cuando se somete a altas presiones, entonces la densidad se iguala a la de los líquidos y con ello se pierde en cromatografía un gran número de ventajas del estado supercrítico con respecto a los líquidos. Se nota, sin embargo, que aumentando la presión y combinando con la temperatura, la viscosidad se aleja un poco de la de los líquidos, mostrando que la CFS tiene un campo de aplicación muy amplio.

El coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil es un parámetro importante en cromatografía, porque regula en particular los procesos de transferencia de masa. Se observa que el coeficiente de autodifusión de un fluido supercrítico es intermedio entre un líquido y un gas. El coeficiente de autodifusión de los líquidos es inversamente proporcional a su viscosidad. Para un gas es igual a la razón  $\eta/\rho$ . Como la viscosidad es independiente de la presión en la región  $p < p_c$ , el producto  $D \cdot \rho$  es constante en esta región; sin embargo, en los fluidos supercríticos y en las vecindades del punto crítico, esta relación no se verifica. El producto  $D \cdot \eta \cdot \rho$  es de todas formas sensiblemente constante (no varía más que el 20% cuando pasa de 50 a

500 bars). El coeficiente de difusión depende fuertemente de la temperatura a presión constante.

En general los valores de los coeficientes de difusión del soluto en el CO<sub>2</sub> supercrítico son intermedios entre los de líquidos y gases; son de todas formas ligeramente inferiores a los valores del coeficiente de autodifusión del CO<sub>2</sub> supercrítico.

**4.1.3 Solubilidad de los compuestos en los fluidos supercríticos.** La retención en cromatografía es fuertemente dependiente la solubilidad del soluto en la fase móvil. Hildebrand propuso un parámetro de solubilidad  $\delta$ , para líquidos y lo definió como:

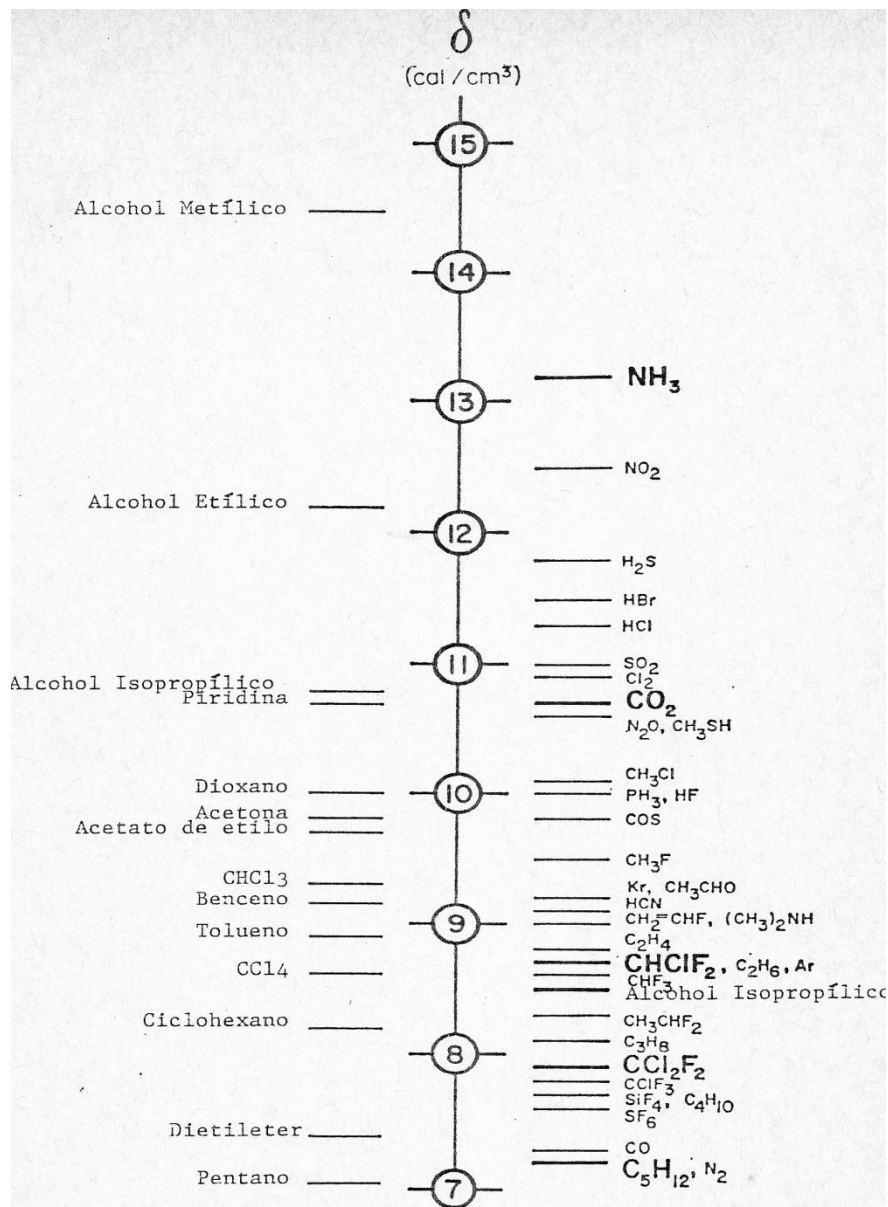
$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta H}{V}} \quad (4)$$

Donde  $\Delta H$  es el calor de vaporización y  $V$  es el volumen molar<sup>16</sup>. Giddings y otros<sup>11</sup> posteriormente describieron las bases teóricas para el uso del parámetro de solubilidad  $\delta$  en una fase gaseosa no ideal y predicen la solubilidad de un soluto en un disolvente. Para los, fluidos supercríticos,  $\delta$  se representa por:

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} (\rho_r / \rho_{rL}) \quad (5)$$

Donde  $P_c$  es la presión crítica del fluido expresada en atmósferas,  $\rho_r$  es la densidad reducida del fluido a una temperatura y presión dadas y  $\rho_{rL}$  es la densidad reducida del líquido. El parámetro de solubilidad  $\delta$  se expresa en  $\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2}$  y depende de dos efectos según Giddings, el “efecto de estado” o “efecto físico” que lo identifica con el factor  $(\rho_r / \rho_{rL})$ , donde la principal variable es  $\rho_r$  y el “efecto químico” que lo asocia al factor  $1.25 P_c^{1/2}$ , que ha

sido usado para relacionar los fenómenos de solubilidad en los líquidos. Con esta ecuación Giddings al igual que Hildebrand, construyen una serie eluotrópica para gases densos y la comparan con una serie para líquidos. Al respecto ver figura 7



**Figura 7.** Serie eluotrópica de gases a la densidad de líquidos, comparada con una serie para líquidos comunes. Los gases usados exitosamente, aparecen en negrillas.

Un incremento en la densidad de la fase móvil supercrítica, resulta en un parámetro de solubilidad más alto; generalmente son necesarios valores altos de  $\delta$  para sustancias de alto peso molecular. Sin embargo, es la menor densidad de los fluidos supercríticos con respecto a la de los líquidos, la que proporciona las bases para una eficiencia cromatográfica potencialmente alta de los fluidos.

En el caso de una solución regular se obtiene<sup>142</sup>

$$\ln \frac{X_0}{X} = -\frac{\Phi^2 V_0 (\delta - \delta_0)^2}{RT} \quad (6)$$

donde  $X_0$  es la fracción molar del soluto,  $X$  la fracción molar del fluido ( $\sim 1$ ),  $\Phi$  es la fracción de densidad del fluido,  $V_0$  es el volumen molar del soluto;  $\delta_0$  es el parámetro de solubilidad del soluto y  $\delta$  del fluido. Experimentalmente se muestra que el logaritmo de la fracción molar  $X_0$ , de un soluto en un fluido supercrítico, varía en función de  $\delta$  según una relación parabólica:

$$\log X_0 = -A\delta^2 + B\delta + C \quad (7)$$

donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes.

Sustituyendo  $\delta$  por su valor en la ecuación (5), se obtiene

$$\log X_0 = -A'\rho^2 + B'\rho + C' \quad (8)$$

donde  $A'$ ,  $B'$  y  $C'$  son constantes.

A bajas presiones existe una baja densidad del fluido supercrítico y el término  $A'\rho^2$  es despreciable; la ecuación anterior se simplifica a:

$$\log X_0 = B'\rho + C' \quad (9)$$

## 4.2 CROMATOGRAFIA CON FLUIDOS SUPERCRITICOS.

Como se ha observado, las propiedades de los fluidos supercríticos sitúan a la CFS como una técnica intermedia entre la cromatografía en fase líquida y la de fase gaseosa. Así pues, se puede combinar la selectividad de las fases líquidas (interacciones soluto-fase estacionaria, soluto-fase móvil y fase móvil-fase estacionaria) con la gran eficiencia por unidad de tiempo de la CG (valores elevados de los coeficientes de difusión en los fluidos supercríticos). Por otro lado, la viscosidad relativamente baja de los fluidos supercríticos compensan desde el punto de vista de la caída de presión, las mayores velocidades de las fases móviles usadas. En esta parte estudiaremos algunos parámetros cromatográficos que intervienen en la CFS: Retención, Selectividad y Eficiencia.

**4.2.1 Retención.** La retención en CFS es una función compleja de temperatura, presión, densidad y concentración de soluto<sup>143</sup> y va a depender esencialmente de las interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-fluido supercrítico; con frecuencia medidas por la solubilidad del soluto de este último. De todas maneras, con los fluidos supercríticos a temperaturas elevadas hay que tener en cuenta, además, la volatilidad del soluto.

En cromatografía la retención se mide por el factor de capacidad o factor de retención  $k'$  que relaciona los tiempos de retención  $t_R$  de una sustancia en estudio, con el tiempo de retención  $t_0$  de una sustancia que no interacciona con la fase estacionaria<sup>144</sup>.

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (10)$$

Donde:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (11)$$



y  $C_s$  y  $C_m$  son las concentraciones del soluto en las fases estacionaria y móvil respectivamente;  $V_s$  y  $V_m$  son los volúmenes de la fase estacionaria y móvil contenidos en la columna respectivamente;  $K$  es el coeficiente de distribución del soluto en las dos fases.

En general el logaritmo del factor de capacidad disminuye linealmente en función de la densidad del fluido supercrítico y la solubilidad del soluto en el fluido supercrítico es una función parabólica de la densidad del fluido. La relación:

$$\ln k' = a\rho^2 - b\rho + c \quad (12)$$

en la que  $a$ ,  $b$  y  $c$  son constantes, a bajas presiones el término  $a\rho^2$  es despreciable y hay una variación lineal del logaritmo del factor de capacidad con la densidad del fluido supercrítico. En CL existe una relación similar entre el log. de  $k'$  y la densidad, demostrando las analogías entre CFS y CL.

**Influencia del gradiente de presión.** La viscosidad de los fluidos supercríticos es 10 a 100 veces menor que la de los líquidos, así pues se puede concebir que las caídas de presión en CFS serán, para una misma velocidad, muy inferiores a las observadas en CL.

El gradiente de presión en una columna involucra una disminución de la densidad del fluido supercrítico, lo cual afecta negativamente la retención, la selectividad y la eficiencia de la columna. El gradiente de presión no debería tener ningún efecto importante sobre la eficiencia, en efecto, a primera instancia, el producto del coeficiente de difusión por la densidad  $D.p$  puede ser considerado como constante lejos del punto crítico (figura 6). Como en general se opera a un gasto volumétrico constante, la velocidad lineal del flujo en la columna es inversamente proporcional a la densidad y por lo tanto compensa exactamente las variaciones del coeficiente de difusión en la columna. Solo en las vecindades del punto crítico, el producto  $D.n.p$  puede

ser considerado como constante. De ello resulta que con un gasto constante, las variaciones del coeficiente de difusión  $D$  debido a las variaciones de viscosidad de la fase móvil no son compensadas exactamente y la eficiencia de la columna disminuye.

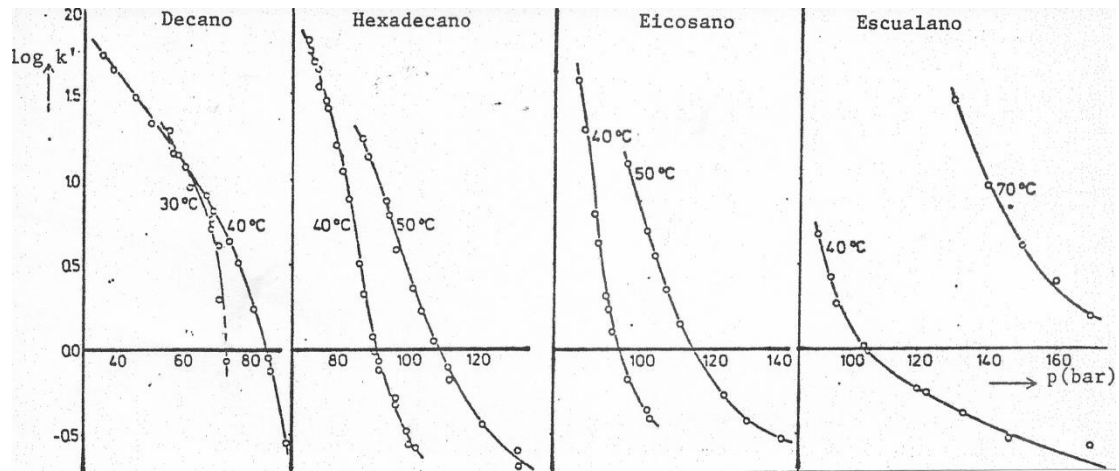
La disminución de la densidad causada por el gradiente de presión a lo largo de la columna, incorpora un aumento de la retención del soluto. Como el gasto de la fase móvil actúa directamente sobre la pérdida de carga, se puede deducir que el factor de capacidad medio del soluto depende indirectamente de éste gasto.

También la selectividad es afectada por los cambios de densidad a lo largo de la columna. La pérdida de resolución debido a estos efectos plantea la utilización de columnas empacadas con sílice, de diámetro de partícula grande, a fin de disminuir los gradientes de densidad a lo largo de la columna. Desde este punto de vista, las columnas capilares por su gran permeabilidad son muy fáciles de utilizar, pues las variaciones de la densidad a lo largo de la columna son despreciables.

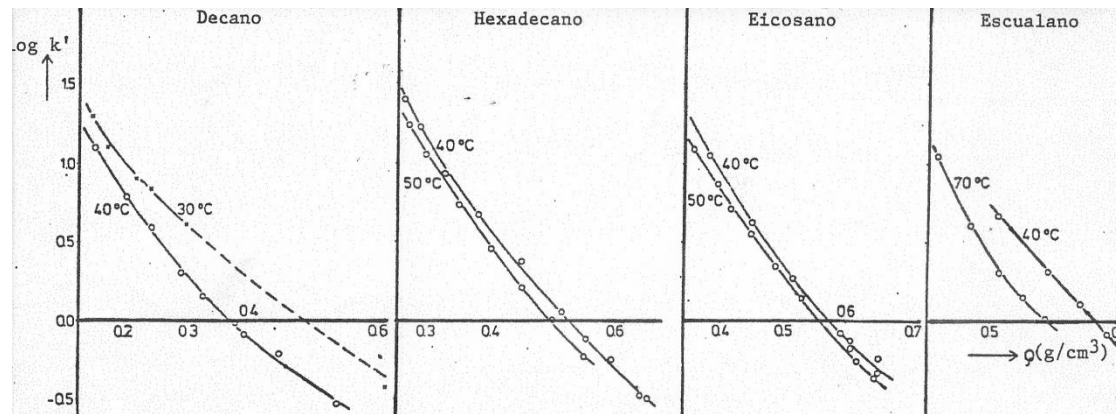
Otra aproximación consiste en disminuir las variaciones de la densidad en función de la presión, es decir  $(\partial\rho/\partial P)_T$ ; esto se puede hacer por dos vías: trabajar a presiones elevadas ( $P/P_C = 2$  o  $3$ ) para disminuir  $(\partial\rho/\partial P)_T$  que es máximo para una presión igual a la crítica; o seleccionar una temperatura de trabajo mucho más elevada que la temperatura crítica, lo que puede involucrar la degradación de la fase móvil o de soluto.

En general toda variación de presión tiene consecuencias sobre la densidad del fluido, es decir, sobre la retención del soluto. Un aumento de presión o de densidad a temperatura constante, trae consigo una disminución de la

retención, como se observa en las figuras 8 y 9. Esta disminución es mucho más importante cuándo se opera cerca del punto crítico.



**Figura 8.** Factor de capacidad  $k'$  en función de la presión y la temperatura de la fase móvil,  $\text{CO}_2$ . [Fuente: Grob K, Jr, Grob G. y Grob K. J.Chromatogr. 156, 1 (1978)]



**Figura 9.** Dependencia del factor de capacidad  $k'$  de la densidad y temperatura de la fase móvil,  $\text{CO}_2$ . [Fuente: Grob K, Jr, Grob G. y Grob K. J.Chromatogr. 156, 1 (1978)]

La disminución de los valores de  $k'$  por incremento de la presión o densidad, muestra que la relación  $V_s/V_m$  no depende sensiblemente de la presión. La disminución de  $k'$  es causada principalmente por un incremento rápido de  $C_m$  demostrando el incremento del poder solvatante del fluido supercrítico,

cuando se Incrementa la presión. El aumento de la solubilidad con la presión ha permitido desarrollar una técnica similar a la programación de temperatura en CG o de disolvente en HPLC. Al aumentar progresivamente la presión durante una separación, es posible eluir compuestos de pesos moleculares y polaridades variadas.

Paralelamente se ha desarrollado el concepto de *presión mínima de elución*. Existe una densidad mínima del fluido por debajo de la cual el soluto no es muy soluble, a esta densidad corresponde una presión mínima de elución. La Tabla III presenta algunos valores de esta presión mínima de elución en CO<sub>2</sub> supercrítico a 40°C.

**TABLA III.** Presión mínima de elución de diferentes solutos en CO<sub>2</sub> supercrítico a 40°C.

<b>Soluto</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Presión mínima</b>
<b>C<sub>18</sub>H<sub>38</sub></b>	254.5	87.5
<b>C<sub>22</sub>H<sub>46</sub></b>	310.5	89.8
<b>C<sub>36</sub>H<sub>74</sub></b>	507.1	104.8
<b>C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>OH</b>	172.3	61.2
<b>C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OH</b>	186.3	78.2
<b>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>OH</b>	270.5	98.7
<b>SE-30</b>		770
<b>Carbowax 400</b>	400	190
<b>Carbowax 20M</b>	20000	190
<b>Ftalato de nonilo</b>	418.6	165
<b>Apiezon L</b>		820

El efecto de la densidad de la fase móvil es el parámetro "clave" que gobierna la fuerza eluyente del fluido supercrítico. Actualmente se sustituye a

menudo la programación lineal de presión por una programación lineal de la densidad del fluido supercrítico y se impone una programación no lineal de presión para compensar el perfil no lineal de las isotermas presión-densidad. Una programación ideal permite eluir los miembros de una serie homóloga a intervalos de tiempos regulares.

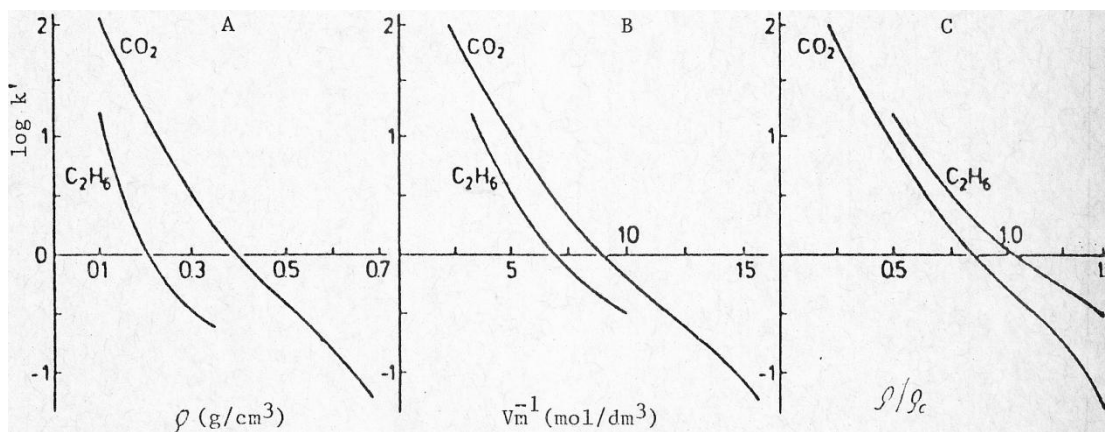
**Influencia de la Temperatura.** Las isotermas  $\log k'(p)$  de la figura 8 muestran una dependencia con la temperatura; cuando se incrementa la temperatura, a presión constante, las isotermas se desplazan a valores más altos de  $k'$ , indicando una disminución de la solubilidad del soluto en la fase móvil.

Se obtienen curvas más simples en la figura 9, donde el  $\log$  de  $k'$  es graficado contra la densidad de la fase móvil ( $p_m$ ). Estas curvas son casi lineales o muestran solo una ligera curvatura positiva y pueden ser fácilmente extrapoladas. Para todas las temperaturas y para todas las sustancias, son esencialmente paralelas y en contraste con la figura 8, una disminución de los valores de  $k'$  se obtiene cuando se incrementa la temperatura a densidad constante de la fase móvil.

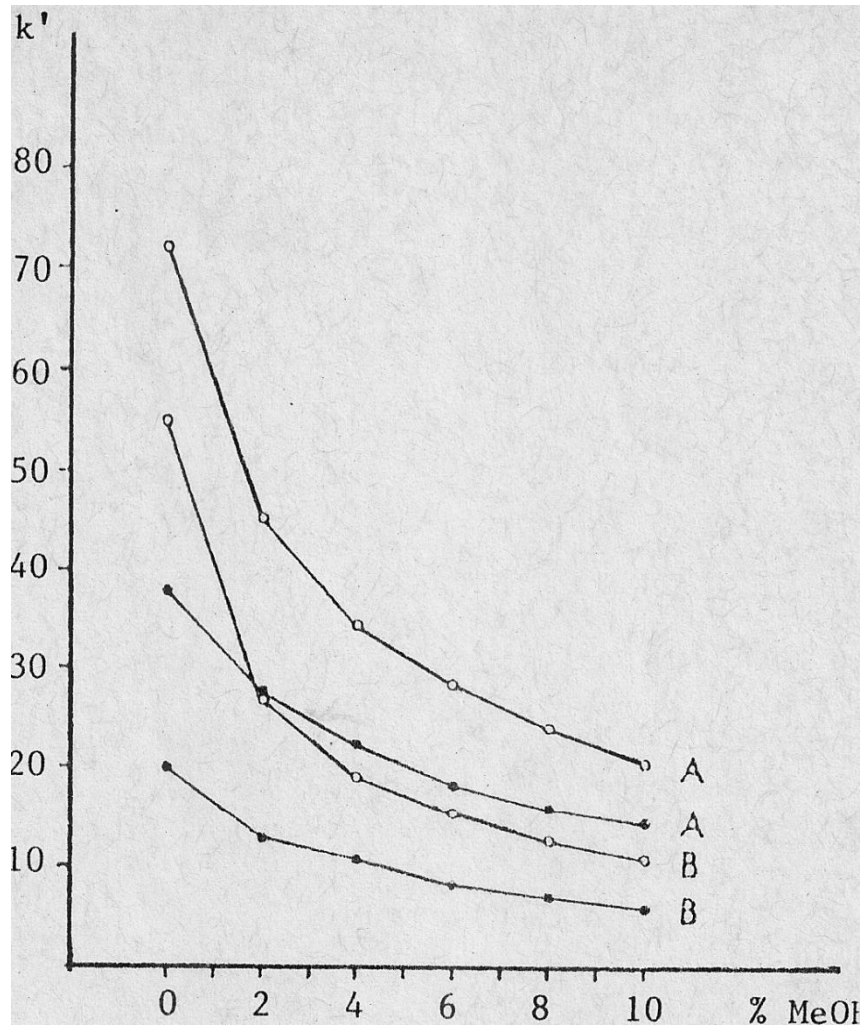
Sin embargo si se aumenta suficientemente la temperatura, el factor de capacidad se vuelve constante e incluso en algunos casos disminuye. Esto se explica por el hecho de que la dependencia de la retención con la temperatura no está determinada únicamente por la variación de la solubilidad del soluto, sino también por su volatilidad, como en CG.

La programación de temperatura es poco usada en CFS; más bien deberá procederse a un gradiente de temperatura decreciente, pero cuando se acerca a la temperatura crítica, las variaciones de densidad con la presión causan molestias.

**Influencia de la naturaleza del fluido supercrítico y de los modificadores polares.** La naturaleza del fluido supercrítico ejerce una marcada influencia sobre la retención, por lo que es posible modificar el factor de capacidad de los solutos, cambiando la naturaleza del fluido. La figura 10 muestra que los valores pequeños de  $k'$  obtenidos para el naftaleno, son causados por una mayor solubilidad del soluto en el etano que en el  $\text{CO}_2$  a densidad constante. Generalmente se prefiere disminuir el tiempo de retención de los solutos, agregando al fluido supercrítico pequeñas cantidades de disolventes polares, que van a permitir variar los valores de los factores de capacidad (ver figura 11).



**Figura 10.** Factor de capacidad  $k'$  del naftaleno en dos fases móviles,  $\text{CO}_2$  y  $\text{C}_2\text{H}_6$  a  $40^\circ\text{C}$  en función de A: densidad  $\rho$ , B: volumen molar recíproco  $1/V_m$  y C: densidad reducida  $\rho/\rho_c$ . [Fuente: Van Wasen y otros. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 575 (1980)]



**Figura 11.** Efectos del 0 – 10% de MeOH en CO<sub>2</sub> sobre la retención de benzo(ghi)perileno (A) y de 7-nitrobenzo(ghi)perileno (B) a 40°C y 180 bar sobre CP SpherC<sub>18</sub> y Novapak C<sub>18</sub>. [Fuente: Blilie A. y Greibrokk T. Anal. Chem. 57, 2239 (1985)]

**4.2.2 Selectividad.** La selectividad ( $\alpha$ ) entre dos compuestos 1 y 2, es definida por la relación de sus factores de capacidad  $k'$ ,

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (13)$$

con  $k'_2 > k'_1$ , o también

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (14)$$

Donde  $t'_R = t_R - t_0$  para los solutos 1 y 2, por lo tanto, los factores que afectan la retención, como el gradiente de presión al interior de la columna, la densidad, la presión, la temperatura, la naturaleza del fluido supercrítico, etc. afectan también la selectividad. Se ha encontrado<sup>17</sup> que en el caso de la elución de compuestos que pertenecen a una serie homóloga, por ejemplo alcanos, el aumento de la presión media dentro de una columna, trae como consecuencia una disminución de la selectividad. En efecto la pendiente de log de  $k'$  en función del número de átomos de carbono en una serie homóloga, disminuye con la presión.

Para una serie homóloga a presión constante, el log de  $k'$  es igual a una constante  $A$ , que está relacionada con la clase de compuesto y los demás miembros de la serie, diferenciándose cada uno por una unidad  $n$  que se repite e incrementa el log de  $k'$  de acuerdo a

$$\log k' = A + Bn \quad (15)$$

donde  $B$  es el cambio observado en el log de  $k'$  por la unidad que se repite.

Se había discutido anteriormente que el log  $k'$  es una función lineal decreciente de la densidad de un fluido, expresada por la relación

$$\log k' = a + B\rho \quad (16)$$

donde la constante  $\underline{a}$  puede verse como el log  $k'$  de cualquier soluto bajo condiciones de CG a la misma temperatura y  $\underline{b}$  es la velocidad de cambio de log  $k'$  como una función de la densidad.

Igualando estas ecuaciones y resolviendo para la pendiente  $B$ , tenemos:



$$B = \frac{a - b\rho - A}{n} \quad (17)$$

Simplificando, la constante da,

$$B = B_0 - m\rho \quad (18)$$

donde  $B_0$  y  $m$  son constantes. Cuando esta expresión se sustituye en la ecuación (15) se obtiene la siguiente:

$$\log k' = A + B_0 n - mn\rho \quad (19)$$

Debido a que la selectividad  $\alpha$ , es definida por  $k'_2 / k'_1$ , entonces,

$$\log \alpha = B_0 - m\rho \quad (20)$$

para dos miembros de la misma serie, que es igual a la ecuación (18).

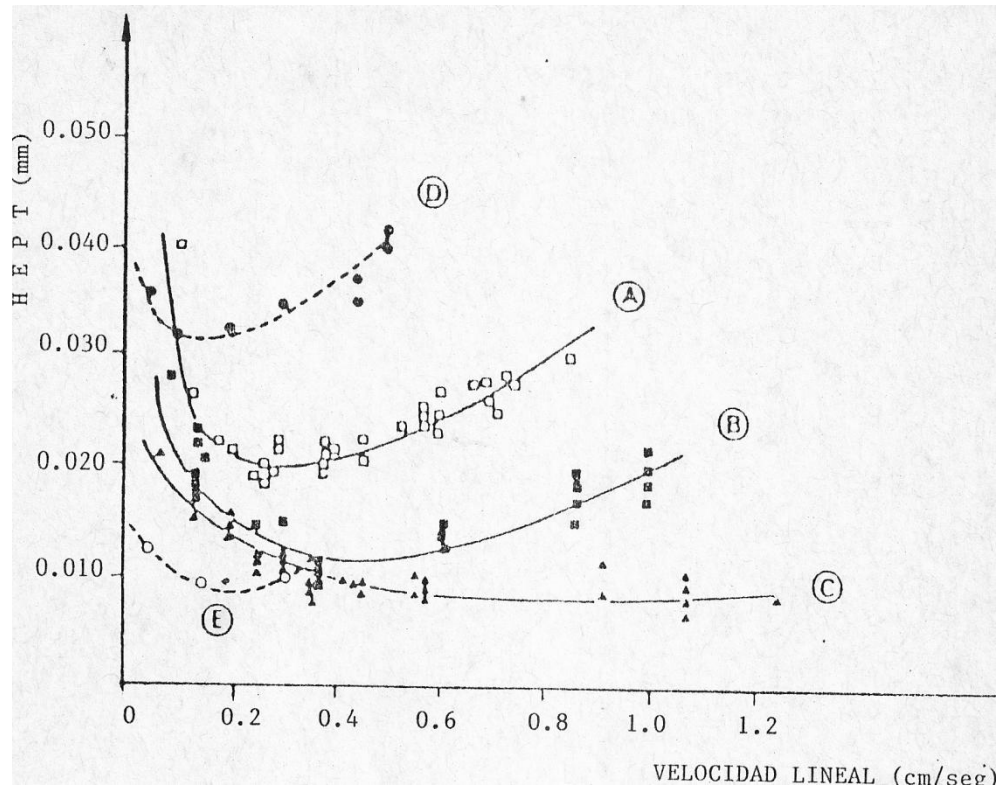
**4.2.3 Eficiencia.** La eficiencia de una columna cromatográfica es medida por su número de platos teóricos  $N$ . Si  $L$  es la longitud de la columna,  $H$  es la altura equivalente de un plato teórico que relaciona con  $N$  por medio de:

$$H = \frac{L}{N} \quad (21)$$

La figura 12 representa la variación de  $H$  en función de la velocidad lineal  $u$ , de la fase móvil, en el caso de la CFS y la CL. Estas variaciones de  $H$  en función de la velocidad lineal de la fase móvil  $u$ , se expresan en la ecuación de Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (22)$$

donde  $A$ ,  $B$  Y  $C$  son constantes.



**Figura 12.** HEPT vs.  $u$  de la fase móvil  $\text{CO}_2$ , para el naftaleno. (A), (B) y (C) corresponden a CFS con Spherisorb ODS de 10, 5 y 3  $\mu\text{m}$  de dp. (D) y (E) corresponden a HPLC con Spherisorb ODS de 10 y 3  $\mu\text{m}$  de dp. [Fuente: Gere D. y otros. Anal. Chem. 54, 736 (1982)]

La velocidad óptima,  $u_{\text{opt}}$ , correspondiente a la máxima eficiencia es sensiblemente proporcional a  $D_m / dp$ . Como se observó anteriormente, el coeficiente de difusión de un fluido supercrítico es superior por un factor de 10 - 100 veces al de un líquido, en consecuencia la velocidad lineal óptima de la fase móvil es 10 a 100 veces superior a la de HPLC. Estos valores elevados del coeficiente de difusión tienen una segunda ventaja, disminuye la resistencia a la transferencia de masa del soluto, que se traduce en una disminución del coeficiente C. La combinación de estos efectos permite utilizar grandes velocidades sin entrañar una pérdida notable de eficiencia, y

se gana en tiempo. En la figura 13 se observa que en la curva C, H es casi independiente de u. En la curva E y C, H tiene el mismo valor para un mismo diámetro de partícula con fase líquida o supercrítica; esto se explica por el hecho de que el término A dominante en el mínimo de la curva no hace intervenir el coeficiente de difusión, sino únicamente dp.

El tipo de flujo de la fase móvil al interior de la columna, tiene un notable efecto sobre la eficiencia y se encuentra caracterizado por una cantidad adimensional, el número de Reynolds, Re.

$$Re = \frac{\rho \cdot u \cdot dp}{\eta} \quad (23)$$

Donde  $\rho$  es la densidad del fluido, u la velocidad lineal de la fase móvil, dp el diámetro de partícula o de la columna si es de tubo abierto y  $\eta$  la viscosidad de la fase móvil. Un número de Reynolds elevado indica una tendencia a un flujo turbulento. En el caso de columnas abiertas la turbulencia se alcanza con Re superiores a 2000, mientras que para una columna empacada se consigue con Re entre 1 y 100. Los fluidos supercríticos alcanzan la condición de flujo turbulento más fácilmente que los gases o líquidos, debido a que su densidad es muy superior a la del gas (Tabla II) y la relación  $\rho/\eta$  se hace mayor. A su vez la viscosidad del fluido supercrítico disminuye con respecto a la de los líquidos, por tanto la relación  $\rho/\eta$  también se hace mayor. En CFS los valores de Re son en promedio mil veces mayores que en CG y 10 veces más grande que en CL. La turbulencia del flujo trae consigo un aumento de los coeficientes de difusión, que tiene por origen los movimientos desordenados dentro del fluido. Este aumento del coeficiente de difusión debe permitir un aumento de la eficiencia por unidad de tiempo. La desventaja de este flujo es que la difusión en la fase estacionaria debe ser rápida para que no retarde el proceso de equilibrio con el centro del flujo en la columna de tubo abierto o entre las partículas de la columna empacada.

Una columna de tubo abierto recubierta con una película delgada y uniforme, ha sido caracterizada por Golay en términos de la altura equivalente de un plato teórico.

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{(1 + 6K' + 11k'^2)d_c^2 \cdot u}{96(1 + k')^2 \cdot D_m} + \frac{2k'd_f^2 u}{3(1 + k')^2 D_s} \quad (24)$$

donde  $D_m$  es el coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil,  $k'$  es el factor de capacidad,  $d_c$  el diámetro de la columna,  $u$  la velocidad lineal de la fase móvil,  $d_f$  el espesor de la película de la fase estacionaria,  $D_s$  el coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

Como  $H = L/N$ , el número de platos teóricos está relacionado con la capacidad de resolución de dos compuestos, por la ecuación general de la resolución:

$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (25)$$

donde  $R_s$  es la resolución entre dos componentes,  $k'$  el factor de capacidad,  $\alpha$  la selectividad y  $N$  el número de platos teóricos. Para incrementar la resolución entre dos componentes es necesario incrementar cualquiera de los parámetros  $k'$ ,  $\alpha$  o  $N$ . Para incrementar  $N$  es necesario incrementar  $L$ , debido a que  $N$  es proporcional a  $L$ , ó disminuir  $H$  en la ecuación de Golay. Un camino para minimizar  $H$  es disminuir el diámetro de la columna y mantener la velocidad del flujo a un valor óptimo. La longitud de la columna podría incrementarse al mínimo necesario para alcanzar una resolución, aceptable. Debido a que el tiempo de análisis es directamente proporcional a la longitud de la columna, el tiempo necesario para realizar un análisis puede ser representado por:

$$t_R = \frac{NH(1 + k')}{16} \quad (27)$$

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

El proceso de diseño, construcción y desarrollo experimental del sistema de CFS se desarrolló en las siguientes etapas:

1. Montaje del sistema cromatográfico de CFS.
2. Evaluación del sistema con columnas empacadas
3. Evaluación del sistema con columnas capilares y diseño de los divisores y restrictores de flujo de fase móvil.
4. Preparación y evaluación de columnas capilares, empacadas y recubiertas.

### 5.1 MATERIALES Y EQUIPOS.

**5.1.1 Aparatos y equipos.** Se utilizó una bomba de jeringa de alta presión, Varían 8500. Tanque de CO<sub>2</sub> grado seco, 99.8%, Linde, Unión Carbide. Un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de llama. Un integrador Hewlett Packard 3390A. Válvulas de inyección Rheodyne 7520 de 0.5 µl de capacidad. Un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer LC-75 con detector UV. Una Bomba de recirculación de agua fría marca McMillan. Válvulas SSI # 02-0120 de dos vías y SSI # 02-0125 de tres vías y Conectores de acero inoxidable Valco de 1/16 de pulgada de d.e.

**5.1.2 Columnas.** Se utilizaron las siguientes columnas: Columna Micropak RP C<sub>18</sub>, 5 µm, 30 cm x 4 mm d.i. Columna capilar Hewlett-Packard de 6.5 m x 200 µm de d.i. recubierta con metilsilicona entrecruzada. Columnas de acero inoxidable de 0.5 y 1.0 mm de d.i. Columnas capilares recubiertas y microempacadas de 100 µm de d.i. columnas capilares sin fase de 5, 10, 13, 50, 100, 250 µm de d.i.

**5.1.3 Reactivos.** Como fase móvil se utilizó CO<sub>2</sub> grado seco, de 99.8% de pureza, obtenido de Linde, Unión Carbide. Una mezcla de EtOH-CCl<sub>4</sub> como

disolvente en una suspensión de R Sil-C<sub>18</sub> de llenado de una columna. Los solutos utilizados para el estudio de los parámetros cromatográficos son: pentano, heptano, tolueno. En la preparación y recubrimiento de la columna capilar por el método estático se utilizaron: HNO<sub>3</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, iso-octano, parafina, SE-54, peróxido de dicumilo, octametilciclosiloxano, la mezcla de Grob y una mezcla de hidrocarburos con C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub>.

## **5.2 MONTAJE DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE CFS.**

El tanque CO<sub>2</sub> se acopló a la bomba tipo jeringa Varian 8500 utilizando tubos de acero de 1/8" de d.e. y colocando entre ellos una válvula SSI de dos vías. La salida de la bomba se unió a la válvula de inyección Rheodyne 7520 utilizando tubos capilares de acero inoxidable de 1/16 " de d.e. Entre la bomba y el inyector se colocó una válvula SSI de tres vías con el propósito de purgar el sistema. La válvula de inyección se acopló a la columna del cromatógrafo de gases HP 5890, utilizando el mismo tipo de tubos capilares. La columna se acopló al detector haciendo uso de tubos capilares de sílices fundida de diámetro interno pequeño y longitud variada (restrictores). Se diseñaron divisores de flujo al sistema de inyección.

Un esquema del sistema de CFS construido en laboratorio de Cromatografía de Gases del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, se muestra en la figura 13.

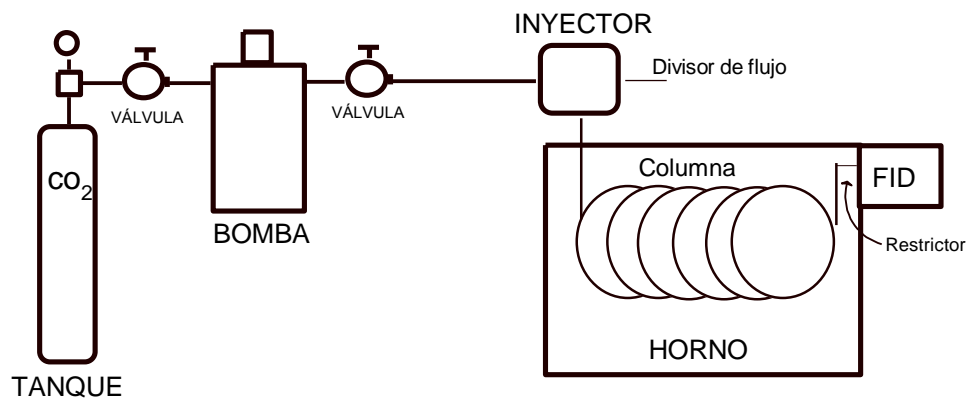


Figura 13. Esquema del sistema de CFS construido

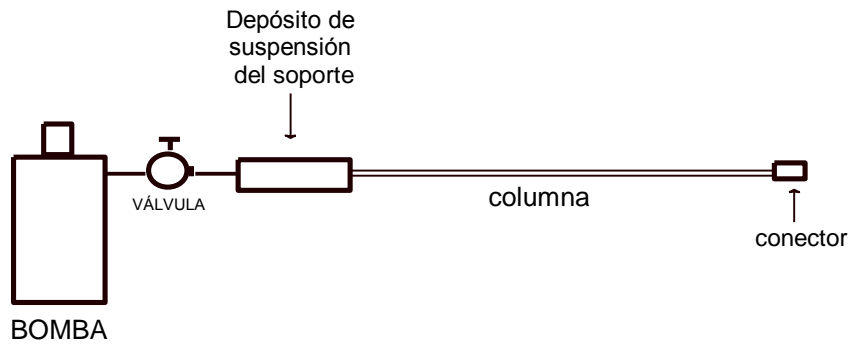
### 5.3 EVALUACIÓN DEL SISTEMA CON COLUMNAS EMPACADAS

**5.3.1 Columna Micropak RP C<sub>18</sub> 5 micras de 30 cm por 4 mm d.i.** La columna de acero inoxidable se instaló en el horno cromatográfico a 60°C y el detector a 300°C. Se diseñaron y probaron varios restrictores a la salida de la columna: un tubo de sílice fundida de 30 cm x 10 µm de d.i., un tubo de sílice fundida de 50 cm x 250 µm de d.i. con un extremo estirado; un tubo de acero inoxidable de 10 cm x 1/32" de d.e. con un extremo aplanado. De manera similar, se diseñó un divisor de flujo a la entrada de la columna. Haciendo uso de la bomba, se fijó un valor constante para el gasto volumétrico de 0.5 mL/min, con el propósito de obtener valores razonables de  $t_0$ .

**5.3.2. Columnas de acero inoxidable de 0.5 y 1.0 mm de d.i.** Un tubo de acero inoxidable de 50 cm por 0.5 mm de d.i. se empacó con R SIL-C<sub>18</sub> fase inversa de 5 µm, por el método de suspensión. Se preparó una suspensión del soporte, 60 mg, en 3 mL de una mezcla de EtOH absoluto y CCl<sub>4</sub>. (1:1). La suspensión se impulsó a través de la columna por medio de la bomba

Varían 8500, a una presión de 450 atm, con el arreglo que se muestra en la figura 14. Esta columna se instaló en el sistema con un restrictor de 250  $\mu\text{m}$  de d.i. y se corrieron algunas muestras de pentano, heptano y tolueno a 70°C.

Otra columna de acero de 30 cm x 1.0 mm de d.i. se empacó por el mismo método y con la misma fase y se evaluó como sistema de CL, utilizando una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O como disolvente, benceno como soluto y un detector UV Perkin Elmer LC-75.



**Figura 14.** Esquema del sistema de empaque de la columna por el método de la suspensión

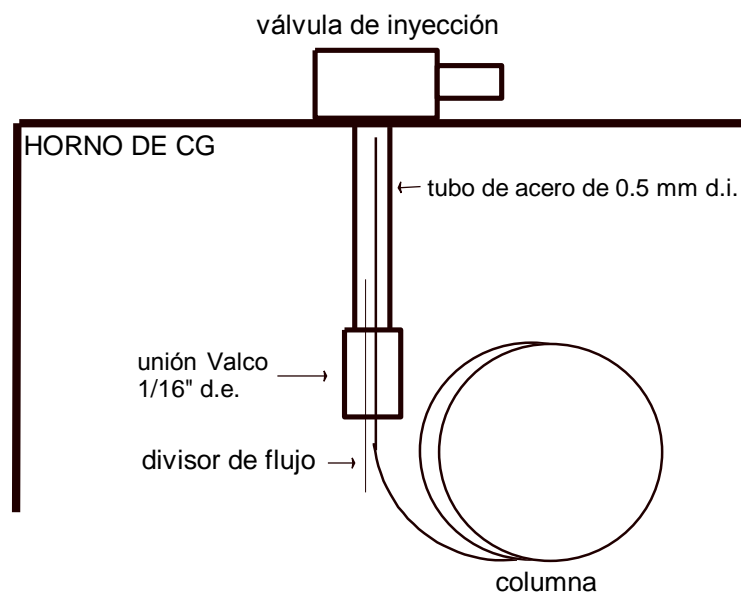
## 5.4 EVALUACIÓN DEL SISTEMA CON COLUMNAS CAPILARES.

**5.4.1 Columna capilar de sílice fundida de 200  $\mu\text{m}$  de d.i.** Se utilizó una columna capilar de sílice fundida de Hewlett Packard de 6.5 m de longitud por 200  $\mu\text{m}$  de d.i. recubierta con una película de 0.33  $\mu\text{m}$  de espesor de metilsilicona entrecruzada. La columna se instaló con un divisor de flujo en el sistema de inyección (figura 15) consistente de un tubo de sílice fundida de 8 cm por 50  $\mu\text{m}$  de d.i. y un restrictor a la salida de 11 cm por 10  $\mu\text{m}$  de d.i.



Con la columna instalada en el sistema se corrió una muestra de benceno a 200 atm. y 70 °C.

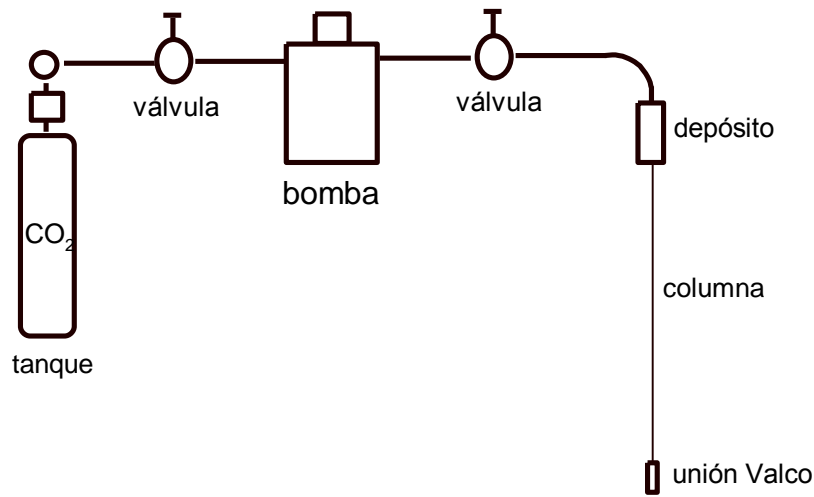
**5.4.2 Columna capilar de 100  $\mu\text{m}$  de d.i.** Una columna capilar de sílice fundida de 5 m por d.i. por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. por 116  $\mu\text{m}$  de d.e. sin fase, con un divisor de entrada consistente en un tubo de 15 cm por 48.5  $\mu\text{m}$  de d.i. por 141  $\mu\text{m}$  de d.e. y restrictor a la salida de 20 cm por 5  $\mu\text{m}$  de d.i. por 137  $\mu\text{m}$  de d.e., se instaló en el sistema y se corrió una muestra de benceno a 70 °C con el detector a 300 °C. Luego el restrictor se cortó a la mitad (10 cm), y se corrió la misma muestra a las mismas condiciones.



**Figura 15.** Esquema del divisor de flujo diseñado en el sistema de inyección. Divisor: tubo de sílice fundida de 8 cm x 50  $\mu\text{m}$  d.i. Columna: tubo de sílice fundida de 6.5 m x 0.2 mm d.i.

## **5.5 PREPARACIÓN DE COLUMNAS CAPILARES.**

**5.5.1 Preparación, empaque y evaluación de una columna capilar de 100 micras de diámetro interno.** Un tubo capilar de sílice fundida de 50 cm x 100  $\mu\text{m}$  de d.i. x 166  $\mu\text{m}$  de d.e. se empacó con Lichrospher Si-100 de 5  $\mu\text{m}$  recuperado. El llenado se hizo por el método de empaque en seco como lo describe Schneiderman M.A. y otros<sup>112</sup>. Para ello se tomaron 60 mg del soporte se colocaron en un depósito (tubo de acero inoxidable de 5 cm x 4 mm de d.i.) y se impulsaron al interior de la columna por medio de la bomba Varian 8500 utilizando  $\text{CO}_2$  líquido, a una presión de 300 atm. El empaquetamiento se realizó en un tiempo aproximado de 45 minutos. Una unión Valco con un filtro de acero se conectó a la salida de la columna para sostener el empaque; el peso de la unión permitió mantener la columna en posición vertical (ver figura 16). La columna empacada se instaló en el sistema de CFS con un divisor de flujo de 15 cm x 48.5  $\mu\text{m}$  de d.i. y un restrictor de 15 cm x 13  $\mu\text{m}$  de d.i. El control de la fase móvil se efectuó fijando la presión del  $\text{CO}_2$  líquido con la bomba. La evaluación de la columna se hizo con la separación de una mezcla de hidrocarburos: n-hexano, ciclohexano, ciclohexeno y benceno y otra de n-hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xilenos.



**Figura 16.** Esquema de empaque en seco de las columnas capilares.

**5.5.2 Preparación, recubrimiento y evaluación de una columna capilar de 100 micras de diámetro interno.** En la preparación de esta columna se utilizaron los siguientes elementos.

**Materiales:** 1.70 m de alambre acerado, para la elaboración del soporte; 7 m de tubo de sílices fundida de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. por 166  $\mu\text{m}$  de d.e.; papel aluminio; soplete de oxígeno-butano, N<sub>2</sub>.

**Compuestos químicos:** HNO<sub>3</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, iso-octano, parafina, SE-54, peróxido de dicumilo, octametilciclotetrasiloxano (D<sub>4</sub>), mezcla de Grob, mezcla de hidrocarburos C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub>.

**Aparatos:** Horno de CG Varían 2700, baño de agua doblemente aislante, bomba de vacío Feli-Welch modelo 1410, Cromatógrafo de gas HP 5890 con divisor de flujo y detector FID.

**5.5.2.1 Procedimiento.** La preparación y recubrimiento de la columna se hizo de acuerdo a los pasos señalados por Ogden y McNair<sup>145</sup>, que con algunas ligeras variaciones son:

**Tratamiento Hidrotérmico:** Consiste en llenar la columna con HNO<sub>3</sub> al 20%, sellarle los extremos y calentarla a 200°C por 12 horas; luego deshidratar a 225°C con flujo de N<sub>2</sub> por 90 minutos y enfriar.

**Desactivación:** Consiste en pasar lentamente D<sub>4</sub> a través de la columna; luego de salir todo el D<sub>4</sub>, se sellan los extremos, se envuelve la columna en papel aluminio y se caleinta a 400°C por 90 minutos en el horno Varian 2700.

**Recubrimiento:** Se utilizó un procedimiento estático de recubrimiento que consistió en llenar la columna con una solución de SE-54 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, recientemente preparada (0.008 g/mL); sellar uno de sus extremos con parafina y colocarla en un baño de agua doblemente aislado a una temperatura aproximada de 30°C. El disolvente se evaporó conectando el otro extremo de la columna a la bomba de vacío.

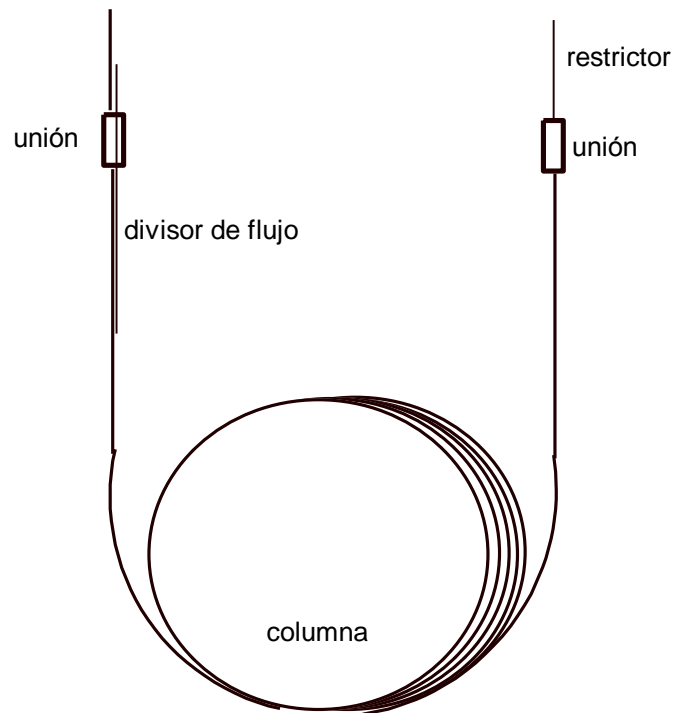
**Entrecruzamiento:** Se hizo utilizando el peróxido de dicumilo como generador de radicales libres, el cual se añadió a la solución de recubrimiento en un 2% en peso. La columna se sometió a un flujo de N<sub>2</sub> y con el N<sub>2</sub> dentro se sellaron los extremos, se envolvió en papel aluminio y se calentó a temperatura programada de 40 a 170°C, a 5°C/min., manteniéndola a 170°C por 60 minutos; luego de 170 a 300°C, a 2°C/min y manteniéndola a esta temperatura por 10 horas.

**Evaluación:** Se realizó con una mezcla de hidrocarburos C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub> isotérmica (100°C) y con el método descrito por Grob<sup>146.147</sup>, utilizando un sistema de CG, con una división de flujo de 1:20, H<sub>2</sub> como gas acarreador y con un programa de temperatura de 40° C a 290°C con una velocidad de calentamiento igual 7.1 °C/min.

**Estabilidad Térmica:** Consistió en someter la columna al siguiente programa de temperatura: calentar a 200°C por 5 min., luego subir de 30°C en 30°C

hasta 320°C, a 20° C/min y mantener la temperatura durante 15 minutos en cada intervalo de temperatura.

Después de la prueba de estabilidad térmica, la columna se instaló en el cromatógrafo de gas HP 5890, que hace parte del sistema de CFS, se le diseñó un divisor de flujo al sistema de Inyección con un tubo capilar de 15 cm x 13 µm de d.i. y un restrictor a la salida con un tubo de las mismas dimensiones ((ver figura 17); luego se corrieron algunas muestras de hidrocarburos de estructura y pesos semejantes.



**Figura 17.** Esquema de la columna capilar de sílice fundida de 5 m x 100 µm de d.i. con divisor de flujo a la entrada y restrictor a la salida, recubierta con SE-54 por el método estático.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION.**

### **6.1 MONTAJE DEL SISTEMA DE CFS.**

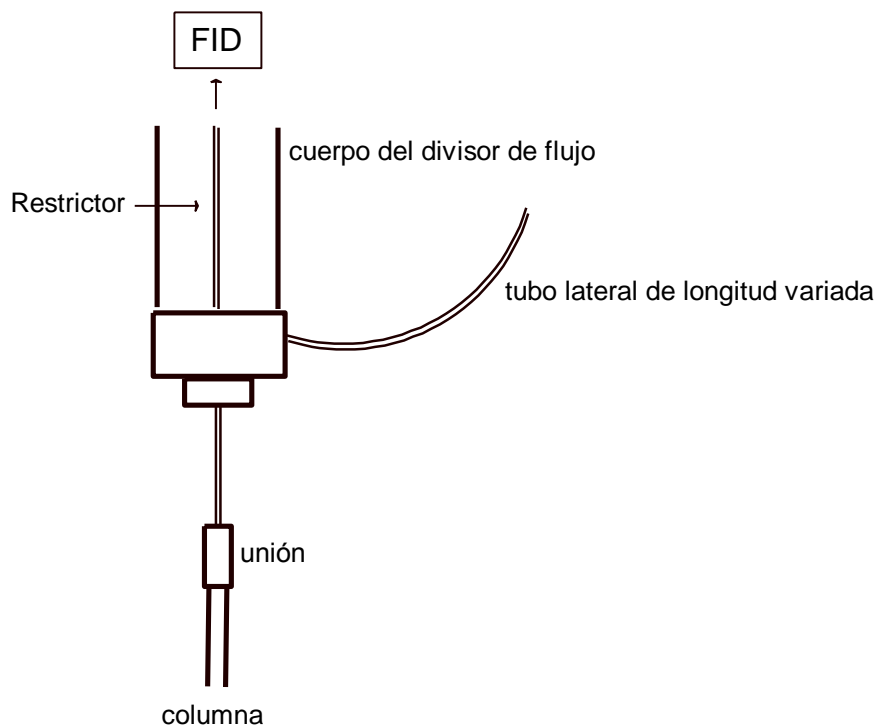
En el montaje y evaluación del sistema hubo problemas con la eficiencia de llenado de la bomba con CO<sub>2</sub> líquido a temperatura ambiente; solo lograba llenarse en un 30 a 50 % de su capacidad. Problema que se resolvió por aplicación de un baño refrigerante de agua/hielo al depósito de la bomba, mediante una bomba de recirculación de agua fría. Con el enfriamiento de la bomba se obtuvo una eficiencia de llenado entre el 80 y el 95%.

### **6.2 EVALUACIÓN DEL SISTEMA CON COLUMNAS EMPACADAS**

**6.2.1 Columna Micropak RP C<sub>18</sub> 5 micras de 30 cm por 4 mm d.i.** En la evaluación del sistema de CFS con esta columna se intentó fijar un gasto volumétrico de fase móvil de 0.5 mL/min y observar como incidía este gasto en la presión del sistema. La presión de entrada a la columna estaba en cierto sentido, determinada por la presión de salida y esta podría controlarse por aplicación de los restrictores de flujo; en tal sentido se diseñaron restrictores con tubos de sílice fundida de 10 µm de d.i. de diversas longitudes, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 cm, pero la presión del sistema fue siempre superior a las 450 atm. Luego se utilizó un tubo de sílice fundida de 250 µm de d.i. estirado en un extremo, pero la presión lograda para este diámetro fue de 300 atm, la cual todavía se consideraba elevada.

Se hizo un diseño de un restrictor de acero, con un tubo de 10 cm x 1/32" de d.e. con un extremo aplanado y se logró un compromiso adecuado entre el gasto requerido por la columna y la presión de trabajo. Sin embargo, el gasto de salida fue tan grande que impidió el acoplamiento directo al detector de ionización de llama, FID, ya que no fue posible mantener encendida la llama.

Como el flujo que llegaba al FID era muy grande, se diseñó un divisor de flujo a la salida de la columna. Este divisor de flujo se unió al detector por medio de un tubo de vidrio de 1/4 " de d.e. el cual encamisó al restrictor (figura 18) y midiendo la relación entre el flujo del divisor y el flujo del detector, se logra encender la llama del detector a una determinada relación.



**Figura 18.** Divisor de flujo acero inoxidable de 1/4" de d.e. la salida de la columna Micropak C<sub>18</sub> de 30 cm x 4 mm d.i.

La relación de división en función de la longitud de la purga lateral se señala en la siguiente tabla:

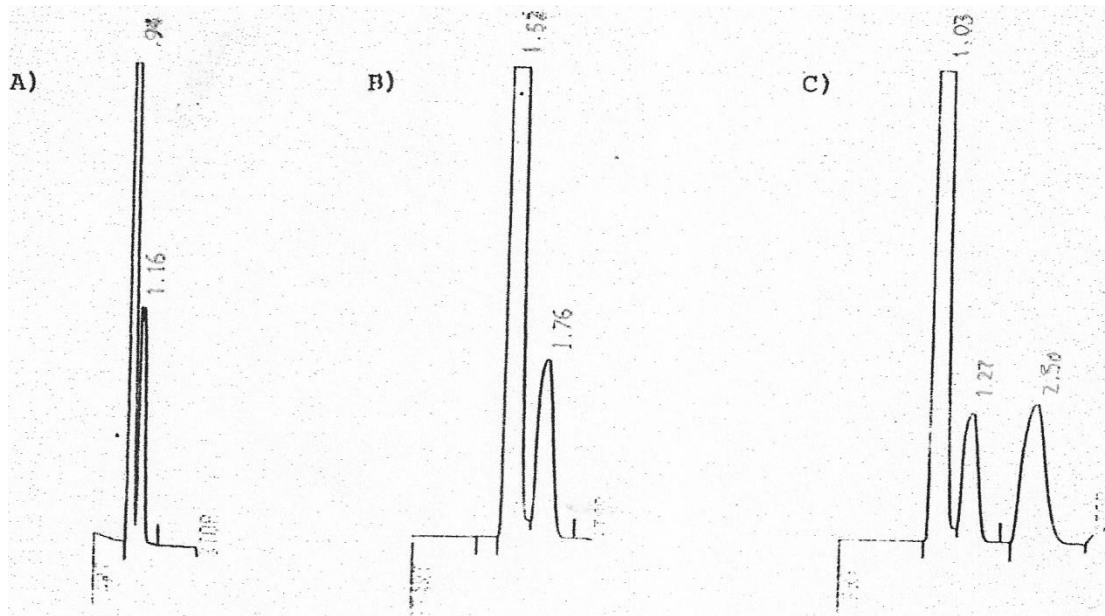
**Tabla IV.** Relación de flujo de divisor, flujo del restrictor para la columna Micropak C<sub>18</sub> empacada con sílice de  $\mu\text{m}$ .

<b>Longitud tubo lateral (cm)</b>	<b>Flujo divisor (mL/min)</b>	<b>Flujo detector (ml/min)</b>	<b>Relación de flujo (Divisor/Detector)</b>
48	600	150	4
23	600	100	6
12.5	600	60	10
4.5	600	40	15
3.2	600	12	50
1.4	600	3	200

Con la última relación de flujo aun cuando se logra encender el detector, este no se mantuvo encendido, por lo que se decidió empacar el cuerpo del detector, para aumentar la carga de presión y la relación de división; así se logró encender y mantener encendido.

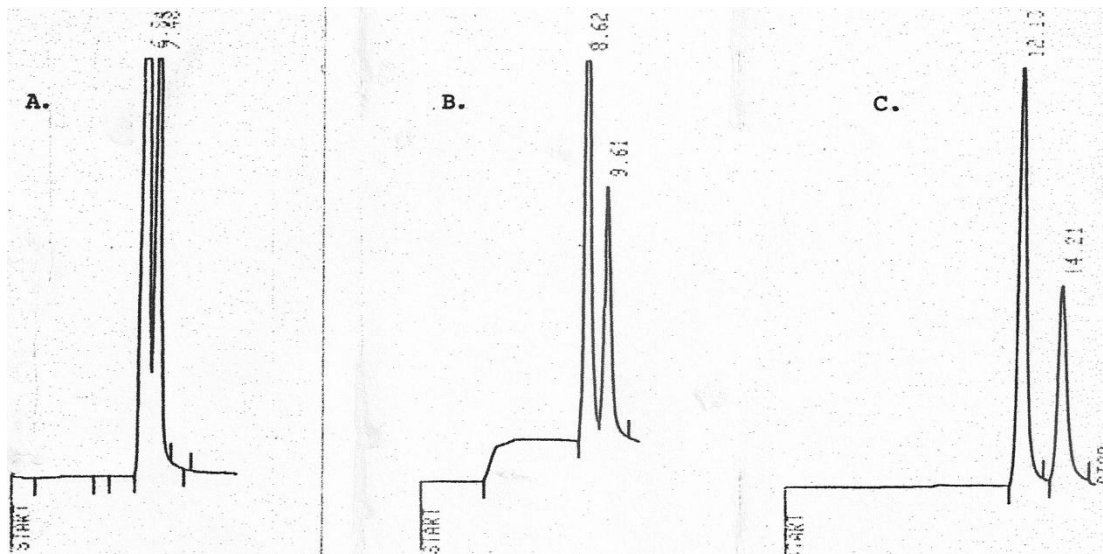
El sistema se evaluó con la separación de algunas mezclas de hidrocarburos a diferentes presiones, pero no hubo reproducibilidad debido a que las partículas del empaque del detector fueron expulsadas por efecto de la presión y produjeron ruido de alta frecuencia; además hubo problemas de enfriamiento en el tubo conector por la expansión del CO<sub>2</sub> a la salida del restrictor. Para contrarrestar el enfriamiento, se cambió el tubo de vidrio por uno de acero y se elevó la temperatura del detector a 350 °C. Este tubo de acero se empacó y se obtuvieron los cromatogramas mostrados en la figura 19. Debido a que aún el flujo y la presión en el sistema eran demasiado altos, se presentaron problemas con la estabilización de la línea base.





**Figura 19.** Cromatogramas obtenidos con el sistema de CFS. Fase móvil: CO<sub>2</sub> supercrítico. Columna: Micropak RP C<sub>18</sub>. Temperatura: 70°C. A) C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> a 150 atm. B) C<sub>7</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> a 130 atm. C) C<sub>7</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> y Tolueno a 125 atm.

**6.2.2 Columnas de acero inoxidable de 0.5 y 1.0 mm de d.i.** Las columnas de acero inoxidable de 0.5 y 1.0 mm de d.i. no pudieron empacarse homogéneamente, debido principalmente a la rugosidad de las paredes internas de los tubos que impedían que las partículas de relleno rodaran con facilidad. La columna que a simple vista parecía bien empacada, presentaba vacíos al interior, ya que al operar el sistema, el empaque se compactaba hacia la salida dejando un gran espacio a la entrada. Estas columnas resultaron totalmente ineficientes, los cromatogramas obtenidos, presentaron picos demasiados anchos debido al gran volumen muerto existente (figura 20).



**Figura 20.** Cromatogramas de tolueno en n-heptano, en el sistema de CFS a 70°C y A) 400 atm, B) 300 atm y C) 200 atm. Fase móvil: CO<sub>2</sub>. Columna: acero inoxidable 50 cm x 0.5 mm d.i. RSIL C<sub>18</sub>.

### 6.3 EVALUACIÓN CON COLUMNAS CAPILARES.

#### 6.3.1 Columnas capilares de sílice fundida de 200 µm y 100 µm de d.i.

Las dos columnas fueron instaladas y estudiadas de manera independiente; se diseñaron los restrictores de flujo a la salida y se corrió el sistema. A medida que la presión del sistema iba aumentando, las columnas se mostraron frágiles, a tal punto que al alcanzar una presión aproximada de 375 atmósferas, la columna de 250 µm se deterioró, estalló y la columna de 100 µm de d.i. y los restrictores, se volvieron frágiles al soportar una presión de aproximadamente 500 atm. Esta fragilidad de la columna se debió tanto a la presión como a la temperatura, ya que al observarse al microscopio la columna presentaba resquebrajamiento del recubrimiento externo de poliimida.

La columna de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. sin fase estacionaria, se sometió a prueba con el sistema de CFS construido, corriendo una muestra de benceno a diferentes flujos de fase móvil y por tanto a diferentes presiones y a partir de los cromatogramas, se obtuvieron los datos mostrados en las Tablas V y VI, usando un restrictor de 5  $\mu\text{m}$  de d.i. con longitudes de 20 y 10 cm respectivamente.

**TABLA V. Datos obtenidos con la columna de 5m por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. sin fase, con restrictor de 20 cm por 5  $\mu\text{m}$  de d.i.**

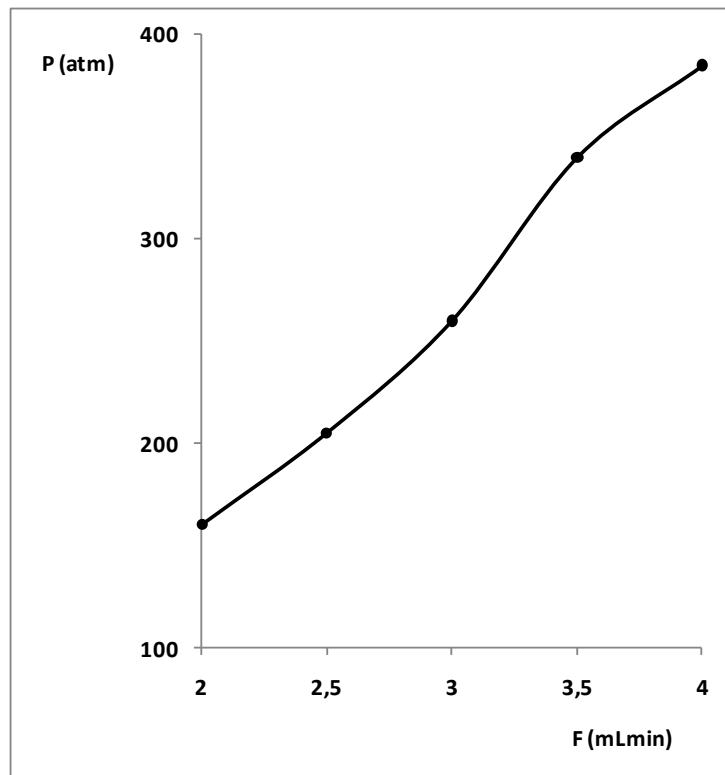
F(ml/min)	P(atm)	N	platos/m	u(cm/s)	H(mm)
2.0	160	9600	1920	0.433	0.52
2.5	205	10867	2173	0.519	0.46
3.0	260	11364	2273	0.626	0.44
3.5	340	12289	2457	0.677	0.406
4.0	385	12984	2596	0.673	0.385

**TABLA VI. Datos obtenidos con la columna de 5m por 100  $\mu\text{m}$  de d.i. sin fase, con restrictor de 10 cm por 5  $\mu\text{m}$  de d.i.**

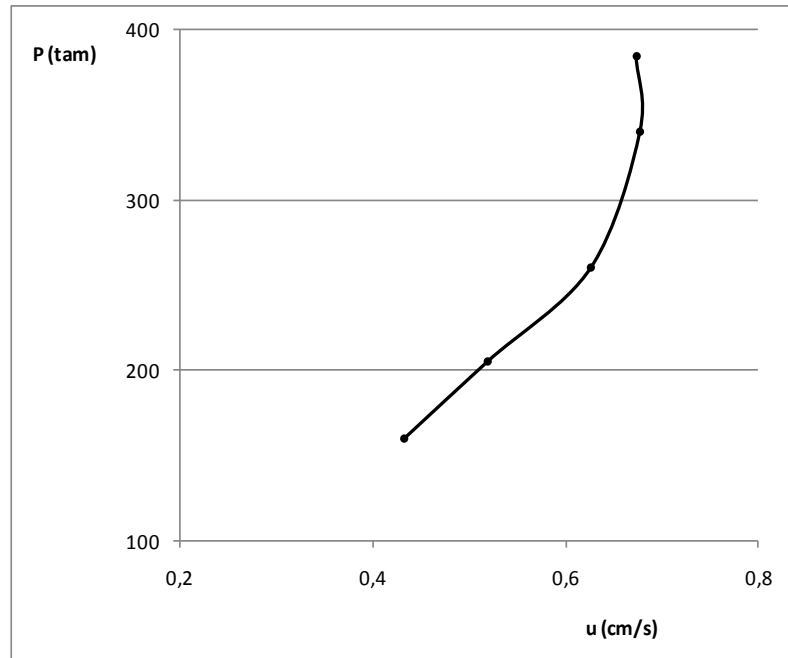
F(ml/min)	P(atm)	N	platos/m	u(cm/s)	H(mm)
2.5	200	9030	1806	0.376	0.55
3.0	250	9843	1968	0.404	0.508
3.5	325	10951	2190	0.476	0.452
4.0	390	10852	2170	0.531	0.46

En los datos de las tablas se observa un incremento casi lineal de la presión con respecto al flujo, debido a que cada vez pasa mayor cantidad de fase móvil por unidad de tiempo (figura 21); como consecuencia, se observa también un aumento de la velocidad lineal de la fase móvil con la presión (figura 22 y 23). Estas figuras nos indican que la velocidad de la fase móvil y

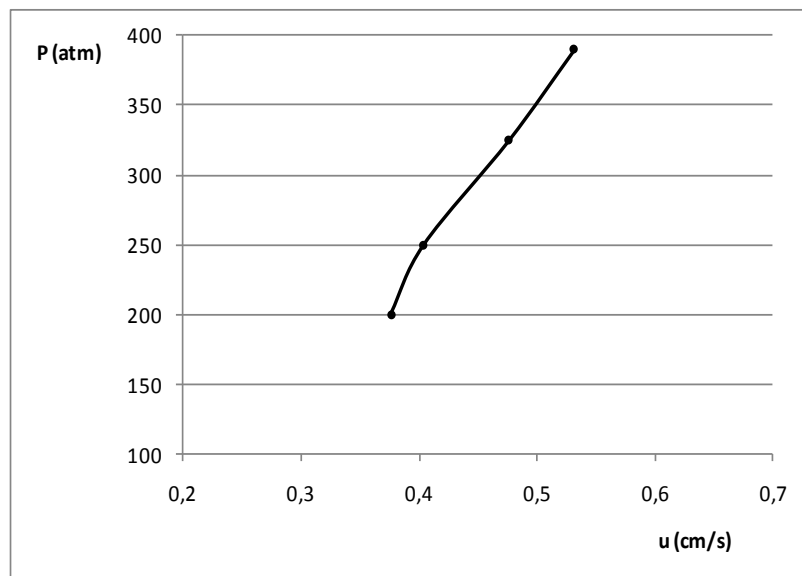
por ende la caída de presión en el sistema está gobernada por las dimensiones del restrictor. Se observa un valor límite de la velocidad lineal de la fase móvil  $u$ , determinado por la expansión del  $\text{CO}_2$  de líquido a gas, dentro del tubo restrictor lo que hace que a partir de este punto,  $u$  ya no dependa de la longitud del restrictor. La figura 24 presenta una disminución de la altura equivalente a un plato teórico (H), con la velocidad lineal de la fase móvil ( $u$ ), llegando a un mínimo y luego aumenta, señalando con ello la velocidad óptima de operación de la fase móvil (0.47 cm/s) para esta columna.



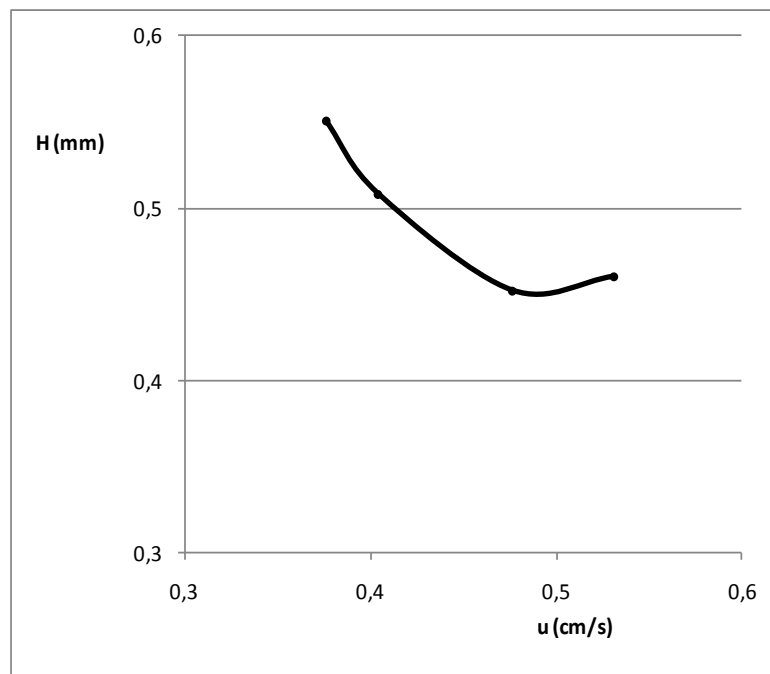
**Figura 21.** Variación de la presión en función del flujo de fase móvil,  $\text{CO}_2$ . Columna capilar de sílice fundida de 5 m x 0.1 mm de d.i. Restrictor: 20 cm x 0.5  $\mu\text{m}$  d.i.



**Figura 22.** Velocidad lineal de la fase móvil,  $\text{CO}_2$ , en función de la presión. Columna: sílice fundida 5 m x 0.1 mm de d.i. sin fase. Restrictor: sílice fundida 20 cm x 5  $\mu\text{m}$  d.i.



**Figura 23.** Velocidad lineal de la fase móvil,  $\text{CO}_2$ , en función de la presión. Columna: sílice fundida 5 m x 0.1 mm de d.i. sin fase. Restrictor: sílice fundida 10 cm x 5  $\mu\text{m}$  d.i.



**Figura 24.** Altura equivalente de plato H, en función de la velocidad lineal de fase móvil u. Fase móvil: CO<sub>2</sub> supercrítico. Columna: sílice fundida 5 m x 0.1 mm d.i. sin fase. Restrictor: sílice fundida 10 cm x 5 µm d.i.

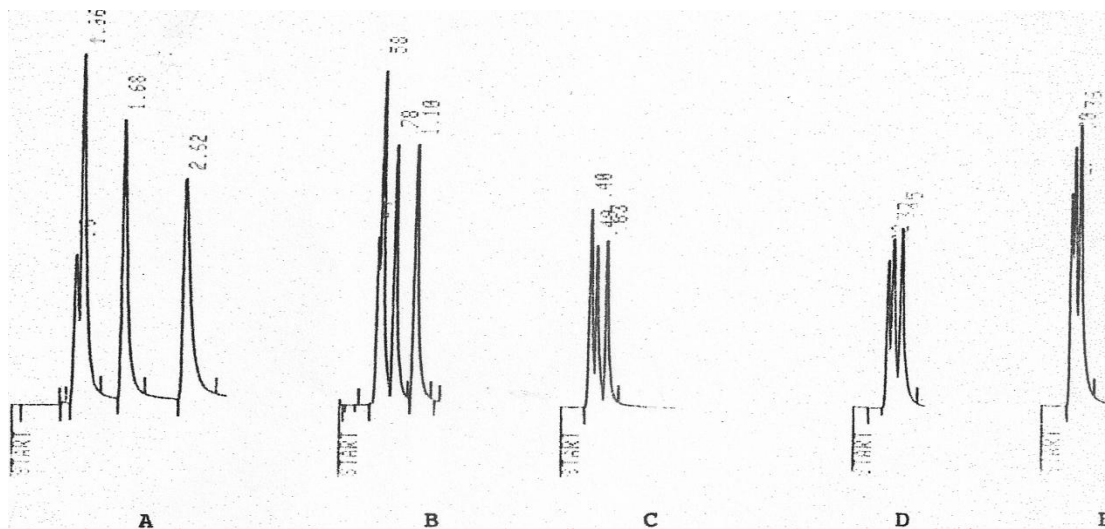
## 6.4 EVALUACIÓN CON LAS COLUMNAS CAPILARES PREPARADAS EN EL LABORATORIO.

**6.4.1 Preparación y empaque de columna capilar de 100 µm de d.i.** En este proceso de preparación de la columna para evaluar el sistema de CFS con la columna microempacada, se pudo observar que el método de *empaque en seco* de la columna resultó mejor que el *método de suspensión*, ya que se podía observar a simple vista el llenado, el tiempo de empaquetamiento fue mucho menor (~ 45 min.) y observado al microscopio el empaque se presentaba homogéneo. Este proceso de empaque del capilar se realizó usando la bomba Varian 8500, ya que con ella se garantizaba una presión manejable de 300 atm. Aproximadamente, que era una presión fácilmente manejable. La columna se colocó inicialmente en el

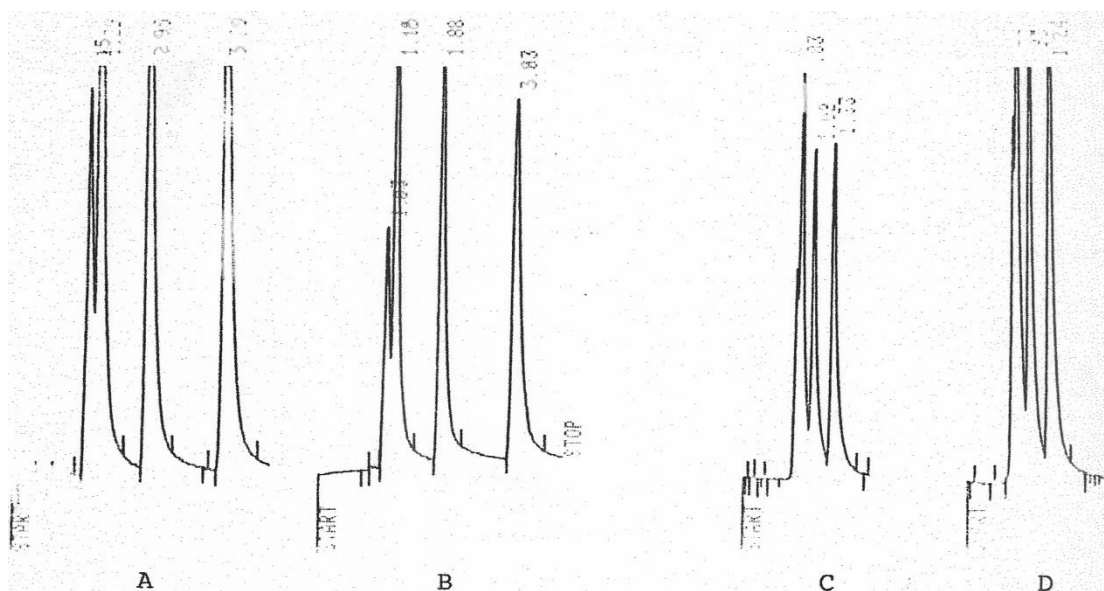
baño de ultrasonido, pero el tiempo de empaque se hacía mayor, por lo tanto se puso la columna en posición completamente vertical (el peso de la unión Valco a la salida lo permitía) y se aplicó vibración en el tubo colector, lo que permitió que las partículas rodaran rápidamente al interior de la columna. Al correr algunas muestras se observó saturación de la columna, motivo por el que se instaló un divisor de flujo a la entrada.

#### **6.4.2 Evaluación del sistema de CFS con la columna microempacada.**

La columna se acondicionó durante dos horas a 70 °C con flujo de CO<sub>2</sub>, luego se corrió una mezcla de n-hexano, ciclohexano, ciclohexeno y benceno, y otra de n-hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xilenos. En la separación de la primera mezcla (n-hexano, ciclo-hexano, ciclohexeno y benceno) se observó un aumento de la solubilidad con la presión pero una mejor resolución a bajas presiones (figura 25). Si se aumenta la temperatura, la retención disminuye por aumento de la solubilidad del soluto por fenómenos de volatilidad (figura 26). Esto indica que presión y temperatura son dos efectos que contribuyen a la elución de los solutos, por combinación de los efectos de aumento de la capacidad solvatante de la fase móvil por la presión y de la solubilidad de los solutos con la presión de vapor por la temperatura.



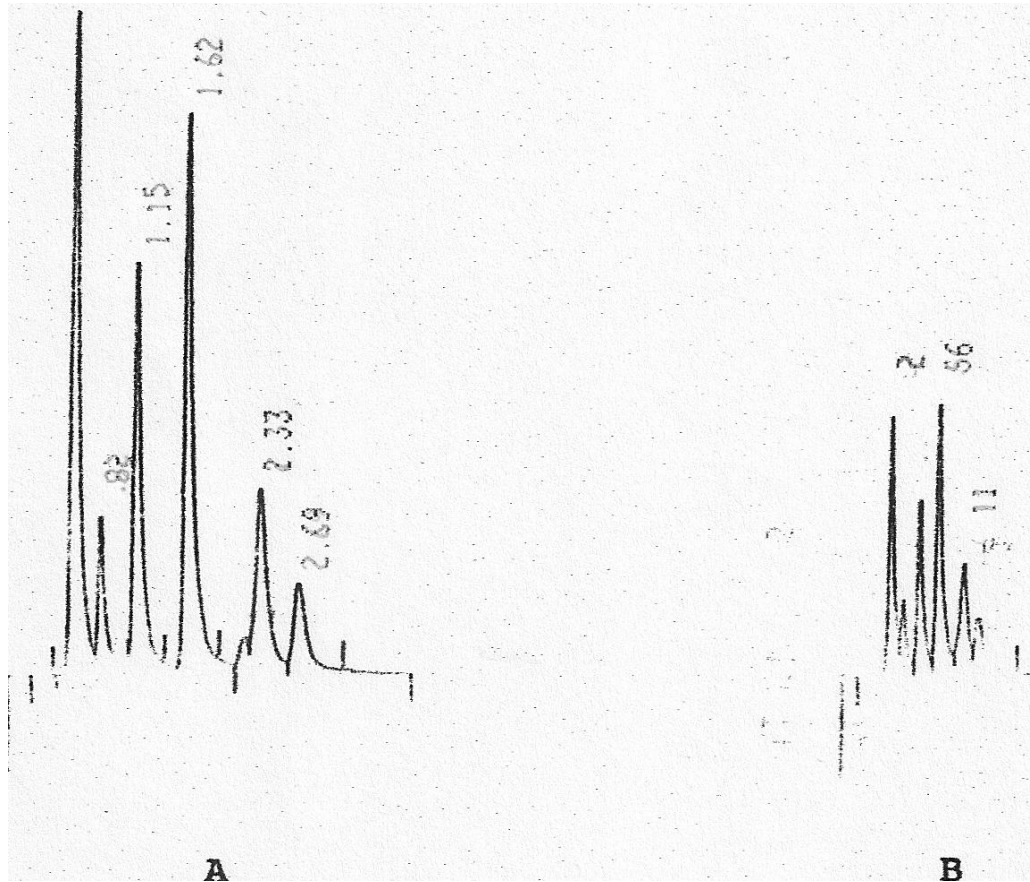
**Figura 25.** Separación de una mezcla de n-hexano, ciclohexano, ciclohexeno y benceno por CFS, a 90°C presiones de 100, 150, 200, 250 y 300 atm respectivamente. Fase móvil CO<sub>2</sub>. Columna: sílice fundida 50 cm x 0.1 mm d.i. empacada con Lichrospher Si-100 de 5µm.



**Figura 26.** Separación de n-hexano, ciclohexano, ciclohexeno y benceno a diferentes presiones y temperaturas: A) 100 atm – 50°C, B) 100 atm – 70°C, C) 150 atm – 40°C y D) 150 atm – 50°C.



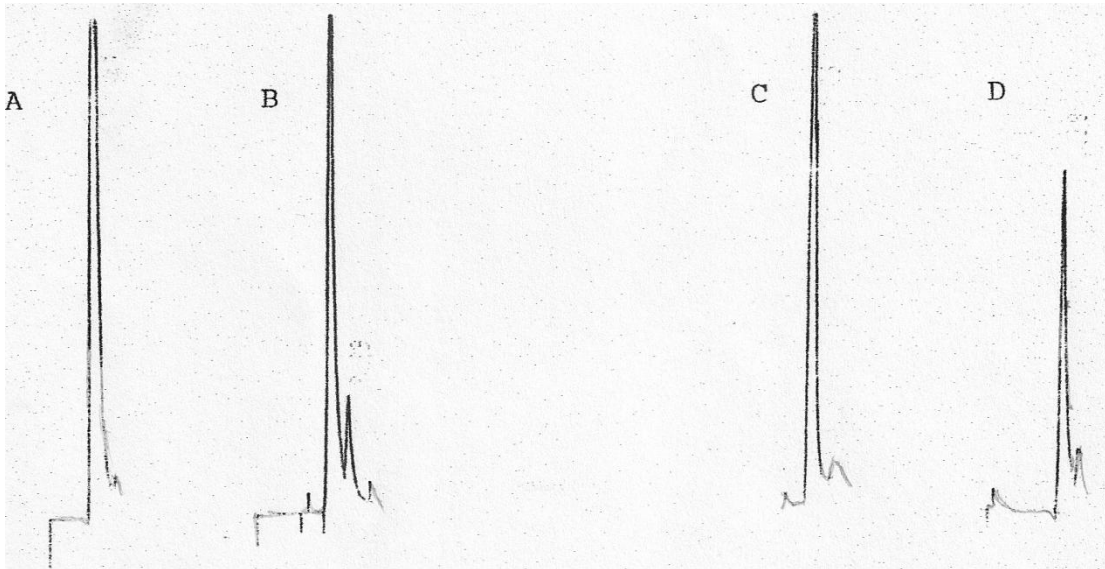
En la separación de la segunda mezcla (n-hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xilenos), se observó con bastante claridad el efecto de la presión sobre la separación (figura 27). Cuando se aumentó P a T constante, el tiempo de análisis fue menor y con muy buena resolución.



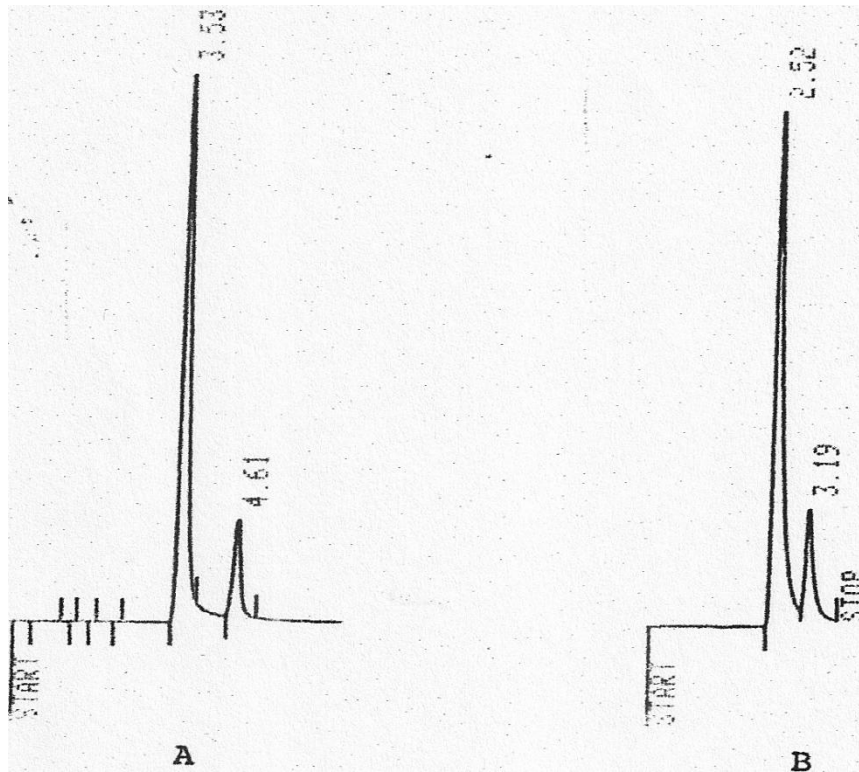
**Figura 27.** Separación por CFS de una mezcla de n-hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xilenos, usando  $\text{CO}_2$  como fase móvil a  $70^\circ\text{C}$ . Columna: sílice fundida de 50 cm x  $100\ \mu\text{m}$  d.i. empacada con Lichrospher Si-100 de  $5\ \mu\text{m}$ . A: 150 atm, B: 200 atm.

Después de acondicionar la columna durante tres horas con flujo de  $\text{CO}_2$  a  $150^\circ\text{C}$ , se inyectaron las siguientes mezclas: isómeros n-octano e iso-octano; los alcanos  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{13}$ ,  $\text{C}_{14}$ ,  $\text{C}_{16}$  y ciclohexano, ciclohexeno y benceno. En la separación de los isómeros de n-octano e iso-octano (figuras 28 y 29), se

notó que la mejor resolución se consiguió a temperaturas y presiones ligeramente superiores a las críticas. Cuando se incrementó la presión (80 a 90 atm), el tiempo de retención fue menor debido al aumento de la velocidad de la fase móvil y de la solubilidad de los solutos en el CO<sub>2</sub> supercrítico.

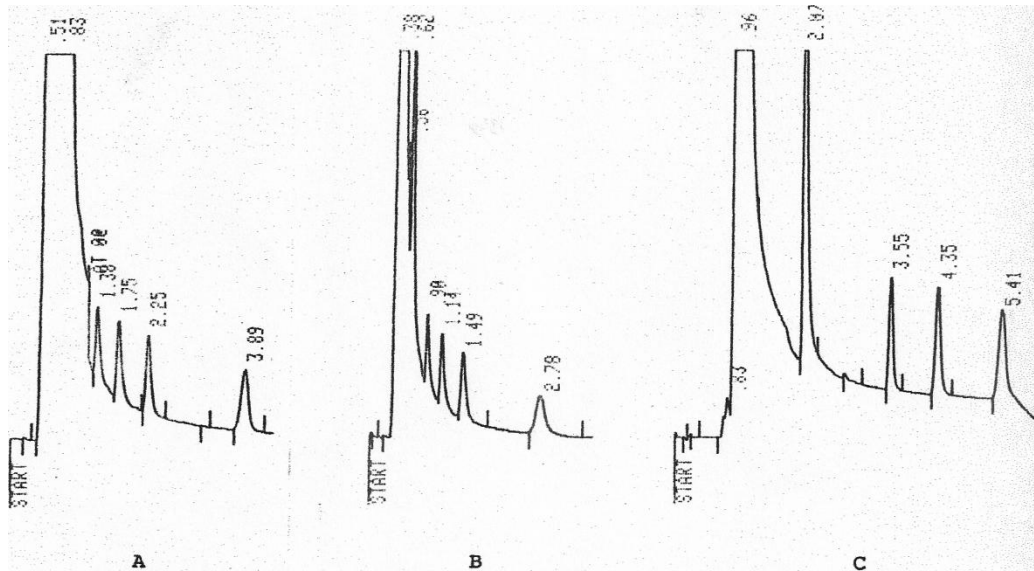


**Figura 28.** Cromatograma de n-octano e isooctano, usando CO<sub>2</sub> a diferentes presiones y temperatura. Columna: sílice fundida 50 cm x 0.1 mm, empacada con Lichrospher Si-100 de 5 µm. A: 150 atm-32°C, B: 100 atm- 32°C, C:150 atm- 35°C, D: 100 atm-35°C



**Figura 29.** Separación de iso-octano y n-octano por CFS a 35°C. A: 80 atm, B: 90 atm

Estos mismos efectos se notaron en la separación de la mezcla de hidrocarburos presentada en la figura 30. Esta separación se logró combinando altas presiones (200 atm), con bajas temperaturas (100°C), demostrando el aumento de la capacidad solvatante del CO<sub>2</sub> a medida que se eleva la presión y se baja la temperatura.



**Figura 30.** Separación de una mezcla de de hidrocarburos  $C_{12}$ ,  $C_{13}$ ,  $C_{14}$  y  $C_{16}$  por CFS, usando  $CO_2$  como fase móvil y A) 150 atm y  $150^\circ C$ , B) 200 atm y  $100^\circ C$  y C) programación de presión de 100 a 250 atm a  $70^\circ C$

Luego se corrió una mezcla de ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a diferentes presiones y temperaturas, cuyos datos de tiempo de retención, tiempo muerto, ancho del pico a la mitad de la altura, aparecidos en el cromatograma, sumados a los de longitud de la columna, ya conocida, permiten calcular los parámetros cromatográficos expresados en las tablas VII, VIII, IX, X y XI.

**TABLA VII.** Valores de  $k'$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $N_{\text{eff}}$ , y  $\alpha$  para ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a diferentes valores de  $T$  y 100 atm de presión.

**PRESION: 100 atm**

Temp.		40	50	60	70	80	90	100
$t_0$		1.06	0.92	0.86	0.81	0.8	0.78	0.76
$u$		0.79	0.91	0.97	1.03	1.04	1.07	1.10
c-hexano	$T_R$	1.47	1.33	1.24	1.18	1.11	1.06	1.01
	$W_{1/2}$	0.135	0.148	0.102	0.096	0.102	0.096	0.099
	$k'$	0.39	0.45	0.44	0.46	0.39	0.36	0.33
	$N$	743	506	927	947	743	764	653
	$H$	0.673	0.987	0.540	0.528	0.673	0.654	0.766
	$N_{\text{eff}}$	445	402	724	791	446	394	282
c-hexeno	$T_R$	2.19	2.1	2.01	1.92	1.76	1.65	1.54
	$W_{1/2}$	0.165	0.159	0.117	0.11	0.114	0.106	0.11
	$k'$	1.07	1.28	1.34	1.37	1.20	1.12	1.03
	$N$	1105	1094	1850	1910	1494	1519	1229
	$H$	0.453	0.457	0.270	0.262	0.335	0.329	0.407
	$N_{\text{eff}}$	294	345	606	638	445	422	315
Benceno	$T_R$	3.27	3.23	3.18	3	2.74	2.49	2.31
	$W_{1/2}$	0.2	0.2	0.159	0.156	0.149	0.158	0.145
	$k'$	2.08	2.51	2.70	2.70	2.43	2.19	2.04
	$N$	1676	1635	2508	2319	2120	1557	1591
	$H$	0.298	0.306	0.199	0.216	0.236	0.321	0.314
	$N_{\text{eff}}$	766	836	1335	1236	1063	734	716
$\alpha$ chxe/chxa		2.76	2.88	3.03	3.00	3.10	3.11	3.12
$\alpha$ ben/chxe		1.96	1.96	2.02	1.97	2.02	1.97	1.99

**TABLA VIII.** Valores de  $k'$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $N_{\text{eff}}$  y  $\alpha$  para ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a diferentes valores de  $T$  y 150 atm de presión.

**PRESION 150 atm.**

Temp.		40	50	60	70	80	90	100
$t_0$		0.72	0.62	0.56	0.51	0.49	0.48	0.47
$u$		1.16	1.34	1.49	1.63	1.70	1.74	1.77
c-hexano	$t_R$	0.84	0.72	0.67	0.63	0.6	0.59	0.55
	$W_{1/2}$	0.084	0.078	0.75	0.071	0.071	0.069	0.064
	$k'$	0.17	0.16	0.20	0.24	0.22	0.23	0.17
	$N$	627	534	500	494	448	458	463
	$H$	0.797	0.936	0.999	1.013	1.117	1.091	1.080
	$N_{\text{eff.}}$	13	10	13	18	15	16	10
c-hexeno	$t_R$	1.03	0.91	0.87	0.83	0.81	0.78	0.74
	$W_{1/2}$	0.101	0.095	0.086	0.082	0.082	0.077	0.072
	$k'$	0.43	0.47	0.55	0.63	0.65	0.63	0.57
	$N$	652	575	642	642	612	643	662
	$H$	0.767	0.869	0.779	0.778	0.817	0.777	0.755
	$N_{\text{eff.}}$	59	58	81	95	95	95	88
Benceno	$t_R$	1.31	1.2	1.16	1.3	1.12	1.07	1.01
	$W_{1/2}$	0.103	0.108	0.097	0.094	0.095	0.087	0.086
	$k'$	0.82	0.94	1.07	1.22	1.29	1.23	1.15
	$N$	843	774	897	906	871	948	865
	$H$	0.593	0.646	0.558	0.552	0.574	0.527	0.578
	$N_{\text{eff.}}$	171	181	240	273	276	288	247
$\alpha$ chxe/chxa		2.58	2.90	2.82	2.67	2.91	2.73	3.37
$\alpha$ ben/chxe		1.90	2.00	1.94	1.94	1.97	1.97	2.00

**TABLA IX.** Valores de  $k'$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $N_{\text{eff}}$  y  $\alpha$  para ciclohexano, ciclohexeno y benceno como una función de  $T$  a 200 atm de presión.

**PRESION = 200 atm**

Temp.		40	50	60	70	80	90	100
<b>t<sub>0</sub></b>		0.55	0.48	0.44	0.38	0.37	0.36	0.34
<b>u</b>		1.52	1.74	1.89	2.19	2.25	2.31	2.45
<b>c-hexano</b>	t <sub>R</sub>	0.6	0.54	0.49	0.46	0.42	0.42	0.39
	W <sub>1/2</sub>	0.052	0.049	0.048	0.042	0.046	0.047	0.047
	k'	0.09	0.13	0.11	0.21	0.14	0.17	0.15
	N	835	761	653	752	523	501	432
	H	0.599	0.657	0.765	0.665	0.957	0.999	1.158
	N <sub>eff.</sub>	6	9	7	23	7	10	7
<b>c-hexeno</b>	t <sub>R</sub>	0.68	0.62	0.57	0.55	0.51	0.51	0.48
	W <sub>1/2</sub>	0.069	0.064	0.062	0.05	0.057	0.058	0.058
	k'	0.24	0.29	0.30	0.45	0.38	0.42	0.41
	N	609	588	530	759	502	485	429
	H	0.821	0.850	0.944	0.659	0.996	1.031	1.164
	N <sub>eff.</sub>	22	30	28	72	38	42	37
<b>Benceno</b>	t <sub>R</sub>	0.81	0.75	0.71	0.68	0.65	0.64	0.6
	W <sub>1/2</sub>	0.083	0.075	0.072	0.055	0.065	0.063	0.067
	k'	0.47	0.56	0.61	0.79	0.76	0.78	0.76
	N	597	627	610	958	627	647	503
	H	0.837	0.797	0.820	0.522	0.797	0.773	0.994
	N <sub>eff.</sub>	62	81	88	187	116	124	94
<b>α chxe/chxa</b>		2.60	2.33	2.60	2.13	2.80	2.50	2.80
<b>α ben/chxe</b>		2.00	1.93	2.08	1.76	2.00	1.87	1.86

**TABLA X.** Valores de  $k'$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $N_{\text{eff}}$  y  $\alpha$  para ciclohexano, ciclohexeno y benceno como una función de  $T$  a 250 atm de presión.

**PRESION = 250 atm**

Temp.		40	50	60	70	80	90	100
$t_0$		0.46	0.4	0.36	0.33	0.31	0.29	0.28
$u$		1.81	2.08	2.31	2.53	2.69	2.87	2.98
c-hexano	$t_R$	0.49	0.43	0.39	0.35	0.34	0.32	0.31
	$W_{1/2}$	0.036	0.036	0.035	0.035	0.032	0.032	0.032
	$k'$	0.07	0.07	0.08	0.06	0.10	0.10	0.11
	$N$	1162	895	778	627	708	627	588
	$H$	0.430	0.559	0.642	0.797	0.706	0.797	0.850
	$N_{\text{eff}}$	4	4	5	2	6	6	6
c-hexeno	$t_R$	0.54	0.48	0.44	0.4	0.39	0.37	0.36
	$W_{1/2}$	0.052	0.05	0.049	0.045	0.044	0.044	0.044
	$k'$	0.17	0.20	0.22	0.21	0.26	0.28	0.29
	$N$	676	578	506	495	493	443	420
	$N_{\text{eff}}$	0	0	0	0	0	0	0
Benceno	$t_R$	0.62	0.56	0.52	0.48	0.47	0.45	0.43
	$W_{1/2}$	0.072	0.066	0.062	0.056	0.054	0.053	0.055
	$k'$	0.35	0.40	0.44	0.45	0.52	0.55	0.54
	$N$	465	451	441	461	475	452	383
	$H$	1.075	1.108	1.134	1.085	1.053	1.106	1.305
	$N_{\text{eff}}$	31	37	42	45	55	57	47
$\alpha$ chxe/chxa		2.67	2.67	2.67	3.50	2.67	2.67	2.67
$\alpha$ ben/chxe		2.00	2.00	2.00	2.14	2.00	2.00	1.88



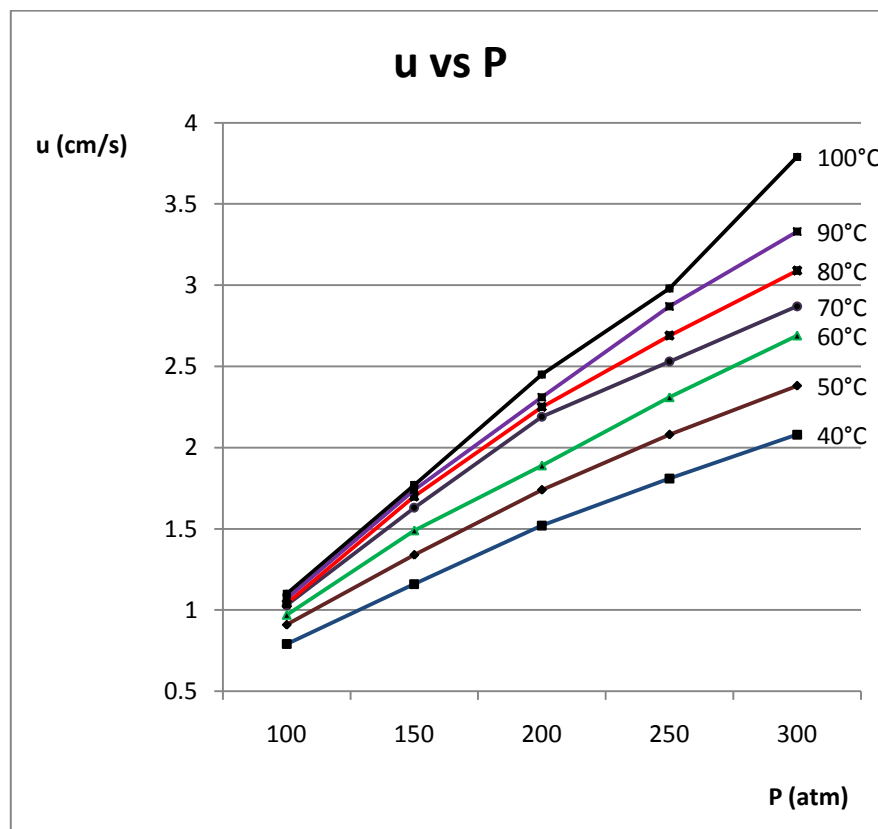
**TABLA XI.** Valores de  $k'$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $N_{\text{eff}}$  y  $\alpha$  para ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a diferentes  $T$  y 300 atm de presión.

**PRESION = 300 atm**

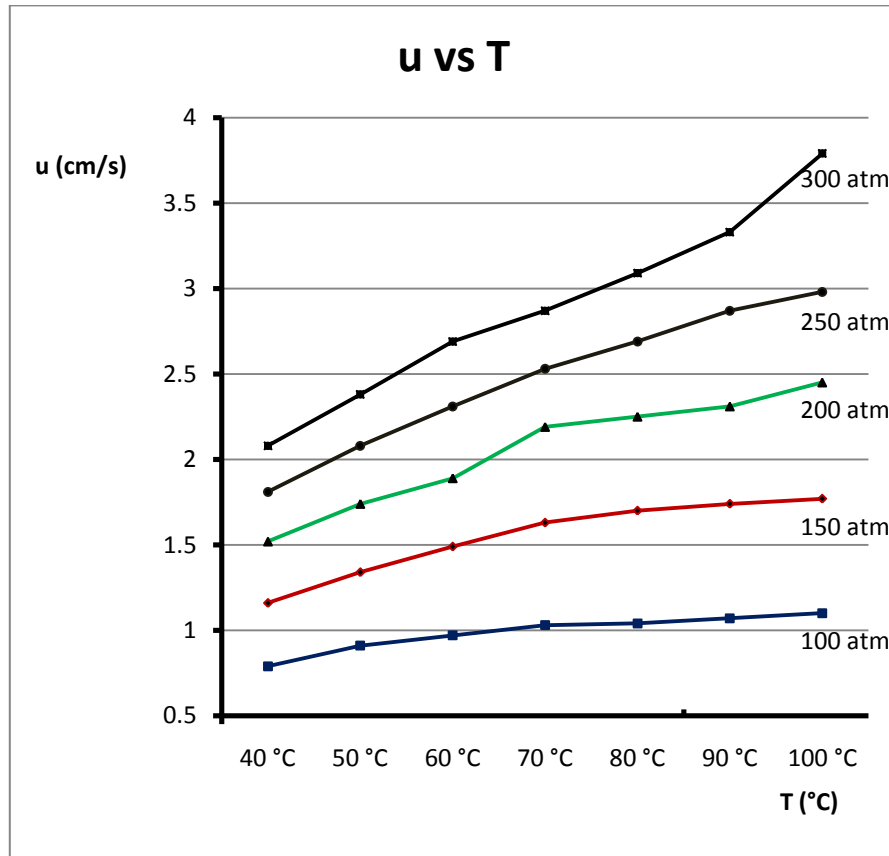
Temp.		40	50	60	70	80	90	100
$t_0$		0.4	0.35	0.31	0.29	0.27	0.25	0.22
$u$		2.08	2.38	2.69	2.87	3.09	3.33	3.79
c-hexano	$t_R$	0.41	0.37	0.34	0.31	0.29	0.28	0.26
	$W_{1/2}$	0.024	0.026	0.027	0.026	0.02	0.02	0.024
	$k'$	0.02	0.06	0.10	0.07	0.07	0.12	0.18
	$N$	1830	1270	994	891	780	786	736
	$H$	0.273	0.394	0.503	0.561	0.64	0.63	0.680
	$N_{\text{eff}}$	1	4	8	4	4	9	17
c-hexeno	$t_R$	0.44	0.41	0.37	0.34	0.33	0.31	0.29
	$W_{1/2}$	0.04	0.041	0.038	0.037	0.03	0.03	0.034
	$k'$	0.10	0.17	0.19	0.17	0.22	0.24	0.32
	$N$	759	627	594	529	527	492	456
	$H$	0.659	0.797	0.841	0.944	0.94	1.01	1.096
	$N_{\text{eff}}$	6	13	16	11	17	18	27
Benceno	$t_R$	0.49	0.46	0.43	0.4	0.38	0.36	0.34
	$W_{1/2}$	0.06	0.06	0.055	0.052	0.05	0.04	0.047
	$k'$	0.22	0.31	0.39	0.38	0.41	0.44	0.55
	$N$	418	369	383	371	362	368	328
	$H$	1.196	1.357	1.305	1.348	1.38	1.35	1.524
	$N_{\text{eff}}$	14	21	30	28	30	34	41
$\alpha$ chxe/chxa		4.00	3.00	2.00	2.50	3.00	2.00	1.75
$\alpha$ ben/chxe		2.25	1.83	2.00	2.20	1.83	1.83	1.71

Los datos indicados en las tablas, permiten establecer las siguientes relaciones:

Existe un incremento lineal de la velocidad de la fase móvil con respecto a la presión y temperatura. El aumento de la presión produce un aumento del movimiento del fluido a través de la columna, permitiendo que el recorrido del soluto se dé en menor tiempo. Al aumentar la temperatura, hay una disminución de la densidad y de la viscosidad, lo que permite que las moléculas de CO<sub>2</sub> adquieran mayor libertad de movimiento y por ende mayor velocidad. La velocidad de la fase móvil es inversamente proporcional a la viscosidad cinemática (Figuras 31 y 32).

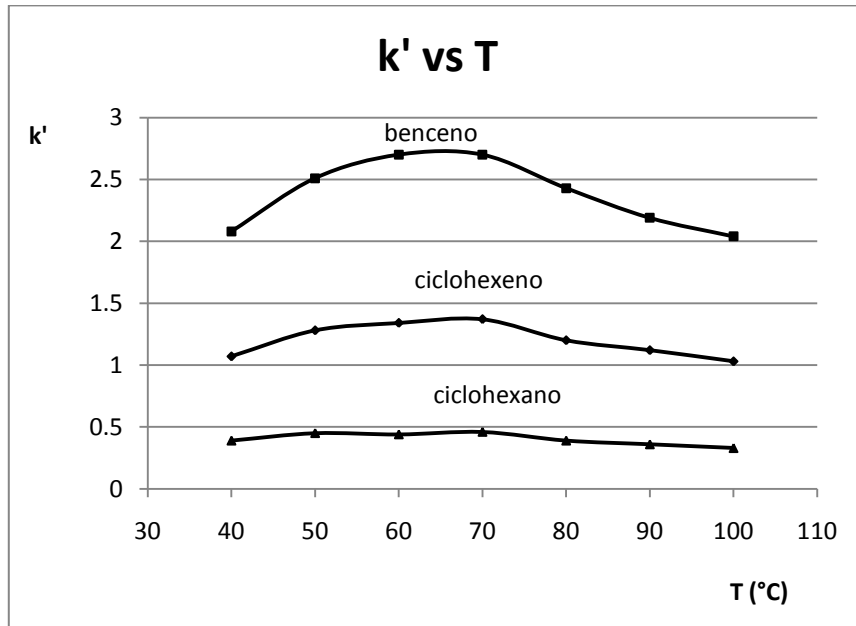


**Figura 31.** Variación de la velocidad lineal de la fase móvil  $u$ , con la presión a diferentes valores de  $T$  en el sistema de CFS. Fase móvil: CO<sub>2</sub>. Fase estacionaria: Lichrospher Si-100, 5  $\mu$ m empacada en una columna de sílice fundida de 50 cm x 0.1 mm de d.i.

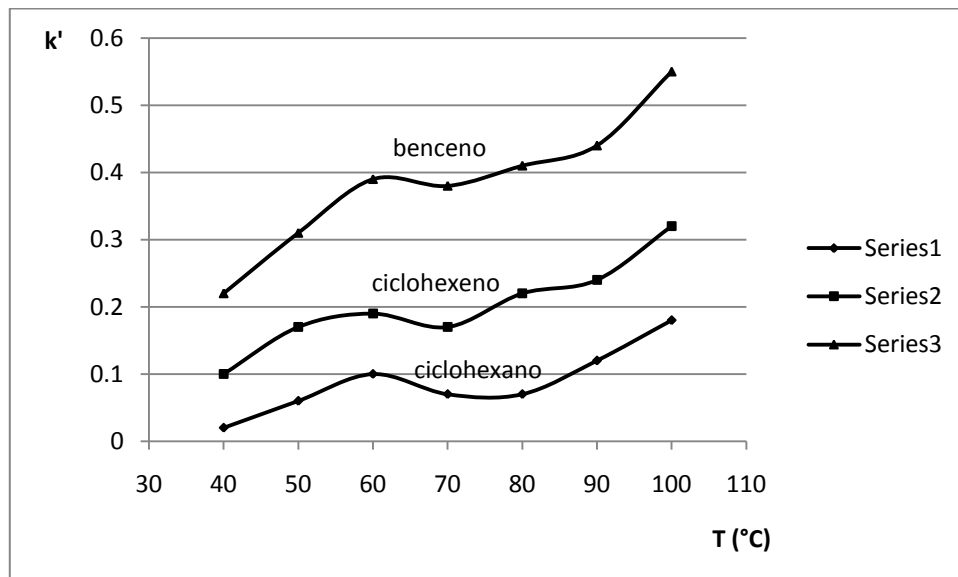


**Figura 32.** Variación de la velocidad lineal de la fase móvil con la temperatura a diferentes presiones en el sistema de CFS. Fase móvil: CO<sub>2</sub>. Columna: sílice fundida 50 cm x 0.1 mm empacada con Lichrospher Si-100 de 5 µm.

Los valores de  $k'$  se ven afectados por la presión y la temperatura. En las figura 33 y 34 se observa que a medida que  $T$  aumenta los valores de  $k'$  aumentan, hasta alcanzar un máximo para los tres solutos a 100 atm. Esto indica que el aumento de la retención se debe a que la capacidad solvatante del CO<sub>2</sub> disminuye por el aumento de  $T$ . Después de 70°C se nota una disminución de  $k'$ , indicando que la solubilidad ya no es debida a la densidad del CO<sub>2</sub>, la cual se ve disminuida por  $T$ , sino por la volatilidad del soluto que se consigue con el aumento de  $T$ . Sobre la sílice, la adsorción será el mecanismo predominante cerca de  $T_c$  y a valores superiores a  $T_c$ .

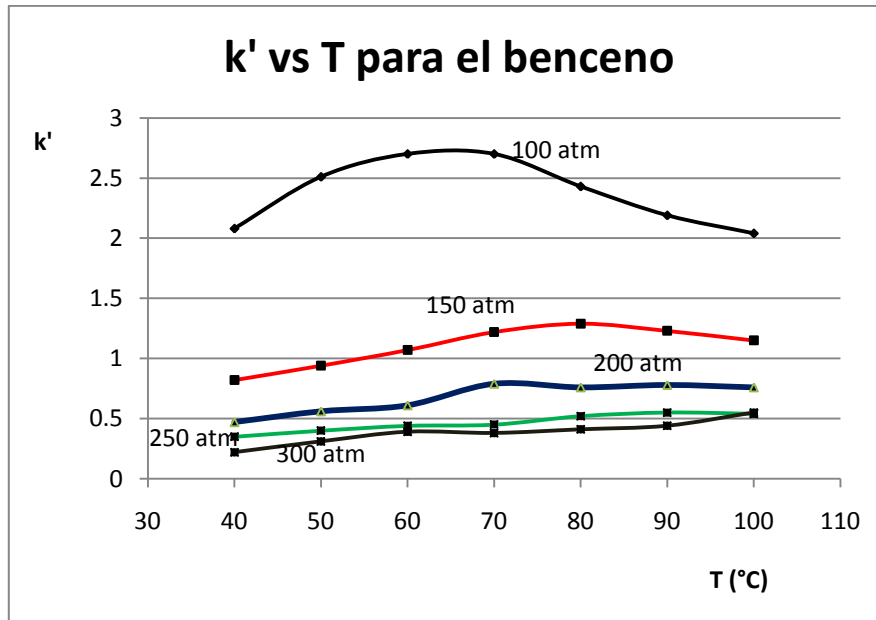


**Figura 33.** Variación del factor de capacidad  $k'$ , en función de la temperatura del sistema de CFS, para ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a 100 atm de presión. La fase móvil es  $\text{CO}_2$  y la columna es la misma de la figura anterior.



**Figura 34.** Variación del factor de capacidad  $k'$ , en función de la temperatura del sistema de CFS, para ciclohexano, ciclohexeno y benceno, a 100 atm de presión.

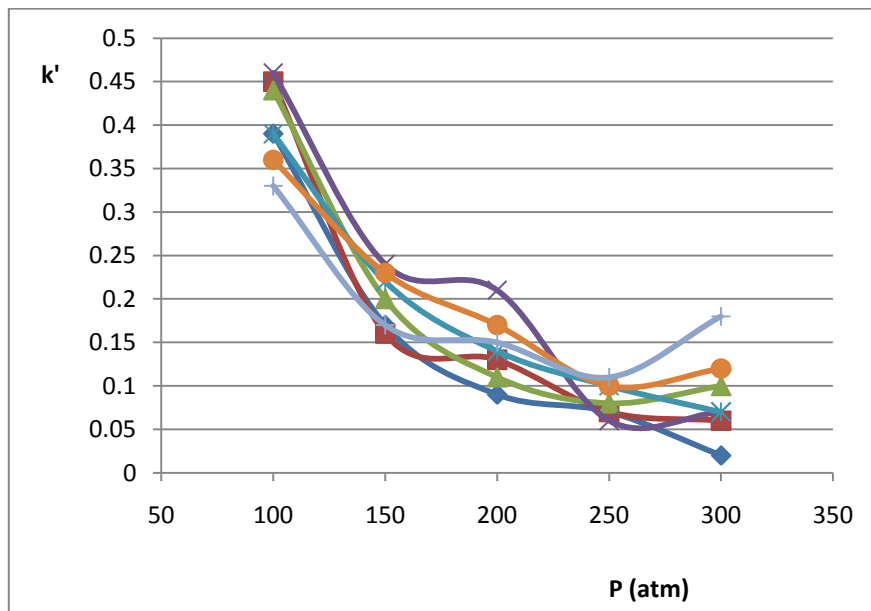
El benceno (figura 35) ve disminuido sus valores de  $k'$  por aumento de la presión; aquí la competencia de la presión (densidad) y la temperatura (volatilidad) por la solubilidad del soluto es más evidente a presiones bajas, donde la presión muestra un máximo con la temperatura.



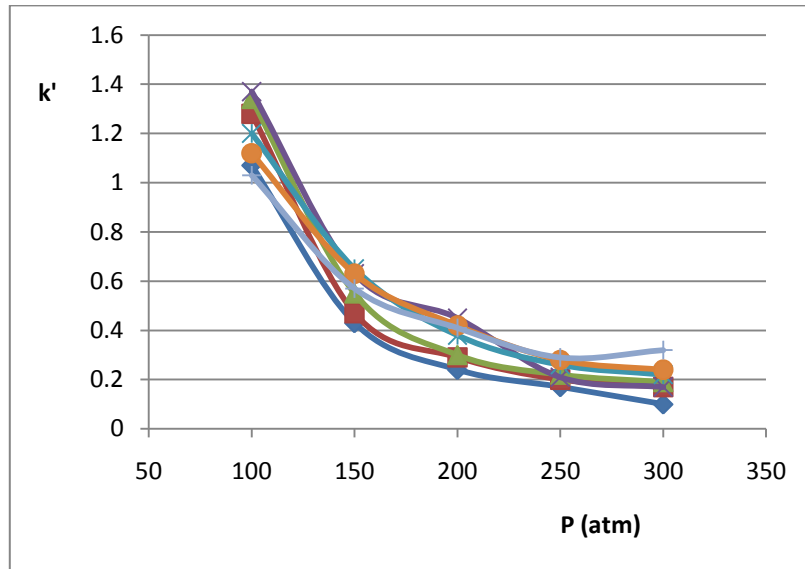
**Figura 35.** Variación de  $k'$  en función de T a diferentes presiones. La fase móvil y la columna son las mismas de las figuras anteriores.

Las figuras 36, 37 y 38 muestran esa tendencia para cada uno de los tres solutos. En general se observa que en la separación de los solutos intervienen los efectos de presión y temperatura sobre la solubilidad, por el aumento de la capacidad solvatante del  $\text{CO}_2$  y por volatilidad del soluto como en CG. Se nota también que  $k'$  presenta una pendiente más negativa a una presión de 100 atm (un poco arriba de la crítica), que a 200 o 300 atm. donde la disminución de  $k'$  es menor y la pendiente tiende a cero. Este cambio en  $k'$  se debe a que existe un enorme cambio en la densidad al variar la presión de 100 a 150 atm y a medida que la presión se aleja del punto crítico, la

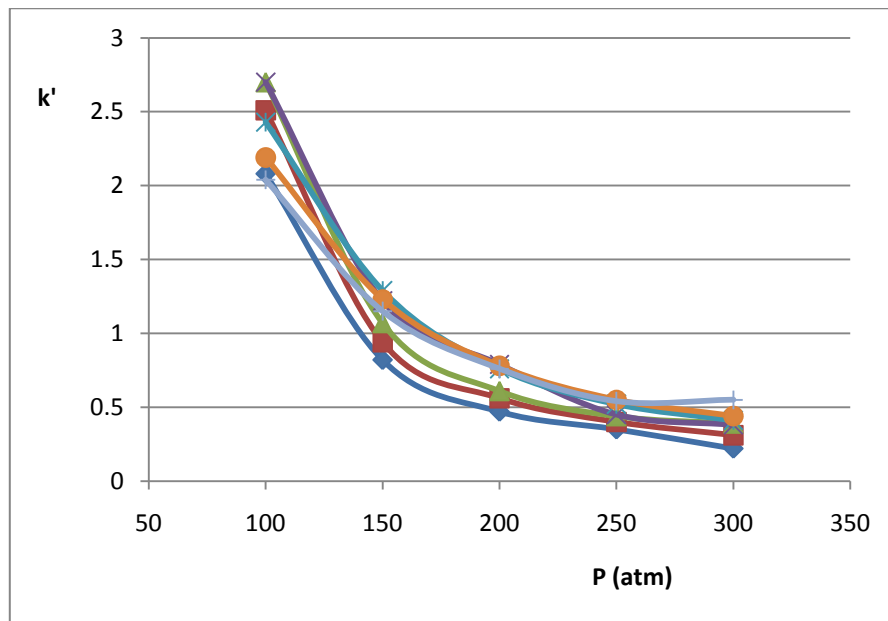
variación de  $k'$  es menor. A  $40^{\circ}\text{C}$  la disminución de  $k'$  es mayor que a  $100^{\circ}\text{C}$ , lo cual también evidencia que a medida que la temperatura se aleja del valor crítico las variaciones son menores. Esto se deduce también de las formas de las isothermas  $p(\rho)$  de la figura 6 que nos muestra que a temperaturas y presiones en la región cercana al punto crítico, punto de inflexión, se producen cambios rápidos en la retención por cambios en la densidad por cambios en la presión; pero a presiones y temperaturas por encima del punto crítico estos efectos son menores.



**Figura 36.** Factor de capacidad como una función de la presión a los diferentes valores de temperatura, para el ciclohexano en el sistema de CFS construido. La fase móvil es  $\text{CO}_2$  y la estacionaria es la misma.

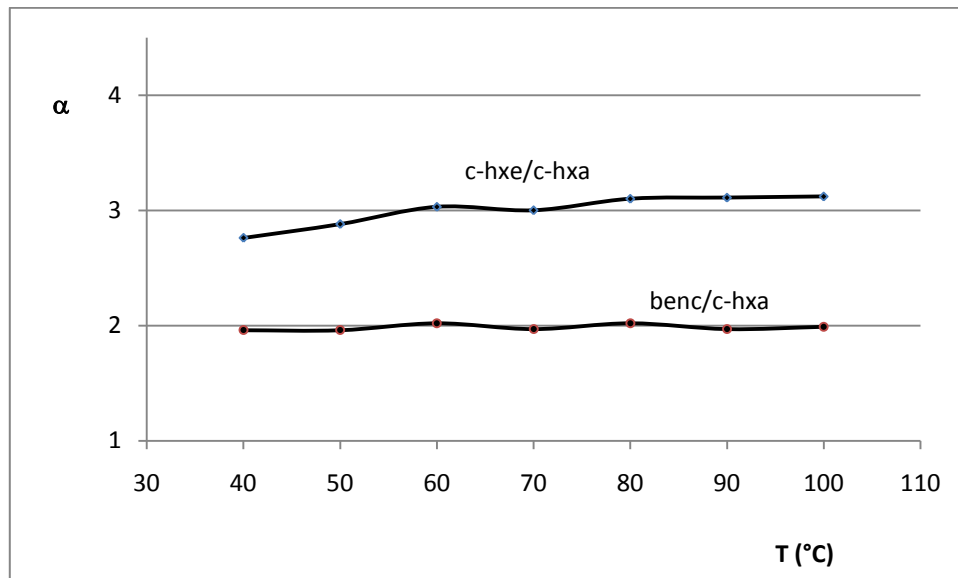


**Figura 37.** Variación de  $k'$  del ciclohexeno en función de  $P$  a diferentes valores de  $T$ . La fase móvil y la columna son las mismas del sistema de CFS construido.



**Figura 38.** Variación de  $k'$  del benceno como una función de  $P$  a diferentes valores de  $T$ . las condiciones son las mismas de la figura anterior.

La selectividad  $\alpha$ , también se vio afectada por las variaciones de P y T. La figura 38 señala un valor relativamente constante de  $\alpha$  para benceno/ciclohexeno, y un ligero incremento de  $\alpha$  para ciclohexeno/ciclohexano, a medida que T aumenta. Esto posiblemente se debió al tipo de interacciones del soluto con la fase móvil. El CO<sub>2</sub> presenta solo interacciones de dispersión con el ciclohexano que es un hidrocarburo saturado, pero con el ciclohexeno y el benceno que presentan insaturaciones se tienen interacciones más específicas, interacciones que se manifiestan en las variaciones de los valores de  $\alpha$ .



**Figura 39.** Selectividad  $\alpha$  para el c-hxe/c-hxa y benc/c-hxe, en función de T a 100 atm de presión, en la separación por CFS. Las condiciones son las mismas.

**6.4.3 Evaluación de la columna capilar de 100  $\mu$ m de d.i. recubierta con SE-54.** La columna preparada en el laboratorio y recubierta con SE-54 por el método estático, se sometió a evaluación, mediante la separación de una mezcla de hidrocarburos C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub> por CG a 100°C. Los valores de k'



mayores de 5 se obtuvieron a esta temperatura. Los datos del cromatograma y otros parámetros calculados, se expresan en la Tabla XII.

**TABLA XII.** Datos de la evaluación de la columna capilar de 100  $\mu\text{m}$  de d.i. con la mezcla de hidrocarburos.  $T = 100^\circ\text{C}$ ,  $t_0 = 0.21$  min,  $L = 6.0$  m.

Soluto	$t_R$ (min)	A/H	$k'$	N	H(mm)	$W_{0.5}^2$	$t_R (t_R - t_0)$
C <sub>10</sub>	0.79	0.026	2.70	5995	1.00	$5.7 \times 10^{-4}$	0.4582
C <sub>11</sub>	1.32	0.035	5.28	8929	0.67	$1.1 \times 10^{-3}$	1.465
C <sub>12</sub>	2.34	0.051	10.14	13216	0.45	$2.3 \times 10^{-3}$	4.9203

Los datos de la tabla, fueron calculados con las siguientes formulas:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2, \quad H = \frac{L}{N}, \quad W_{0.5} = 0.9394(A/H)$$

La columna presentó una altura de plato teórico de 0.45 mm lo que permite decir que es una columna de una eficiencia aceptable, si tenemos en cuenta la dificultad en recubrir columnas con diámetro interno muy pequeño (100  $\mu\text{m}$ ) y que además no se evaluó a la velocidad óptima de operación de la fase móvil  $\text{H}_2$ , que es de 180 cm/s ( $0.9 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}/r$ ), sino a un flujo 3.5 veces menor que el óptimo ( $\sim 50$  cm/s), debido a la limitación de la presión máxima de operación del cromatógrafo de gases.

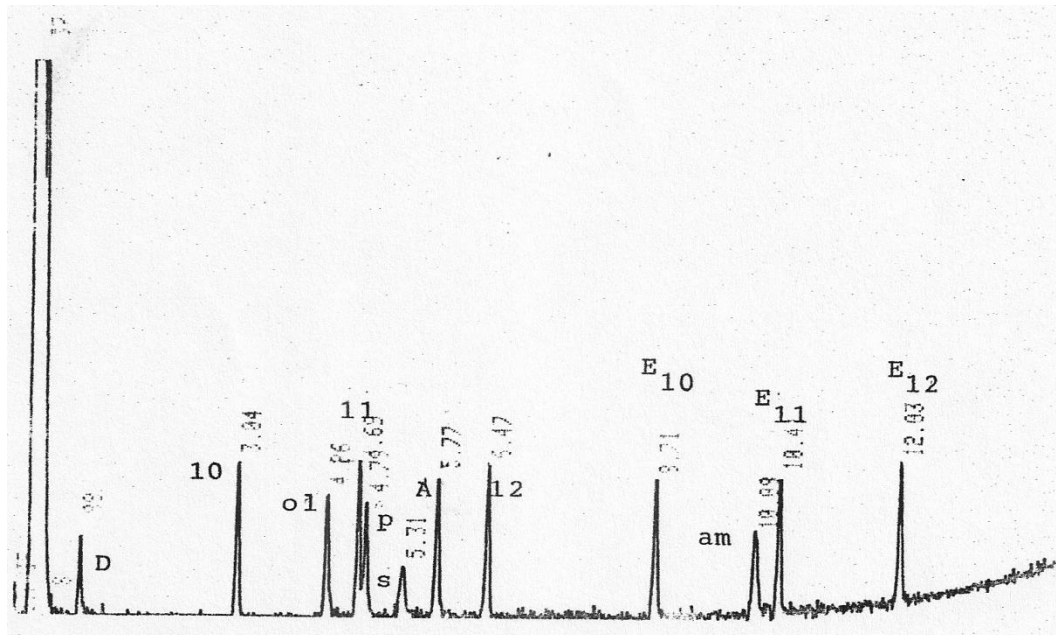
En la evaluación con la mezcla de Grob, el sistema de CG se operó con una división de flujo 1:20 y un  $t_{0(\text{seg})} = 2L_{(m)}$  El programa de temperatura se hizo a una velocidad de  $50/L_{(m)}$  que correspondió aproximadamente a  $7.1^\circ\text{C}/\text{min}$ . El volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla, la cual tiene la composición que se muestra en la Tabla XIII.

**TABLA XIII.** Composición de la mezcla de Grob.

Sustancia	Código	mg/mL
<b>Decanoato de metilo</b>	E <sub>10</sub>	12.1
<b>Undecanoato de metilo</b>	E <sub>11</sub>	11.8
<b>Dodecanoato de metilo</b>	E <sub>12</sub>	11.5
<b>n-Decano</b>	C <sub>10</sub>	8.6
<b>n-Undecano</b>	C <sub>11</sub>	8.7
<b>n-Dodecano</b>	C <sub>12</sub>	8.8
<b>1-Octanol</b>	ol	11.1
<b>Nonanal*</b>	al	12.5
<b>2,3-Butanodiol</b>	D	19.0
<b>2,6-Dimetilanilina</b>	A	10.25
<b>2,6-Dimetilfenol</b>	P	9.7
<b>Diciclohexilamina</b>	am	10.2
<b>Acido 2-etilhexanoico</b>	S	12.1

\*No estuvo presente en la mezcla debido a que las columnas no polares o poco polares no adsorben los aldehídos.

Con el programa de temperatura de 40 a 290°C a 7.1°C/min se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 39, el cual nos indica las siguientes alturas relativas de los picos de los compuestos con respecto a E<sub>10</sub>, E<sub>11</sub>, E<sub>12</sub> y C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>: am 63%, A 90%, S 33%, P 76%, ol 81%, D 52%.



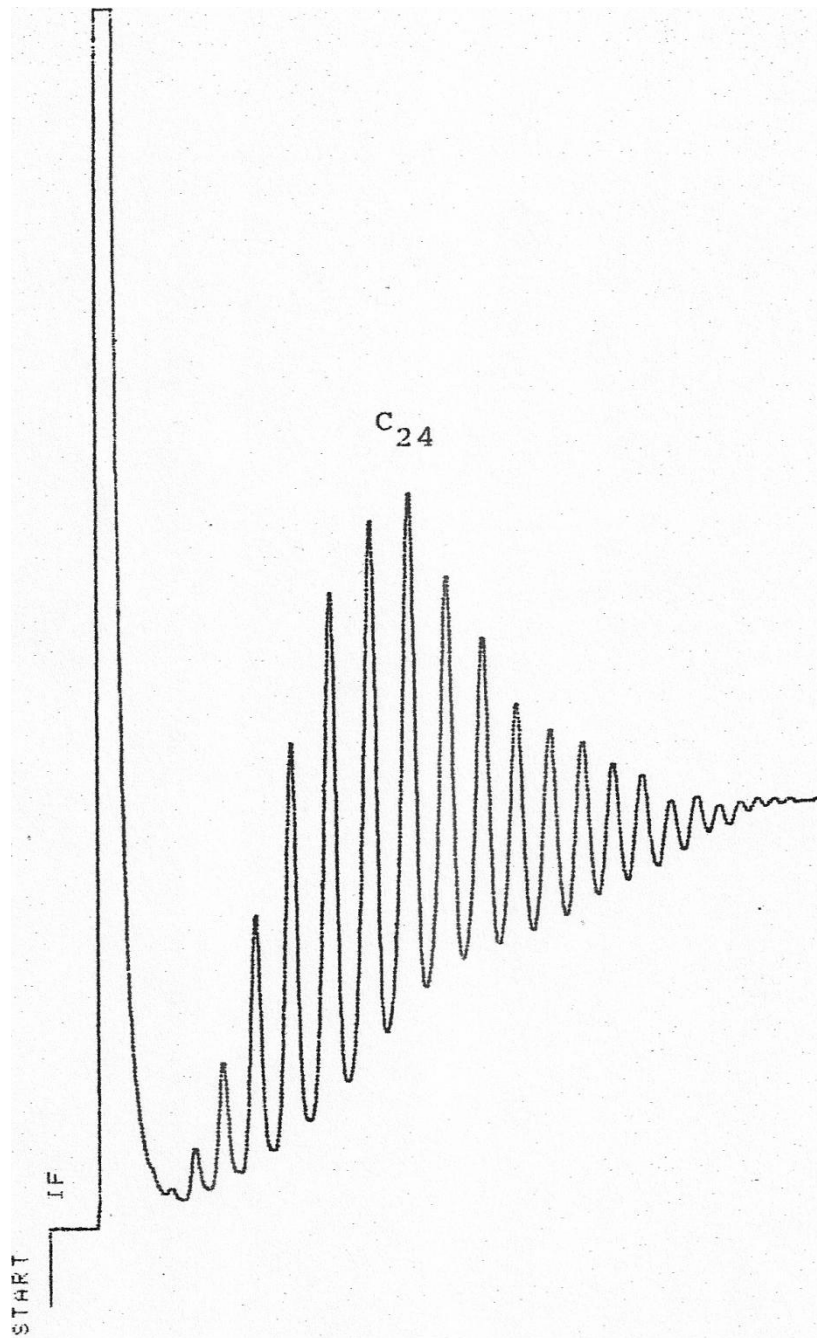
**Figura 40.** Cromatograma de la mezcla de Grob con una columna de 6.0 m x 0.1 mm d.i. recubierta con SE-54 por el método estático, de 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor, entrecruzada con peróxido de dicumilo.

Estos resultados indican que la columna es ligeramente polar; ya que el 1-octanol presenta adsorción en un 20%, la columna presentará poca adsorción por otros grupos menos polares. Esta adsorción de grupos OH puede ser causada principalmente por formación de enlaces hidrógeno con los grupos Si-OH y Si-O-Si de la superficie del tubo.

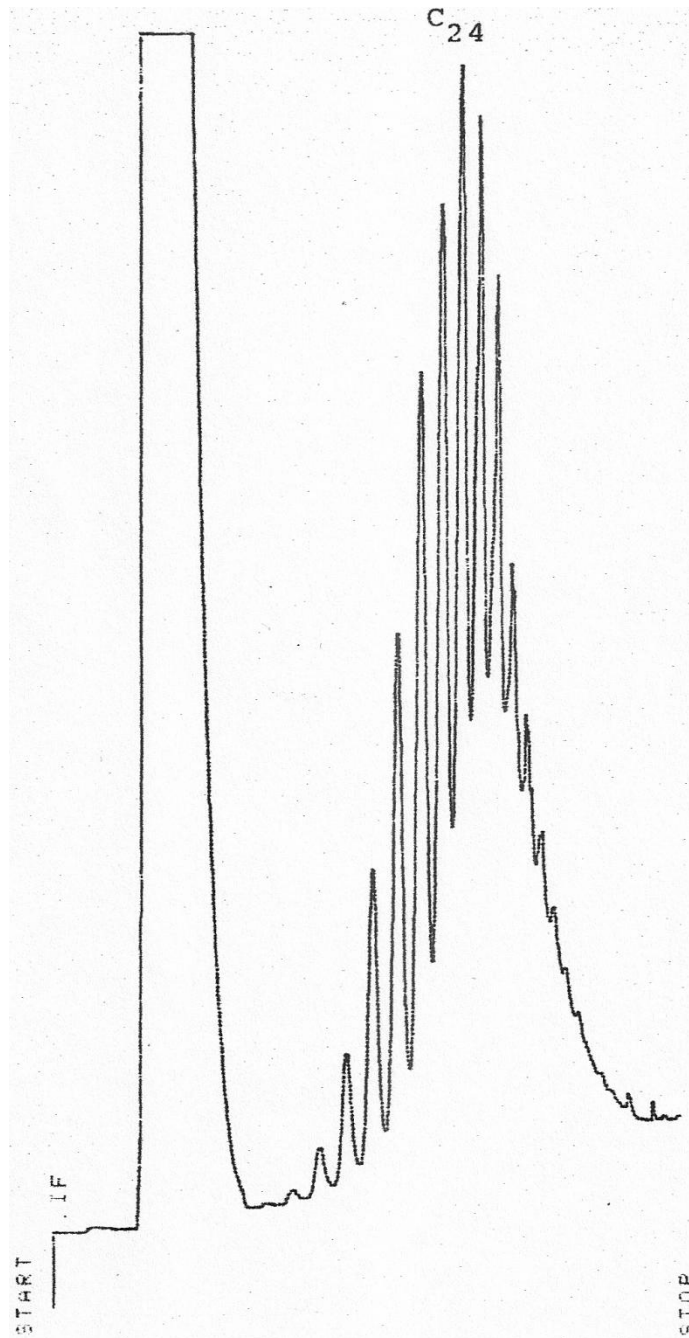
El diol se nota más afectado en la adsorción que el 1-octanol lo que indica un carácter básico de la columna, basicidad comprobada también por la mayor adsorción del fenol (24%) que la anilina (10%) y por el pequeño pico del ácido carboxílico, adsorbido en un 67% y solo un 37% la diciclohexilamina. La adsorción de estos compuestos indica que en la columna predominan los sitios activos básicos sobre los ácidos.

**6.4.4 Evaluación del sistema de CFS con la columna capilar recubierta con SE.54.** La columna capilar recubierta con SE-54 y evaluada como se indicó anteriormente, se instaló en el sistema de CFS y se utilizó en la separación de parafinas de alto peso molecular ( $C_{20}$ - $C_{50}$ ), con un programa de presión de 100 a 350 atmósferas, a diferentes velocidades de programación, obteniéndose los cromatogramas que se muestran en las figuras 40, 41, 42 y 43, en los que se observa que la separación de estos compuestos se logró a baja temperatura y ocurre solamente por el efecto del aumento de la densidad de  $CO_2$  por aumento de la presión. Se observa también una mejor resolución de los picos a menores velocidades de programación, confirmándose que se obtienen mejores resultados a programas más lentos.

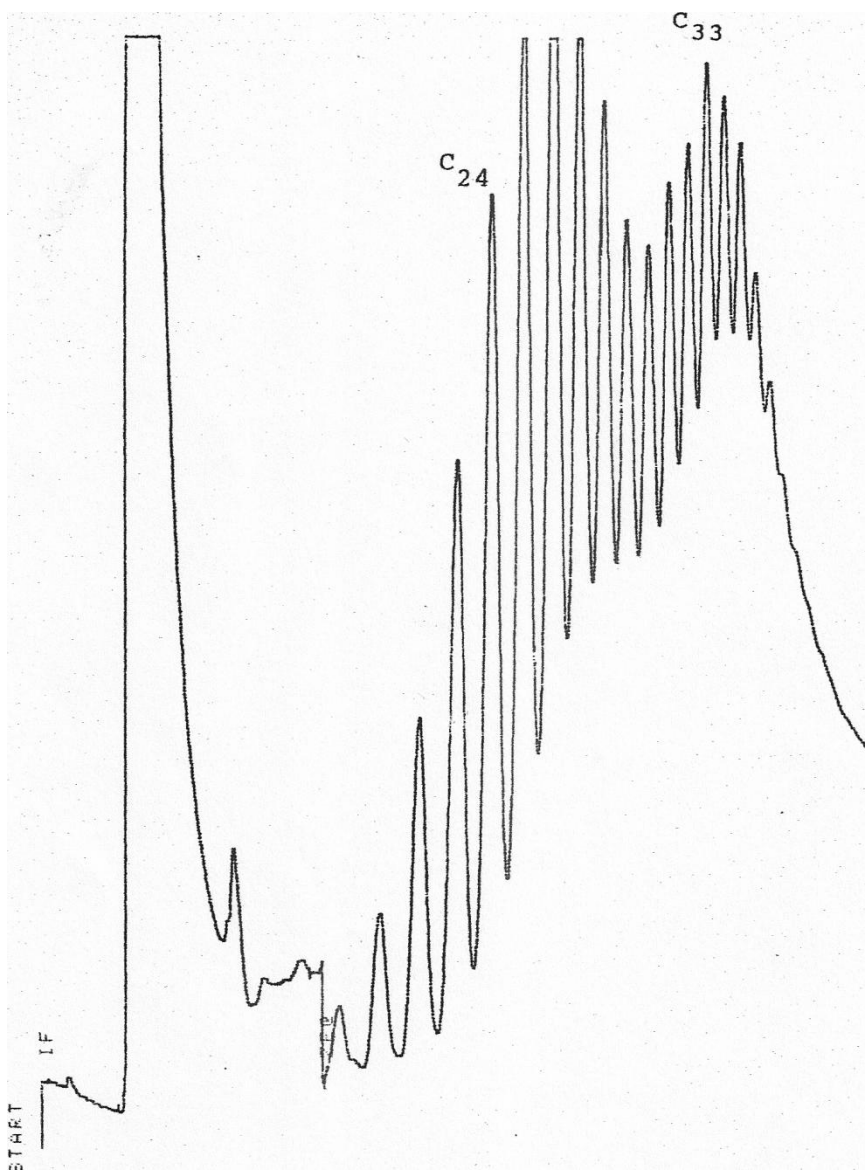
Como la bomba presentó alta eficiencia de llenado (95%), esto permitió trabajar toda una jornada sin la necesidad de volver a llenarla, lo cual indica que el flujo a través de la columna capilar, lo mismo que a través de la microempacada, es bajo, ocasionando una disminución en el consumo de  $CO_2$ , lo que indica un factor económico muy importante.



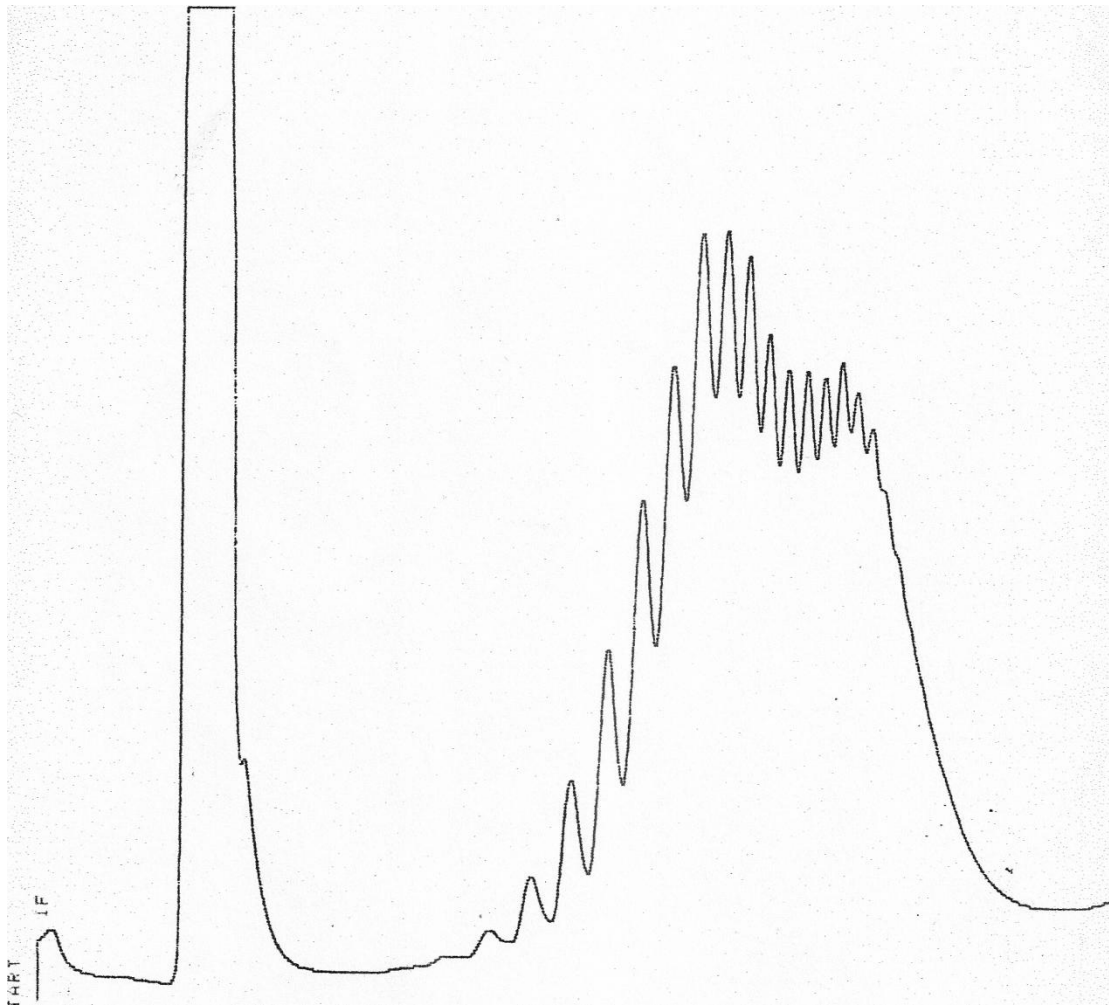
**Figura 41.** Separación de n-parafinas  $C_{20}$  –  $C_{27}$  a presión programada. Presión inicial 100 atm, 3 min; presión final 350 atm. Velocidad aproximada: 14 atm/min. Fase móvil  $CO_2$  a  $100^\circ C$ . Columna: sílice fundida 5 m x 0.1 mm recubierta con SE-54.



**Figura 42.** Cromatograma de una mezcla de n-parafinas ( $C_{21}$ - $C_{27}$ ) a presión programada. Velocidad de programación: aprox. 16 atm/min. Las condiciones son las mismas de la figura anterior



**Figura 43.** Separación de una mezcla de parafina  $C_{20}$ - $C_{50}$  por CFS a presión programada. Presión inicial: 100 atm, 1.5 min. Presión final: 350 atm. Velocidad aproximada: 27 atm/min. La columna es la misma. La fase móvil:  $CO_2$ . Restrictor: sílice fundida 14 cm x 13  $\mu m$  d.i.



**Figura 44.** Separación por CFS de una mezcla de parafinas de C<sub>20</sub>-C<sub>50</sub> a presión programada. Velocidad: aprox. 38 atm/min. Las demás condiciones son las mismas.



## 7. CONCLUSIONES.

7.1 El sistema de CFS construido en el laboratorio se presenta como el inicio del desarrollo de la técnica en el medio cromatográfico mexicano. La aplicación de la técnica a solutos que presenten incompatibilidades con la CG y/o con la HPLC (CLAR), puede abrir campos para que la CFS pueda ser vista como una alternativa a las otras técnicas cromatográficas. Sin embargo es necesario avanzar también en la utilización de los fluidos supercríticos en los procesos de extracción, en sustitución de la extracción con solventes, ya que esto permitirá conocer un poco más sus propiedades, reducir la contaminación asociada a los disolventes orgánicos y así poder aplicarlos con mayor confianza en los procesos cromatográficos.

7.2 Algunos problemas quedan por resolver, el diseño de los divisores de flujo que permitan mejor reproducibilidad en la inyección; lo mismo que el diseño de los restrictores de flujo que puedan garantizar una velocidad óptima de operación de la fase móvil y un proceso de elaboración de los mismos que sea reproducible. Aún hoy, a pesar de los grandes esfuerzos realizados por los investigadores y los avances logrados, es un gran problema a resolver por la CFS.

7.3 La contribución al ensanchamiento de bandas por factores extracolumna es tal vez debida a los problemas anotados, como también al tipo de uniones o conectores utilizados en los divisores de flujo y en los restrictores, los cuales tienen un volumen muerto muy grande para estas columnas.

7.4 La fase móvil utilizada, CO<sub>2</sub> grado seco, presentó algunos problemas en la estabilización de la línea base, dando en algunos momentos, sobre todo al comienzo de una jornada de trabajo, una señal de fondo muy grande,

debido a las impurezas; por lo tanto es necesario utilizar un CO<sub>2</sub> más puro. El uso de CO<sub>2</sub> de alta pureza no aumenta excesivamente el costo de operación con las columnas capilares y microempacadas, debido a que el consumo con estas columnas es menor. Una ventaja del sistema montado es la compatibilidad de la fase móvil con el detector de ionización de llama.

7.5 La técnica de empacado en seco, resultó mejor que el método de la suspensión; el tiempo empleado en la preparación del equipo y en el empacado fue mucho menor y más económica. En el empaque del tubo de sílice fundida, el proceso se puede observar directamente y ofrece un empaque compacto. Esta técnica es una alternativa interesante para la preparación de columnas de calibre muy pequeño.

7.6 La caída de presión en el sistema y a su vez la velocidad lineal de la fase móvil, tanto en columnas capilares como microempacadas, están determinadas por las dimensiones del restrictor, siempre que la expansión del CO<sub>2</sub> no ocurra dentro del restrictor.

7.7 La presión y la temperatura son las variables que compiten fuertemente por la solubilidad de los solutos; el aumento de P produce un incremento de la capacidad solvatante del CO<sub>2</sub> por aumento de su densidad y el aumento de T produce un aumento de la volatilidad del soluto y una disminución de la densidad del CO<sub>2</sub>, predominando en algunos momentos una variable sobre la otra. La elución del soluto es entonces un proceso combinado.

7.8 La columna recubierta con SE-54 ofrece una eficiencia relativamente alta, a pesar de las dificultades operacionales para su recubrimiento y para su evaluación. Es necesario hacer notar que es la primera vez que en el laboratorio de cromatografía de la facultad de química de la UNAM, se recubre una columna capilar de d.i. menor de 200 µm. Esta experiencia

ganada permite realizar trabajos de recubrimiento de columnas capilares de diámetros más pequeños, para preparar columnas de alta resolución.

7.9 Se diseñó un sistema de CFS que permite separar compuestos de altos pesos moleculares a bajas temperaturas. La elución de ellos se debe a los incrementos del programa de presión. A presión programada se reconoce que los mejores resultados se obtienen con programas más lentos.

Al ser la presión una variable fundamental de estos sistemas, es necesario modificar el arreglo utilizado con un circuito adicional (ver ref. 23) que permita un mejor control tanto en programación de presión como en la operación a presión constante.

## 8. BIBLIOGRAFIA.

1. Klesper E., Corwin A. y Turner D., J. Org. Chem. 27, 700 (1962).
2. Novotny M., Springston S., Peaden P., Fjelsted J. y Lee M. Anal. Chem. 53, 407A (1981).
3. Analytical Chemistry 59, 619A (1987).
4. Chester T. L., J. Chromatogr. Sci. 24, 226 (1986).
5. Warner Mary, Anal. Chem. 59, 855A (1987).
6. Lee Jack, Thesis Ph. D., Virginia Polytechnique Institute, 1986.
7. Gere Dennis, Science 222, 253 (1983).
8. Sie S. T. y Rijnders G. W. A., Anal. Chirn. Acta 38, 31 (1967).
9. Giddings J. C., Manwaring W. A. y Myers M. N., Science 154, 146 (1966).
10. McLaren L., Myers M.N. y Giddings J.C., Science 159, 197 (1968).
11. Giddings J.C., Myers M.N., McLaren L. y Keeler R., Science 162, 67 (1968).
12. Myers M.N. y Giddings J.C., Anal. Chem. 37, 1453 (1965).
13. Gouw T.H. y Jentoft R.E., J. Chromatogr. 68, 303 (1972).
14. Jentoft R.E. y Gouw T.H., Anal. Chem. 44, 681 (1972).
15. Jentoft R.E. y Gouw T.H., Anal. Cherm. 48, 2195 (1976).
16. Klesper E., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17, 738 (1978).
17. Randall L.G. y Wahrhaftig A.L., Anal. Chem. 50, 1736 (1968).

18. Graharn J. y Rogers L.B., J. Chromatogr. Sci., 18, 75 (1980).
19. Van Wasen U., Swaid I. y Schneider G., Angew. Cem. Int. Ed. Engl. 19, 575 (1980). O..
20. Karayanis N., Corwin A., Baker E., Klesper E. y Walter J., Anal. Chem 40, 1736 (1(1968)).
21. Gere D., Board R. y McManigill D., Anal. Chem 54, 736 (1982)
22. Peaden P., Fjeldsted J., Lee M., Springston S. y Novotny M., Anal. Chem. 54, 1090 (1982).
23. VanLenten F.J. y Rothman L.D., Anal. Chem. 48, 1430 (1976).
24. Srnith R., Felix W.D., Fjeldsted J. y Lee M., Anal. Chem 54, 1883 (1982).
25. Srnith R., Fjeldsted J. y Lee M., J. Chromatogr. 247, 231 (1982).
26. Fjeldsted J., Jackson W.P., Peaden P.A. y Lee H., J. Chromatogr. Sci. 21, 222 (1983).
27. Drushel Harry, J. Chromatogr. Sci. 21, 327 (1983).
28. Lauer H., McManigill D. y Board R., Anal. Chem. 55, 1370 (1983).
29. Shafer K. y Griffiths P., Anal. Chem. 55, 1939 (1983).
30. Srnith R. y Udseth H., Anal. Cherna 55, 2266 (1983).
31. Schrnitz F., Hilgers H. y Klesper E., J. Chromatogr. 267, 267 (1983).
32. Fjelsted J.C., Ritcher B.E., Jackson W.P. y Lee H., J. Chromatogr. 279, 423 (1983).
33. Fjedsted J.C., Kong R.C. y Lee M.L., J. Chronatogr. 279, 449 (1983).

34. Fjeldsted J. y Lee M., Anal. Chem. 56, 619A (1984).
35. Rawdon Michael, Anal. Chem. 56, 831 (1984).
36. Kong R., Fields S., Jackson W.P. y Lee M., J. Chromatogr. 289, 105 (1984).
37. Hirata Y. y Nakata F., J. Chromatogr. 294, 357 (1984).
38. Tsuda T., Tanaka I. y Nakagawa G., Anal Chem. 56, 1249 (1984)
39. Hirata B. y Nakata F., J. Chromatogr. 295, 315 (1984).
40. Takeuchi T., Ishii D, Saito M. y Hibi K., J. Chromatogr. 295, 323 (1984).
41. Springston S. y Novotny H., Anal. Chem. 56, 1762 (1984).
42. Norris T. y Rawdon M., Anal. Chem. 56, 1767 (1984).
43. Chester T.L., J. Chromatogr. 299, 424 (1984).
44. Srnith R., Kalinoski H., Udseth H. y Wright B., Anal. Chem. 56, 2476 (1984).
45. Smith R., Udseth H. y Kalinoski H., Anal. Chem. 56, 2973 (1984).
46. Wright B., Udseth H., Srnith R. y Hazlett R., J. Chromatogr. 314, 253 (1984).
47. Leyendecker D., Schmitz F. y Klesper E., J. Chromatogr. 315, 19 (1984).
48. Hirata Yukio, J. Chromagr. 315, 31 (1984).
49. Hirata Yukio, J. Chromagr. 315, 39 (1984).
50. Smith R., Udseth H. y Wright B., J. Chromatogr. Sci. 23, 192 (1985).

51. Fields S.M. y Lee M.L., J. Chromatogr. 349, 305 (1985).
52. Blilie A.L. y Greibrokk T., J. Chromatogr. 349, 371 (1985).
53. Blilie A.L. y Greibrokk T., Anal. Chem 57, 2239 (1985)
54. Lundanes E. y Greibrokk T., J. Chromatogr. 349, 439 (1985)
55. Konishi M., Mori Y. y Amano T., Anal. Chem. 57, 2235 (1985)
56. Chester T.L., Innis D.P. y Owens G.D., Anal. Chem. 57, 2243 (1985)
57. Crowther J.B. y Henion J.D., Anal. Chem. 57, 2711 (1985)
58. Mourier P.A., Eliot E., Caude M.H., Rosset R.H. y Tambute A. Anal. Chem. 57, 2819 (1985).
59. Wright B.W., Kalinoski H.T. y Smith R.D., Anal. Chem. 57, 2823 (1985).
60. Smith R.D., Chapman E.G. y Wright B.W., Anal. Chem. 57, 2829 (1985).
61. Hughes M.E. y Fasching J.M. , J. Chromatogr. Sci. 24, 535 (1985).
62. Ogden M.W. y McNair H. M., J.H.R.C. & C.C. 8, 816 (1985).
63. Shafer K H. , Pentoney S.L.Jr. y Griffiths P.R., Anal. Chem. 58, 58 (1986).
64. French S.B. y Novotny M., Anal. Chem. 58, 164 (1986).
65. Hensley J.L. y McNair H.M., J. Liquid Chromatogr. 9, 1985 (1986).
66. Jordan J.W. y Taylor L.T., J. Chromatogr. Sci. 24, 82 (1986).
67. Hellgeth J.W., Jordan J.W., Taylor L.T. y Ashraf-khorassani, J. Chromatogr. Sci. 24, 183 (1986).

68. Pentoney S.L.Jr, Shafer K.H. y Griffiths P.R., J. Chromatogr. Sci. 24, 230 (1986).
69. Guthrie E.J. y Schwartz H.E., J. Chromatogr. Sci. 24, 236 (1986).
70. Levy J.M. y Ritchey W.M., J. Chromatogr. Sci. 24, 242 (1986).
71. Later D.W., Richter B.E., Knowles D.E. y Andersen M.R., J Chromatogr. Sci. 24, 249 (1986).
72. Markides K.E., Fields S.M. y Lee M.L., J. Chromatogr. Sci. 24, 254 (1986).
73. Srnith R.D., Fulton J.L., Petersen R.C., Kopriva A.J. y Wright B.W., Anal. Chem 58, 2057 (1986).
74. Rokushika S., Hatano H. y Hill H.H.Jr., Anal. Chern 59, 8 (1987) •
75. Srnith R.D. y Udseth H.R., Anal. Chem. 59, 13 (1987)
76. Gunderson J.J., Myers M.N. y Giddings J.C., Anal Chem. 59, 23 (1987).
77. Wright B.W., Wright C.W., Gale R.W. y Srnith R.D., Anal. Chem. 59, 38 (1987).
78. Jahn K.R. y Wenclawiak B.W., Anal. Chem. 59, 382 (1987).
79. Wright B.W., Frye S.R., McMinn D.G. y Srnith R.D., Anal. Chem. 59, 640 (1987).
80. Pentoney S.L.Jr., Giorgetti A. y Griffiths P., J Chromatogr. Sci. 25, 93 (1987).
81. Leyendecker D., Schnitz F.P., Leyendecker D. y Klesper E., J. Chromatogr. 393, 155 (1987).
82. Yonker C.R. y Srnith R.D., Anal. Chem. 59, 727 (1987).



83. Yonker C.R., McMinn D., Wright B.W. y Smith R.D., J.Chromatogr. 396, 19 (1987).
84. Pariente G.L., Pentoney S.L.Jr., Griffiths R.P. y Shafer K.H., Anal. Chem. 59, 808 (1987).
85. Greibrokk T., Berg B.E., Blilie A.L. Doehl J., Farbrot A. y Lundanes A., J. Chromatogr. 394, 429 (1987).
86. Raymer J.H. y Pellizari E.D., Anal. Chem. 59, 1403 (1987).
87. Raymer J.H., Pellizari E.D. y Cooper S. D., Anal. Chem 59, 2069 (1987).
88. Sassiati P.R., Mourier P., Caude M.H. y Rosset R.H., Anal Chem. 59, 1164 (1987).
89. Schoenmakers P.J., Rothfus P.E. y Verhoeven F.C.C.J.G., J. Chromatogr. 395, 91 (1987).
90. Smith R.D., Kalinoski H.T. y Udseth H.R., Mass Spectrom. Rev. 6, 445 (1987).
91. Hawthorne S.B. y Miller D.J., Anal. Chem. 59, 1705 (1987).
92. Ashraf-Khorassani M, Hellgeth J.W. y Taylor L.T., Anal. Chem. 59, 2077 (1987).
93. Carraud P., Thiebaut D., Caude M., Rosset R., Lafosse M. y Dreux M., J. Chromatogr. Sci. 25, 395 (1987).
94. Dooley K.M. y Knopf F.C., Ind. Eng. Chem. Res. 26, 1910 (1987)
95. Dooley K.M., Kao Chien-Ping, Gambrell R.P. y Knopf F.C., Ind. Eng. Chem. Res. 26, 2058 (1987).

96. Lahiere R.J. y Fair J.R., *Ind. Eng. Chem. Res.* 26, 2086 (1987)
97. Fields S.M., Markides K.E. y Lee M.L., *J. Chromatogr.* 406, 223 (1987).
98. Goates S.R., Zabriskie N.A., Simons J.K. y Khoobehi B., *Anal. Chem.* 59, 2927 (1987).
99. McNally M.E.P. y Wheeler J.R., *J. Chromatogr.* 435, 63 (1988).
100. Raynor M.W., Kithinji J.P., Barker I.K., Bartle K.D. y Wilson I.D., *J. Chromatogr.* 436, 497 (1988).
101. Campbell R.M., Djordjevic N.M., Markides K.E. y Lee M.L., *Anal. Chem.* 60, 356 (1988).
102. Hawthone S.B., Krieger M.S. y Miller D.J., *Anal. Chem.* 60, 472 (1988).
103. Kalinoski H.T. y Srnith R.D., *Anal. Chem.* 60, 529 (1988)
104. Pinkston J.D., OWens G.D., Burkes L.J., Delanay T.E., Millington D.S. y Maltby D.A., *Anal. Chem.* 60, 962 (1988).
105. Wright B.W., Udseth H.R., Chess E.K. y Smith R.D., *J. Chromatogr. Sci.* 26, 228 (1988).
106. Davies I.L., Raynor M.W., Kithinji J.P., Bartle K.D., Williams P.T. y Andrews G.E., *Anal. Chem.* 60, 683A (1988).
107. Clement R.E., Omuska F.I., Eiceman G.A. y Hill H.Jr., *Anal. Chem.* 60, 279R (1988).
108. Schwartz H.E., *J. Chromatogr. Sci.* 26, 275 (1988).
109. Chang H.C.K., Markides K.E., Bradshaw J.S. y Lee M.L., *J. Chromatogr. Sci.* 26, 280 (1988).

110. Ashraf-Khorassani M. y Taylor L.T., J. Chromatogr. Sci. 26, 331 (1988).
111. Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. y Henry R.A., Anal. Chem. 60, 1529 (1988).
112. Schneiderman M.A., Sharma A.K. y Locke D.C., J. Chromatogr. Sci 26, 458 (1988).
113. Strubinger J.R. y Selim M.I., J. Chromatogr. Sci. 26, 579 (1988).
114. Caude M. y Rosset R., Analisis 14, 310 (1986).
115. Chester T. L., Pinkston J. D. y Raynie D. E. Anal. Chem. 64, 153R (1992).
116. Schurig V et al. J. Chromatogr. A, 694, 119 (1995).
117. Whatley J. J. Chromatogr. A, 697, 251 (1995).
118. Wilkins S. M., Taylor, D. R. y Smith R. J. J. Chromatogr. A, 697, 587 (1995).
119. Bartle Keith D et al. J. Chromatogr. A, 697, 579 (1995).
120. Yamada Aya et al. J. Chromatogr. A, 709, 345 (1995).
121. Taylor Larry T. J. of Supercritical Fluids 47, 566 (2009)
122. Gaudin Garen et al. J. Chromatogr. A, 883, 211 (2000)
123. Stringham Rodger W. J. Chromatogr. A, 1070, 163 (2005)
124. West C. y Lesellier E. J. Chromatogr. A, 1087, 64 (2005)
125. Gurdale K, Lesellier F y Tchaplal A. J. Chromatogr. A 866, 241 (2000)

126. Hirata Yukio, Tsuda Katsuhito e Imamura Etsuro. J. Chromatogr. A, 1062, 269 (2005).
127. Rajendran A., Krauchi O., Mazzoti M y Morbidelly M. J. Chromatogr. A, 1092, 149 (2005)
128. Toribio L. et al. J. Chromatogr. A, 1091, 118 (2005)
129. Chou Fu-Min, Wang Wei-Ting y Wei Guor-Tzo. J. Chromatogr. A. 1216, 3594 (2009)
130. Poe Donald y Schrodin Jonathan. J. Chromatogr. A. 1216, 7915 (2009)
131. Desmorteux C., Rothaupt M., West C. y Lesellier E. J. Chromatogr. A. 1216, 2088 (2009).
132. François Isabelle y Sandra Pat. J. Chromatogr. A. 1216, 4005 (2009).
133. Pirzada Zainab et al. J. Chromatogr. A. 1217, 1134 (2010).
134. Xie Jianchun et al. Food Chemistry 124, 1107 (2011).
135. Aurigemma Christine y Farrell William. J. Chromatogr. A. 1217, 6110 (2010)
136. Adam Frédérick et al. J. Chromatogr. A. 1217, 1386 (2010).
137. Kaczmarek Krzysztof, Poe Donald P. y Guiochon Georges. J. Chromatogr. A (2010) 10.1016/j.chroma.2010.08.035.(en prensa)
138. Nguyen Son T et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 5739 (2010).
139. Atkins, P.W., Fisicoquímica, Fondo Educativo Interamericano, México, 1986.

140. Bevan O.J., Rex G.J. y Tracy H.H.Jr., J. Chem. Ed. 48, 515 (1971)
141. Giddings J.C., Bowman L.M.Jr. y Myers M.N., Anal. Chem. 49, 243 (1977).
142. Mourier P., Sassiati P., Caude M. y Rosset R., Analisis 12, 229 (1984).
143. Yonker C.R., Gale R.W. y Srnith R.D., J. Phys. Chem. 91, 3333 (1987).
144. Van Wasen U. y Schneider G.M., Chromatographia 8, 274 (1975).
145. Ogden M.W. y NcNair H.M., J.H.R.C. & C.C. 8, 326 (1985).
146. Grob K.Jr., Grob G. y Grob K., J. Chromatogr. 156, 1 (1978).
147. Grob k, Grob G. y Grob K.Jr., J. Chromatogr. 219, 13 (1981).