

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS GC/MS

La cromatografía es una técnica para separar las sustancias químicas que se basa en las diferencias en conductas partitivas de una fase móvil y de una fase estacionaria para separar los componentes en la mezcla.³⁵

La muestra es transportada por una corriente de gas a través de una columna empacada con un sólido o tal vez recubierta con una película de algún líquido. Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de la mezclas, la cromatografía de gas es una de las herramientas mas importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos de mezclas, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas tales como calores de solución y vaporización, presión de vapor y coeficientes de actividad.³⁵

La cromatografía de gases es también utilizada para monitorear los procesos industriales en forma automática: se analizan corrientes de gas periódicamente y se analizan reacciones de forma manual o automática para contrarrestar variaciones no deseadas.³⁵

La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa-carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos.

La MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales inorgánicos y orgánicos.³⁵

Condiciones de los solventes

Los solventes que se utilizan en este método deben ser de la máxima calidad que se puedan adquirir para evitar incertidumbres en el resultado. También deben ser comprobados por GC/MS antes de utilizarse para identificar impurezas. En dado caso que contengan impurezas será necesario concentrar los solventes bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente con el fin de desplazarlas.³⁶

Condiciones del equipo de vidrio y metal

Todo equipo de vidrio y metal debe estar completamente limpio y se debe seguir el siguiente protocolo de limpieza:

Lavar todo instrumento con detergente y agua. Después enjuagar con agua tri destilada, el instrumento de vidrio debe ser cubierto con papel aluminio y calentarlos a 400 °C por 4 horas.³⁶

Toma de muestra

Las muestras de sangre serán tomadas por punción venosa, con una aguja de acero inoxidable y esterilizada. Se depositará en tubos de ensaye de vidrio previamente calentados.³⁶

5 mL de muestra se mezclaran con 10 000 IE de heparina y debe acidificarse con acido fosfórico. Después cubrir los tubos con papel aluminio con el propósito de evitar el contacto de la muestra con el tapón del tubo de ensaye.

Las muestras serán congeladas en un refrigerador a -20°C donde serán almacenadas hasta el día de su análisis.³⁶

Mediciones adicionales para el control de contaminación

La muestra debe de ser tomada sin ningún instrumento de plástico (como Vacutainer, torniquete, etc.) se deben utilizar instrumentos fabricados con materiales alternos como el vidrio. Se recomienda utilizar guantes de nitrilo para la recolección debido a que contienen una cantidad insignificante de ftalatos.³⁶

Las muestras deben ser acidificadas con ácido fosfórico (1M; $125\mu\text{L}/\text{mL}$) cerca de una hora después de su obtención con el fin de evitar la hidrólisis enzimática de los ésteres de ftalato.³⁶

Análisis en GC/MS

Las muestras de sangre serán descongeladas y diluidas con agua ultra pura, después la muestra será extraída dos veces con hexano: MTBE (1:1; 5mL) por 30 min. Una extracción final se realizará con hexano por 15 min. El extracto debe ser limpiado en una columna de amino propileno.³⁶ El extracto será analizado por un CG 6990N marca Agilent acoplado a un detector de masas 5973 marca Agilent. La inyección será por medio de pulsaciones por medio de un inyector Split-Splitless a 250°C . se debe utilizar una columna capilar de silica fundido (VF-5MS 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness, Varian) la cual será calentada 45°C por 2 minutos., aumentará 35°C por minuto hasta llegar a 100°C , y por ultimo 10°C por minuto hasta llegar a 295°C una vez ahí mantener por 10 minutos.³⁶

Debe utilizarse helio como gas acarreador (1 mL/min; 36 cm/s), la línea de transferencia de temperatura del espectrómetro de masas será de 290 °C. el detector debe ser utilizado en el modo de monitoreo selecto de ion con ionización del electrón con una energía de 70 eV. Los analitos serán identificados por sus características de tiempo de retención y por una cuantificación ion. Cada muestra debe analizarse por lo menos 2 veces para tener mayor número de datos y así aumentar la especificidad.³⁶

La cuantificación será basada en los estándares internos de la metodología. Los resultados deben de ser corregidos de acuerdo a su estándar. Para la calibración del estándar es recomendable utilizar un estándar con una mezcla que contenga los principales ftalatos. DEHP, DBP, BBzP, DOP, DIDP.³⁶

Cada ftalato incluido en el estándar se mostrara según su tiempo de retención (tabla 8).

Limite de detección

El límite de detección puede ser establecido de diferentes maneras dependiendo del tipo del método.³⁶

En el caso de métodos establecidos como oficiales casi nunca es necesario determinar el límite actual de cuantificación. Preferiblemente el límite de detección de trabajo debe ser mas bajo del nivel de detección requerido por la especificación. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza al nivel de 0.1%, se debe demostrar que el procedimiento realmente detecta la impureza a este nivel.³⁶

Tabla 8. Tiempo de retención para varios ftalatos.

Ftalato	Tiempo de retención (minutos)
Di Etilhexil ftalato	28.2
Di butil ftalato	23.0
Di isobutil ftalato	22.2
Di ethil ftalato	19.1

Fuente: Andreas Hoffman 2001

Existen diferentes formas de determinar el límite de detección cualquiera que sea el método utilizado, requiere del análisis de un número adecuado de muestras conocidas que deben estar cercanas o preparadas a la concentración del límite de detección requerido para el tipo de ensayo a analizar.³⁶

El límite de detección para los ftalatos están en un rango de 0.1ng/mL a 3.0 ng/mL, estos se muestran en la tabla 9.³⁶

Control de calidad

Muchas sustancias al inyectarse en GC/MS sufren varios procesos (fragmentación, filtración) lo que ocasiona que tengan cambios estructurales, otro problema que se puede presentar es que los analitos queden retenidos o atrapados en los filtros del mismo GC/MS. Y debido a estos problemas podremos obtener falsos resultados.³⁷

Por lo tanto es necesario corregir estos resultados mediante un índice de recuperación. El cual puede obtenerse al analizar una muestra, con una cantidad conocida de cierto analito y si el resultado es menor a la cantidad real, es necesario realizar un ajuste.³⁷

El rango de recuperación para el estándar de 5 ftalatos marca Ultra Scientific es de 58%.³⁷

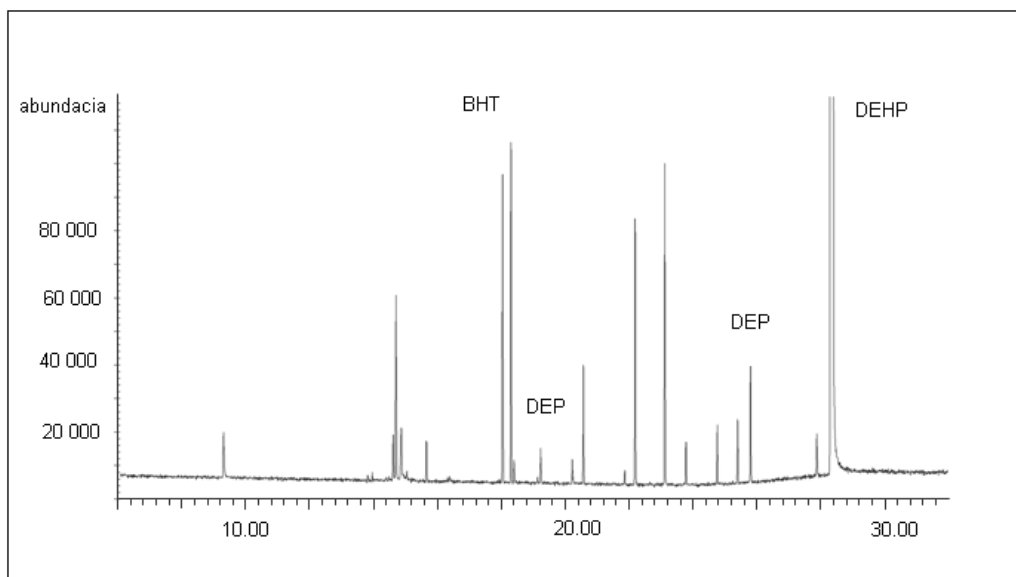
Los picos obtenidos de la muestra control serán analizados paralelamente con los picos corregidos de la muestra desconocida determinando mediante el área de cada pico la concentración del ftalato que se desea analizar.³⁸ El Cromatograma incluido en la figura 3 es el correspondiente del análisis del estándar de 5 ftalatos marca Ultra Scientific.

Tabla 9. Límite de detección para los principales ftalatos.

Analito	Límite de detección (ng/mL)	Abreviación
Di etilhexil ftalato	1.0	DEHP
Dibutil ftalato	0.43	DBP
Di octil ftalato	1.4	DOP
Diisononil ftalato	<100	DINP
Diisodecil ftalato	<100	DIDP
Dibutil ftalato	0.43	DBP

Fuente : Hannika Hamberg 2005

Figura 3. Cromatograma para diferentes ftalatos



Fuente: Andrea Hoffman 2001