

Revisió

La cromatografia com a principi de mesura: classificació, fonaments teòrics i aplicació en les ciències de laboratori clínic

Raül Rigo Bonnin

Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat

ÍNDEX

1. Introducció
2. Vocabulari
3. Sigles i símbols
4. Classificació dels principis cromatogràfics
 - 4.1 Classificació segons el procediment cromatogràfic desenvolupat
 - 4.1.1 Cromatografia frontal
 - 4.1.2 Cromatografia per desplaçament
 - 4.1.3 Cromatografia per elució
 - 4.2 Classificació segons el tipus de llit cromatogràfic
 - 4.2.1 Cromatografia en columna
 - 4.2.2 Cromatografia plana
 - 4.3 Classificació segons l'estat físic de la fase mòbil
 - 4.3.1 Cromatografia de gasos
 - 4.3.2 Cromatografia de líquids
 - 4.3.3 Cromatografia de fluids supercrítics
 - 4.4 Classificació segons el mecanisme de separació
 - 4.4.1 Cromatografia d'adsorció
 - 4.4.2 Cromatografia de repartiment
 - 4.4.3 Cromatografia de bescanvi iònic
 - 4.4.4 Cromatografia d'exclusió
 - 4.4.5 Cromatografia d'afinitat
5. Fonaments teòrics de la cromatografia
 - 5.1 Paràmetres de retenció
 - 5.2 Paràmetres de retenció
 - 5.3 Paràmetres de separació
 - 5.4 Paràmetres d'eficàcia

- 5.4.1 Teoria del plat
- 5.4.2 Teoria de la velocitat o cinètica
 - 5.4.2.1 Terme A de l'equació de Van Deemter: difusió per turbulència o difusió d'Eddy; terme del camí múltiple
 - 5.4.2.2 Terme B de l'equació de Van Deemter: difusió longitudinal
 - 5.4.2.3 Terme C de l'equació de Van Deemter: resistència a la transferència de massa
- 5.4.3 Altres factors que influeixen en l'eficàcia
- 5.5 Paràmetres de simetria
- 5.6 Paràmetres de resolució
- 6. Aplicació de la cromatografia en les ciències de laboratori clínic
 - 6.1 Anàlisi qualitativa
 - 6.2 Anàlisi quantitativa
 - 6.2.1 Procediment del patró extern
 - 6.2.2 Procediment del patró intern
 - 6.2.3 Procediment de normalització d'àrees
 - 6.3 Exemple de propietats qualitatives i magnituds biològiques que poden ser examinades o mesurades mitjançant sistemes cromatogràfics
 - 6.3.1 Cromatografia d'adsorció
 - 6.3.2 Cromatografia de repartiment
 - 6.3.3 Cromatografia de bescanvi iònic
 - 6.3.4 Cromatografia d'exclusió molecular
 - 6.3.5 Cromatografia d'afinitat
- 7. Bibliografia

1. INTRODUCCIÓ

El descobriment de la cromatografia com a principi de mesura es va produir a mitjans del segle XIX quan el químic alemany Friedrich Runge va utilitzar paper de filtre per a la separació de diverses anil·lines. Posteriorment, l'any 1910, el botànic rus Mikhail Tswet va usar columnes d'adsorció de líquids per separar pigments vegetals (clorofil·les i xantofil·les). Tswet feia passar diferents dissolucions d'aquestes substàncies a través d'una columna de vidre farcida de carbonat de calci que, finament dividit, donava un material porós que interaccionava de forma diferent amb els components de la barreja, separant-los en distintes bandes de colors al llarg de la columna. A aquest procés de separació el va anomenar "cromatografia" (del grec *chroma* i *graphein* que signifiquen "color" i "escriure", respectivament). Després del seu descobriment, la cromatografia va quedar pràcticament oblidada fins l'any 1930, any en

què va ser redescoberta per Richard Kuhn i Edgard Lederer, els quals la van aplicar per a la separació de diferents carotenoids. A partir d'aquest moment, l'ús de la cromatografia es va anar estenent cada vegada més, alhora que es varen anar desenvolupant diferents tipus de la mateixa: la cromatografia de repartiment, descoberta per Archer Martin i Richard Synge el 1941; la cromatografia de paper, descrita per primera vegada per Ralph Consden, Andrew Gordon i Archer Martin el 1944; la cromatografia en capa fina, descoberta per Egon Stahl el 1958; entre altres. Una fita important de la cromatografia va ser el descobriment de la cromatografia de gasos, desenvolupada per Archer Martin i Anthony James el 1952, i la cromatografia líquida d'alta eficàcia, descoberta per Csaba Horváth el 1962, les quals van trobar ràpidament multitud d'aplicacions de gran importància a l'àmbit de les ciències de laboratori. Aquests descobriments van originar el desenvolupament de les teories de la separació

cromatogràfica vigents en l'actualitat: teoria del plat teòric (Archer Martin i Richard Synge el 1952) i la teoria de la velocitat (JJ Van Deemter el 1956 i Calvin Giddings el 1965) (1-6).

Amb el temps, els sistemes amb procediments de mesura basats en mètodes cromatogràfics (sistemes cromatogràfics) han adquirit un paper més rellevant en les ciències de laboratori clínic donades les seves elevades capacitats per separar, aïllar, identificar i quantificar diversos components d'una mostra. Aquestes característiques, conjuntament amb les propietats metrològiques que presenten, ha fet que avui dia se'ls arribi a considerar procediments de mesura de referència.

La cromatografia permet la separació dels components d'una mostra degut a la influència de dos efectes contraposats:

- a) Retenció. És l'efecte produït sobre els components d'una mostra per una fase estacionària, que pot ser un sòlid o un líquid ancorat en un suport sòlid.
- b) Desplaçament. És l'efecte exercit sobre els components d'una mostra per una fase mòbil, que pot ser un líquid, un gas o un fluid supercrític.

En primer lloc, en un procés cromatogràfic, la mostra (o un extracte de la mostra) que conté els components a separar ha de ser dissolta en la fase mòbil. Posteriorment, la fase mòbil és impulsada a través d'una fase immòbil, que ha de ser immiscible (insoluble) amb ella, la qual es coneix com a fase estacionària, i que pot ser sòlida o líquida. Les fases són escollides de tal manera que els components de les mostres presenten diferències quant a les seves propietats fisicoquímiques (solubilitat, grandària, força iònica, polaritat, afinitat, entre altres) per a cada

fase. Les interaccions químiques entre la fase mòbil i la mostra, i entre la mostra i la fase estacionària, determinen el grau de migració, separació i retenció dels components continguts en la mostra. Aquells components que són fortament retinguts per la fase estacionària es mouen lentament amb el flux de la fase mòbil; per contra, els components que s'uneixen dèbilment a la fase estacionària, es mouen amb rapidesa. Com a conseqüència de la diferent mobilitat, els components de la mostra se separen en zones o bandes discretes podent ser identificats i quantificats.

Aquest document pretén donar a conèixer els fonaments bàsics de la cromatografia, així com enumerar els diferents tipus de cromatografia existents en l'actualitat i les seves principals aplicacions en les ciències de laboratori clínic.

2. VOCABULARI

En aquest document són aplicables, entre altres, els termes cromatogràfics o químics de la Federació Internacional de Química Pura i Aplicada (d'ara endavant, IUPAC) (7, 8):

Columna: tub que conté la fase estacionària i a través del qual discorre la fase mòbil

columna farcida: tub que conté un farciment sòlid

columna oberta: columna, generalment de petit diàmetre, en la qual tant la paret interna del tub com un líquid o un sòlid actiu dipositat sobre aquesta paret actuen com a fase estacionària i on existeix un camí obert, sense restriccions, pel qual circula la fase mòbil

cromatografia: principi de mesura físic de separació en el qual els components a separar d'una mostra es distribueixen entre dues fases, una que és estacionària (fase estacionària) mentre que l'altra, (la fase mòbil) es mou en una direcció determinada

cromatograma: gràfic o altre tipus de representació de la resposta d'un detector, de la concentració del

component d'una mostra en l'efluent o d'una altra magnitud utilitzada per mesurar una propietat de l'efluent, enfront al volum o temps de retenció dels components d'una mostra

cromatògraf: sistema de mesura que permet dur a terme la separació cromatogràfica

NOTA: L'expressió *sistema cromatogràfic*, sovint s'emptra per designar un cromatògraf.

difusió: extensió, propagació, dispersió o disseminació d'un material gasós o líquid

efluent: fase mòbil que surt de la columna cromatogràfica

elució: fenomen de migració dels components d'una mostra al llarg de la fase estacionària, impulsats per la fase mòbil

elució isocràtica: tipus d'elució on la composició de la fase mòbil roman constant durant tot el procés cromatogràfic

elució en gradient: tipus d'elució on la composició de la fase mòbil canvia contínuament o en diferents passos durant el procés cromatogràfic

factor de retenció: mesura del temps que un component d'una mostra roman en la fase estacionària, en relació al temps que roman en la fase mòbil

factor de separació: valor de la retenció relativa entre dos pics cromatogràfics pròxims

fase estacionària: una de les dues fases que formen part d'un sistema cromatogràfic. Pot ser un sòlid, un gel, o un líquid. Si és un líquid, pot estar adherit sobre un sòlid. Aquest sòlid pot o no contribuir al procés de separació. El líquid també es pot unir químicament al sòlid (*fase unida químicament*) o immobilitzar-se sobre el sòlid (*fase immobilitzada*)

NOTA: L'expressió *llit cromatogràfic o sorbent*, fa referència a qualsevol de les formes en les que es presenta la fase estacionària.

fase unida químicament: fase estacionària que es troba covalentment unida a les partícules del suport o a la paret interna del tub de la columna

fase immobilitzada: fase estacionària que es troba immobilitzada sobre les partícules del suport o sobre la paret interna del tub de la columna

fase mòbil: fluid que penetra a través o al llarg del llit cromatogràfic en una direcció determinada. El fluid pot ser un líquid, un gas o un fluid supercrític

flux: volum de fase mòbil que passa a través de la columna per unitat de temps

nombre de plats: nombre que indica les prestacions i eficàcia d'una columna

pic cromatogràfic: part d'un cromatograma que mostra la resposta del detector quan un component d'una mostra és eluït de la columna. Dos o més components es poden eluir com un pic sense resoldre quan la seva separació és incompleta

polaritat (químic): propietat d'un enllaç químic, un àtom o una molècula per la qual existeix una separació estable entre les càrregues positives i negatives

pressió crítica: pressió mínima que seria suficient per liquar una substància a la seva temperatura crítica

resolució: separació entre dos pics cromatogràfics amb relació a les mitjanes de les seves amplades a la base

sòlid actiu: sòlid porós amb propietats adsorptives que permet dur a terme una separació cromatogràfica

solut: components d'una mostra en una cromatografia de repartiment

suport sòlid: sòlid que sosté la fase estacionària i que, idealment, no contribueix al procés de separació

temperatura crítica: temperatura a partir de la qual no es pot liquar un gas

temps bàsic de retenció: temps transcorregut requerit per eluir un component d'una mostra on la seva concentració en la fase estacionària és menyspreable comparada amb la de la fase mòbil, és dir, la fase estacionària no reté l'esmentat component. Així, el temps bàsic és el temps total de retenció d'un component que no és retingut

NOTA: Al temps bàsic de retenció també se l'anomena pel terme no recomanat per la IUPAC *temps mort*.

temps de retenció ajustat: temps total de retenció menys el temps bàsic de retenció

temps total de retenció: temps transcorregut des que el component d'una mostra és injectat fins que arriba al detector

volum bàsic de retenció: volum de fase mòbil requerit per eluir un component d'una mostra on la seva concentració en la fase estacionària és menyspreable comparada amb la de la fase mòbil, és dir, la fase estacionària no reté l'esmentat component. Així, el volum bàsic és el volum total de retenció d'un component que no és retingut

NOTA: Al volum bàsic de retenció també se l'anomena pel terme no recomanat per la IUPAC *volum mort*.

volum de retenció ajustat: volum total de retenció menys el volum bàsic de retenció

volum extra-columna: volum existent entre el punt d'injecció real d'una mostra i els punts reals de detecció dels components de la mateixa, exclouent el volum de la columna, és a dir, la suma dels volums de l'injector, les línies de connexió i del detector

NOTA: Al volum extra-columna també se l'anomena pel terme no recomanat per la IUPAC *volum mort*.

volum total de retenció: volum de fase mòbil que entra en la columna des del moment de la injecció fins el moment de la sortida del pic cromatogràfic

zona o banda cromatogràfica: regió del llit cromatogràfic on es localitzen un o més components d'una mostra

3. SIGLES I SÍMBOLS

En aquest document són aplicables les sigles i els símbols següents recomanats per la Federació Internacional de Química Pura i Aplicada (7):

α : factor de separació (o factor de selectivitat)

β : relació de fases

γ : factor d'impediment que depèn de les característiques del rebliment d'una columna cromatogràfica

λ : constant que depèn de les dimensions, geometria i uniformitat de l'empaquetament d'una columna cromatogràfica

σ : desviació estàndard d'una corba de Laplace-Gauss característica d'un pic cromatogràfic

A : terme de l'equació de Van Deemter corresponent a la difusió d'Eddy

A_f : factor d'asimetria

B : terme de l'equació de Van Deemter corresponent a la difusió longitudinal

C : terme de l'equació de Van Deemter corresponent a la transferència de massa

$C_{i(M)}$: concentració molar d'un component i d'una mostra en la fase mòbil

$C_{i(S)}$: concentració molar d'un component i d'una mostra en la fase estacionària

C_M : terme C de l'equació de Van Deemter corresponent a la transferència de massa en la fase mòbil

C_S : terme C de l'equació de Van Deemter corresponent a la transferència de massa en la fase estacionària

D_f : espessor mitjà de recobriment d'una columna cromatogràfica

D_M : coeficient de difusió de la fase mòbil

D_S : coeficient de difusió de la fase estacionària

d_p : diàmetre mitjà de les partícules de la fase estacionària

F_c : flux de fase mòbil que travessa una columna determinada

$f(k)$: funció matemàtica que depèn del factor de retenció (k)

H : alçada del plat (teòric)

IUPAC : Federació Internacional de Química Pura i Aplicada

k : factor de retenció (o factor de capacitat)

K_c : coeficient de distribució o constant de distribució

L : longitud d'una columna cromatogràfica

N : nombre de plats (teòrics)

R_S : Resolució cromatogràfica

t_M : temps bàsic de retenció

t_R : temps total de retenció

t'_R : temps de retenció ajustat

u : velocitat lineal mitjana de la fase mòbil

V_M : volum de la fase mòbil i volum bàsic de retenció

V_R : volum total de retenció

V'_R : volum de retenció ajustat

V_S : volum de la fase estacionària

w_b : amplada d'un pic cromatogràfic

w_h : amplada d'un pic cromatogràfic a la meitat de la seva alçada

$W_{i(M)}$: nombre de mols d'un component i d'una mostra en la fase mòbil

$W_{i(S)}$: nombre de mols d'un component i d'una mostra en la fase estacionària

4. CLASSIFICACIÓ DELS PRINCIPIS CROMATOGRÀFICS

La IUPAC classifica la cromatografia en funció del procediment cromatogràfic desenvolupat, del tipus de llit cromatogràfic (fase estacionària) utilitzat, de l'estat físic de la fase mòbil i del mecanisme de separació que té lloc (7).

4.1 Classificació segons el procediment cromatogràfic desenvolupat

Atenent al procediment cromatogràfic desenvolupat, la cromatografia es classifica en cromatografia frontal, cromatografia per desplaçament o cromatografia per elució.

4.1.1 Cromatografia frontal

La cromatografia frontal és un mètode cromatogràfic en què la mostra (líquid o gas) s'introdueix de forma contínua dins del llit cromatogràfic. En la cromatografia frontal no s'utilitza cap fase mòbil addicional.

4.1.2 Cromatografia per desplaçament

La cromatografia per desplaçament és un mètode cromatogràfic en què la fase mòbil conté un component (el desplaçant), que està més fortament retintut que els components de la mostra a estudiar. La mostra s'introdueix en el sistema cromatogràfic en una quantitat determinada.

4.1.3 Cromatografia per elució

La cromatografia per elució és un mètode cromatogràfic en què la fase mòbil passa contínuament a través o al llarg d'un llit cromatogràfic, i la mostra s'introdueix en el sistema en una quantitat determinada.

4.2 Classificació segons el procediment cromatogràfic desenvolupat

Atenent al tipus de fase estacionària emprada, la cromatografia es classifica en cromatografia en columna o en cromatografia plana.

4.2.1 Cromatografia en columna

La cromatografia en columna és un mètode cromatogràfic en què el llit cromatogràfic està dins d'un tub. Les partícules de la fase estacionària sòlida, o del suport recobert amb la fase estacionària líquida, poden omplir el volum intern del tub (columna farcida), o concentrar-se sobre o al llarg de la paret interna del tub, deixant un camí obert sense restricció, a la part mitjana, pel qual circula la fase mòbil (columna oberta) (Figura 1).

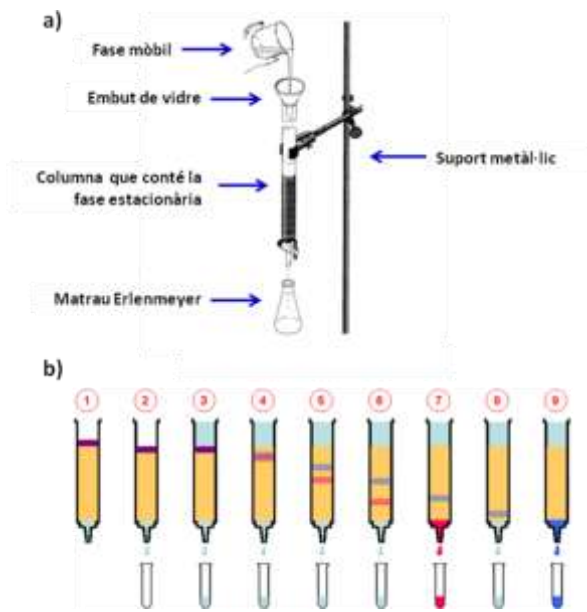


Figura 1. a) Esquema instrumental de la cromatografia en columna. b) Mecanisme de funcionament de la cromatografia en columna: 1. La mostra es diposita sobre el llit cromatogràfic (fase estacionària), 2. La mostra penetra en el llit cromatogràfic, 3. S'afegeix la fase mòbil, 4-6. Els components de la mostra descendeixen amb la fase mòbil i són separats en funció de la seva interacció amb la fase estacionària, 7-9. S'elueixen els diferents components de la mostra.

4.2.2 Cromatografia plana

La cromatografia plana és un mètode cromatogràfic en què la fase estacionària és un pla o està sobre un pla. Aquest pla pot ser un paper utilitzat com a tal, o impregnat amb una substància a mode de llit estacionari (cromatografia en paper), o bé una capa de partícules sòlides que recobreixen un suport, com per exemple una placa de vidre (cromatografia en capa fina). Sovint, la cromatografia en pla s'anomena també cromatografia de llit obert (Figura 2).

4.3 Classificació segons l'estat físic de la fase mòbil

El mètodes cromatogràfics es classifiquen, sovint, indicant l'estat físic de les dues fases utilitzades.

Segons aquesta classificació, s'utilitzen les següents expressions:

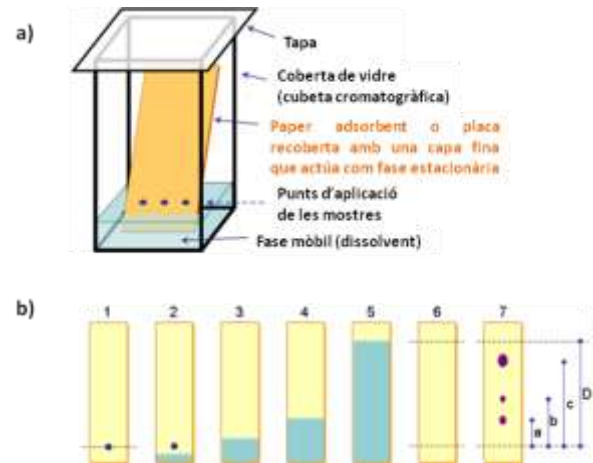


Figura 2. a) Esquema instrumental de la cromatografia plana. b) Mecanisme de funcionament de la cromatografia plana: 1. Aplicació de la mostra, 2. Se submergeix l'extrem inferior del pla (paper o placa) en la fase mòbil, 3-5. Els components de la mostra ascendeixen amb la fase mòbil (dissolvent) i són separats en funció de la seva interacció amb la fase estacionària, 6. S'identifica el front d'elució del dissolvent i es deixa assecat el paper o placa, 7. Es revela els components de la mostra ja separats i es mesura la distància recorreguda de cada un d'ells.

- *Cromatografia gas-líquid.* La fase mòbil és un gas i la fase estacionària és un líquid no volàtil ancorat en un suport sòlid.
- *Cromatografia gas-sòlid.* La fase mòbil és un gas i la fase estacionària és un sòlid.
- *Cromatografia líquid-líquid.* La fase mòbil és un líquid i la fase estacionària és un líquid ancorat sobre un sòlid.
- *Cromatografia líquid-sòlid.* La fase mòbil és un líquid i la fase estacionària és un sòlid.

Tot i això, el més comunament emprat és la classificació de la cromatografia atenent només a l'estat físic en què es troba la fase mòbil. Així, la cromatografia es classifica en cromatografia de gasos, cromatografia de líquids o líquida i cromatografia de fluids supercrítics.

4.3.1 Cromatografia de gasos

La cromatografia de gasos és un mètode cromatogràfic en què la fase mòbil és un gas. Aquest tipus de cromatografia es duu a terme sempre en columna.

4.3.2 Cromatografia de líquids

La cromatografia de líquids o cromatografia líquida és un mètode cromatogràfic en què la fase mòbil és un líquid. Aquest tipus de cromatografia es pot dur a terme en columna o en pla.

4.3.3 Cromatografia de fluids supercrítics

La cromatografia de fluids supercrítics és un mètode cromatogràfic en què la fase mòbil és un fluid lleugerament per damunt de la seva temperatura i pressió crítiques.

4.4 Classificació segons el mecanisme de separació

Atenent al tipus d'interacció que s'estableix entre els diferents components d'una mostra i les fases mòbils i estacionàries, la cromatografia es classifica en cromatografia d'adsorció, de repartiment, de bescanvi iònic, d'exclusió i d'afinitat.

4.4.1 Cromatografia d'adsorció

La cromatografia d'adsorció és un mètode cromatogràfic en què la separació dels components d'una mostra es basa fonamentalment en les diferents afinitats d'adsorció dels mateixos cap a la superfície d'un sòlid actiu (Figura 3). La fase estacionària és un sòlid polar que és capaç d'adsorbir els components de la mostra mitjançant interaccions de tipus polar.

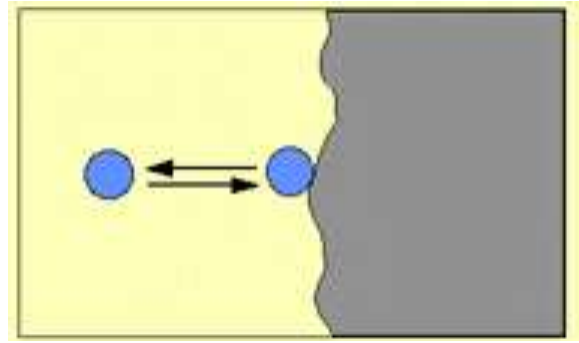


Figura 3. Esquema de la cromatografia d'adsorció. La separació cromatogràfica es duu a terme mitjançant una sèrie de processos d'adsorció/desorció dels components d'una mostra sobre la superfície d'un sòlid.

4.4.2 Cromatografia de repartiment

La cromatografia de repartiment és un mètode cromatogràfic en què la separació dels diferents components d'una mostra es basa fonamentalment en les diferències de solubilitat del mateixos en la fase estacionària (com per exemple, en la cromatografia de gasos) o en les diferències de solubilitat entre la fase mòbil i la fase estacionària (com per exemple, en la cromatografia de líquids) (Figura 4).

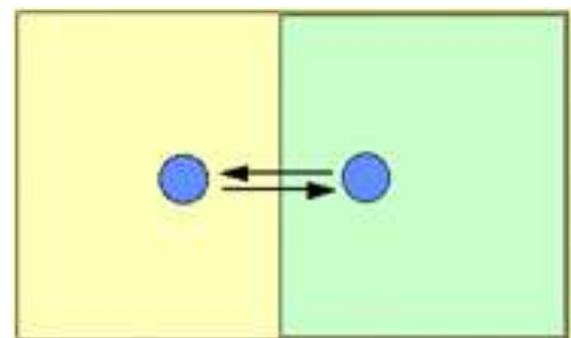


Figura 4. Esquema de la cromatografia de repartiment. La separació cromatogràfica es duu a terme mitjançant un repartiment dels components d'una mostra entre dos líquids o entre un gas i un líquid.

4.4.3 Cromatografia de bescanvi iònic

La cromatografia de bescanvi iònic és un mètode cromatogràfic en què la separació dels components d'una mostra es basa fonamentalment en la seva diferent susceptibilitat per a l'intercanvi d'ions (Figura 5). La fase estacionària és un sòlid que

presenta grups funcionals ionitzables que s'intercanvien pels ions presents en la fase mòbil.

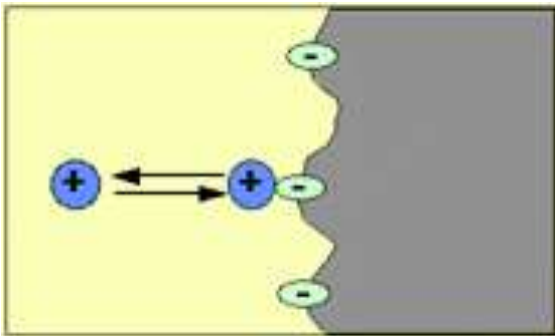


Figura 5. Esquema de la cromatografia de bescanvi iònic. La separació cromatogràfica es duu a terme mitjançant un intercanvi dels components iònics d'una mostra sobre la superfície d'un sòlid ionitzat.

4.4.4 Cromatografia d'exclusió

La cromatografia d'exclusió (molecular) és un mètode cromatogràfic en què la separació dels components d'una mostra es basa fonamentalment en un efecte d'exclusió, com ara les diferències en la mida o forma de les molècules (Figura 6). Els termes *cromatografia de filtració sobre gel* o *cromatografia de permeabilitat sobre gel*, s'han utilitzat amb anterioritat per descriure aquest procés quan la fase estacionària és un gel inflat.

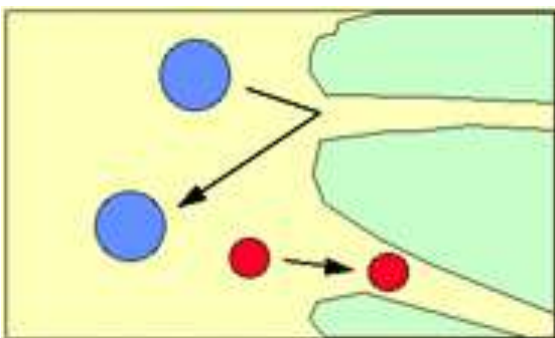


Figura 6. Esquema de la cromatografia d'exclusió molecular. La separació cromatogràfica es duu a terme mitjançant la diferència de mida o forma dels components d'una mostra sobre la superfície d'un sòlid porós.

4.4.5 Cromatografia d'afinitat

La cromatografia d'afinitat és un mètode cromatogràfic en què la separació dels components d'una mostra es basa fonamentalment en la seva

interacció biològica específica amb la fase estacionària (Figura 7). Aquestes interaccions poden ser del tipus antigen-anticòs, enzim-substrat, metall-agent quelant o lligand-receptor.

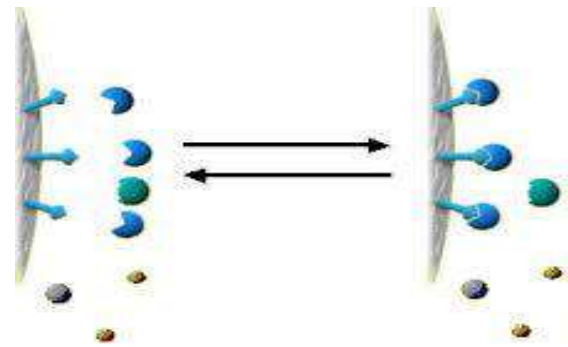


Figura 7. Esquema de la cromatografia d'afinitat. La separació cromatogràfica es duu a terme mitjançant una interacció biològica específica entre els components de la mostra i la superfície d'un sòlid.

5. FONAMENTS TEÒRICS DE LA CROMATOGRÀFIA

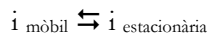
Donat que el tipus de cromatografia que presenta un major nombre d'aplicacions dins de l'àmbit de les ciències de laboratori clínic és la cromatografia en columna, els diferents paràmetres i conceptes bàsics als quals es fan referència a continuació estan dirigits, principalment, a aquest tipus de cromatografia.

En un procés cromatogràfic es poden distingir els processos termodinàmics, relacionats amb la capacitat de retenció o la diferent migració dels components d'una mostra, i els processos cinètics, relacionats amb l'amplada de pic cromatogràfic produït com a conseqüència de la diferent velocitat a la que es mouen els components d'una mostra (1-6).

5.1 Paràmetres de distribució

Els components d'una mostra a separar, en el seu desplaçament al llarg del sistema cromatogràfic, es mouen a diferents velocitats depenent de l'afinitat de cada un per la fase estacionària, respecte a la fase

mòbil. Cadascun d'ells es distribueix entre les dues fases segons un equilibri. Pel component i :



Aquest equilibri està caracteritzat per una constant anomenada *coeficient de distribució* o *constant de distribució* (K_c):

$$K_c = \frac{W_{i(S)} / V_S}{W_{i(M)} / V_M} = \frac{C_{i(S)}}{C_{i(M)}} \quad [1]$$

on $W_{i(S)}$ i $W_{i(M)}$ són el nombre de mols del component i en les fases estacionària i mòbil, mentre que V_S i V_M són els volums de la fase estacionària i mòbil, respectivament. Idealment, K_c és constant en un ampli interval de concentracions del component i per tant, la seva concentració molar en la fase estacionària ($C_{i(S)}$) és directament proporcional a la seva concentració molar en la fase mòbil ($C_{i(M)}$). Quan es dona aquesta situació, que és el més habitual, s'obtenen pics cromatogràfics gaussians i temps de retenció que són independents de la quantitat del component d'una mostra que és injectada.

5.2 Paràmetres de retenció

En la Figura 8 es pot observar un cromatograma característic d'una mostra que conté un únic component (pic cromatogràfic gran). El pic cromatogràfic petit, correspon a un component que no és retingut en la columna cromatogràfica i que sovint es troba en la mostra.

El temps total de retenció (t_R) presenta dos components: un d'ells és el temps bàsic de retenció o temps mort (t_M), el qual és el mateix per a tots els components en un sistema cromatogràfic determinat, i l'altre és el temps de retenció ajustat (t'_R), que és el temps que realment s'inverteix en la retenció d'un

component d'una mostra per la fase estacionària i per tant és específic de cada component a separar (Figura 8):

$$t_R = t'_R + t_M \quad [2]$$

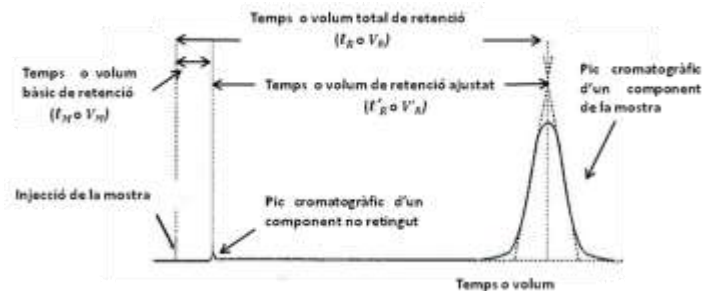


Figura 8. Cromatograma característic d'una mostra que conté un únic component on es poden observar els diferents paràmetres de retenció.

Les característiques de retenció dels components d'una mostra, en la pràctica, se solen descriure mitjançant un factor anomenat *factor de retenció* (anomenat també pel terme no recomanat per la IUPAC *factor de capacitat*), k , definit per la relació entre el nombre de mols del component i d'una mostra en la fase estacionària ($W_{i(S)}$) i la fase mòbil ($W_{i(M)}$):

$$k = \frac{W_{i(S)}}{W_{i(M)}} \quad [3]$$

i relacionat amb el *coeficient de distribució*, K_c (equació [1]) i els volums de les fases mòbil i estacionària per:

$$K_c = \frac{W_{i(S)} / V_S}{W_{i(M)} / V_M} = \frac{W_{i(S)}}{W_{i(M)}} \cdot \frac{V_M}{V_S} = k \cdot \frac{V_M}{V_S} = k \cdot \beta \quad [4]$$

on V_M és el volum de fase mòbil, V_S és el volum de fase estacionària. La relació V_M/V_S s'anomena *relació de fases*, β , i és un dels paràmetres que s'empren per caracteritzar una columna cromatogràfica.

L'equació [3] representa la relació entre la probabilitat que el component d'una mostra romangui en la fase estacionària i en la fase mòbil. Aquesta relació de probabilitats és també igual a la relació entre el temps que, en mitjana, el component

d'una mostra roman en la fase estacionària i en la fase mòbil:

$$k = \frac{\text{temps de permanència del component i en la fase estacionària}}{\text{temps de permanència del component i en la fase mòbil}} \quad [5]$$

Donada aquesta situació i sabent que la mesura directa de $W_{i(S)}$ i $W_{i(M)}$ sol ser difícil, el càlcul del factor de retenció generalment es porta a terme a partir dels temps de retenció, els quals són propietats fàcilment mesurables en un cromatograma:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad [6]$$

Donat que el volum de retenció és proporcional al temps de retenció ($V_R = t_R \cdot F_c$, sent F_c el flux de fase mòbil que travessa la columna), qualsevol relació que s'expressi com un quocient de temps pot expressar-se també com el quocient de volums corresponent:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} \quad [7]$$

sent, V_R , el volum total de retenció; V_M , el volum bàsic de retenció o volum mort i V'_R , el volum de retenció ajustat.

Per altra banda, el volum total de retenció és una propietat d'utilitat en moltes ocasions. De l'equació [7] es dedueix que,

$$V_R = V_M \cdot (1 + k) \quad [8]$$

Aïllant k de l'equació [4] i substituint-la a l'equació [8] es relaciona el volum total de retenció amb el coeficient de distribució (K):

$$V_R = V_M \cdot (1 + K_c \cdot V_S / V_M) = V_M + K_c \cdot V_S \quad [9]$$

El factor de retenció és un paràmetre important perquè és independent del flux de la fase mòbil i de les dimensions de la columna, i es pot utilitzar per comparar retencions de distints components d'una mostra que s'han obtingut en sistemes

cromatogràfics diferents. Quan el factor de retenció del component d'una mostra és molt menor que la unitat, l'elució cromatogràfica té lloc tan ràpidament que és difícil determinar amb exactitud el temps de retenció. Pel contrari, quan el factor de retenció és superior o igual a 20 ens indica que el temps d'elució és excessivament llarg. Els factors de retenció grans afavoreixen una bona separació, però també incrementen el temps d'elució i l'amplada del pic cromatogràfic. Idealment, les separacions cromatogràfiques es realitzen en unes condicions en la que els factors de retenció dels components d'una mostra oscil·len entre 2 i 10 (1-6).

5.3 Paràmetres de separació

La capacitat d'una determinada fase estacionària per separar dos components d'una mostra 1 i 2 s'expressa mitjançant el *factor de separació* (anomenat també pel terme no recomanat per la IUPAC, *factor de selectivitat*), α , definit com:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad [10]$$

on k_1 i k_2 són els factors de retenció dels components 1 i 2, respectivament.

El factor de separació es pot calcular en un cromatograma com el valor de la retenció relativa entre dos pics cromatogràfics pròxims. Substituint l'equació [7] per a cada component en l'equació [10]:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t_{R1}} = \frac{V_{R2} - V_M}{V_{R1} - V_M} = \frac{V'_{R2}}{V_{R1}} \quad [11]$$

Normalment, es pot controlar la separació variant les característiques del sistema, com ara la composició de la fase mòbil (pH, força iònica, solvent orgànic modificador), la forma d'elució (isocràtica o en gradient) o el tipus de columna cromatogràfica.

5.4 Paràmetres d'eficàcia

Els pics cromatogràfics mostren una gran semblança amb les corbes que segueixen la llei de Laplace-Gauss o gaussianes, fet que pot explicar-se de la manera següent: durant el desplaçament d'un component d'una mostra per l'interior d'una columna cromatogràfica, aquest experimenta milers de transferències entre les fases mòbil i estacionària. El temps de retenció en una fase donada és molt irregular, podent ser molt petit en algunes etapes, i relativament gran en altres degut a que algunes partícules es desplaçaran ràpidament, a causa que romanen més temps en la fase mòbil, mentre que altres ho faran amb més lentitud, com a conseqüència de la seva major permanència a la fase estacionària. Degut a que els processos individuals esmentats transcorren de forma aleatòria, s'obté una dispersió dels temps de retenció en la columna al voltant d'un valor mitjà, originant un pic gaussià com el representat a la Figura 9, i en què gairebé un 96 % de l'àrea sota la corba es troba dins de l'interval comprès entre \pm dues vegades la desviació estàndard sobre el valor del màxim de la corba.

D'altra banda, l'amplada d'un pic cromatogràfic està directament relacionada amb el temps de retenció en la columna, ja que a major temps, major dispersió, de manera que els components d'una mostra que elueixen més tard presenten pics més amples que els que elueixen en primer lloc. Així, l'eixamplament dels pics dels diferents components d'una mostra actua en detriment de la seva separació.

El terme *eficàcia*, d'un sistema cromatogràfic, s'utilitza per descriure l'eixamplament de les bandes dels components d'una mostra com a conseqüència del seu moviment a través de la columna. L'eficàcia d'un sistema cromatogràfic es pot abordar des de dos

punts de vista: la *teoria del plat (teòric)* i la *teoria de la velocitat o cinètica*.

5.4.1 Teoria del plat

La teoria del plat (teòric), desenvolupada per Archer Martin i Richard Synge al 1952, considera que la columna cromatogràfica està constituïda per nombroses, però discretes capes estretes, denominades plats teòrics, en termes anàlegs al que passa en la teoria de la destil·lació fraccionada o de l'extracció en contracorrent. Es considera que en cada plat s'estableix un equilibri del component d'una mostra entre la fase mòbil i la fase estacionària, i que el seu desplaçament a través de la columna es tracta com una transferència de la fase mòbil des d'un plat al següent.

Existeixen dos paràmetres que descriuen l'eficàcia d'un sistema cromatogràfic, el nombre de plats teòrics, N , i l'alçada del plat teòric, H , els quals estan relacionats entre sí mitjançant l'equació:

$$N = \frac{L}{H} \quad [12]$$

on (L) és la longitud de la columna.

L'eficàcia de la columna augmenta en fer-ho el nombre de transferències del component d'una mostra entre la fase mòbil i la fase estacionària, és a dir, en augmentar el nombre de plats teòrics i en disminuir l'alçada entre aquests plats teòrics.

Per altra banda, el nombre de plats teòrics, N , es relaciona amb el temps o volum total de retenció (t_R o V_R) i amb la desviació estàndard d'una corba de Laplace-Gauss característica d'un pic cromatogràfic (σ), mitjançant la següent equació:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{V_R}{\sigma}\right)^2 \quad [13]$$

Donat que existeix una relació entre σ i l'amplada del pic cromatogràfic (w_b) ($w_b = 4 \cdot \sigma$; vegeu Figura 9):

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{V_R}{w_b}\right)^2 \quad [14]$$

Una altra manera de calcular el nombre de plats teòrics, que alguns autors consideren més fiable, es basa en mesurar l'amplada del pic cromatogràfic a la meitat de la seva alçada (w_h) (Figura 9):

$$N = \left(\frac{t_R}{w_h/2,35}\right)^2 = \left(\frac{V_R}{w_h/2,35}\right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{V_R}{w_h}\right)^2 \quad [15]$$

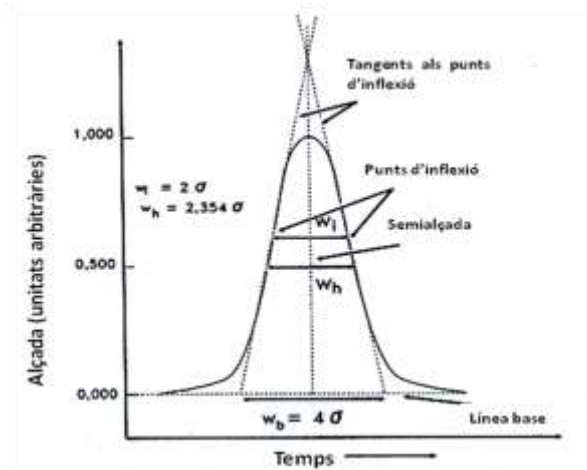


Figura 9. Pic gaussià ideal degut al comportament aleatori de les molècules del component d'una mostra entre les fases estacionària i mòbil. w_b = amplada del pic cromatogràfic; w_1 = amplada del pic cromatogràfic en el punt d'inflexió de la corba; w_h = amplada del pic cromatogràfic a la meitat de la seva alçada i σ és la desviació estàndard de la corba.

La teoria del plat (teòric) explica satisfactòriament la forma gaussiana dels pics cromatogràfics i la velocitat de desplaçament d'un component d'una mostra, si bé però, falla en intentar justificar l'eixamplament dels mateixos. D'altra banda, es basa en unes suposades condicions d'equilibri que, en realitat no s'assoleixen, a causa del moviment continu de la fase mòbil. Aquests inconvenients van fer que es descartés la teoria del plat per l'anomenada teoria de la velocitat o cinètica.

5.4.2 Teoria de la velocitat o cinètica

La teoria de la velocitat, desenvolupada per JJ. Van Deemter el 1956 i millorada per Calvin Giddings el

1965, tot i emprar els mateixos paràmetres d'eficàcia que la teoria del plat, permet explicar l'eixamplament dels pics cromatogràfics. Aquesta teoria considera que l'eixamplament dels pics es produeix com a conseqüència que els diferents processos de transferència de massa entre les fases mòbil i estacionària, que es duen a terme durant el desplaçament d'un component d'una mostra al llarg de la columna, ocorren a una velocitat finita. Segons aquesta teoria, la forma dels pics depèn dels següents factors:

- la difusió per turbulència o en remolí (difusió d'Eddy) i les diferents trajectòries que poden seguir les molècules d'un component d'una mostra a través de la columna,
- la difusió longitudinal de les molècules d'un component d'una mostra al llarg de la columna, i
- el lent equilibri entre les fases mòbil i estacionària al que es veu sotmès un component d'una mostra.

Els tres factors esmentats normalment s'identifiquen amb els paràmetres A, B i C i la seva contribució a l'eixamplament de les bandes cromatogràfiques condueix a l'anomenada equació de Van Deemter:

$$H = A + B/u + C \cdot u \quad [16]$$

on u és la velocitat lineal mitjana de la fase mòbil ($u = L/t_M$; L = longitud de la columna, t_M = temps bàsic de retenció).

Aquest model és el clàssic i, a dia d'avui, es considera obsolet perquè s'han millorat les diferents aproximacions per a cada un dels paràmetres A, B i C. Tot i això, els fonaments bàsics de l'equació de Van Deemter encara són utilitzats actualment.

D'altra banda, la teoria es va desenvolupar inicialment per a la cromatografia de gasos amb columnes empaquetades, però pot estendre's sense massa dificultats a altres tipus de cromatografia, incloent les columnes tubulars obertes i, fins i tot, a la cromatografia plana.

5.4.2.1 Terme A de l'equació de Van Deemter: difusió per turbulència o difusió d'Eddy; terme del camí múltiple

En una columna cromatogràfica, donat que està empacada amb partícules de diferents mides i formes acomodades de manera irregular, les molècules d'un component d'una mostra que es troben en la fase mòbil en travessar-la poden prendre multitud de trajectòries aleatòries, fent que la distància que recorrin sigui major o menor en funció de la trajectòria escollida. Aquest fenomen, que es coneix amb el nom de difusió en remolí o d'Eddy, influeix en l'eixamplament dels pics cromatogràfics (Figura 10).

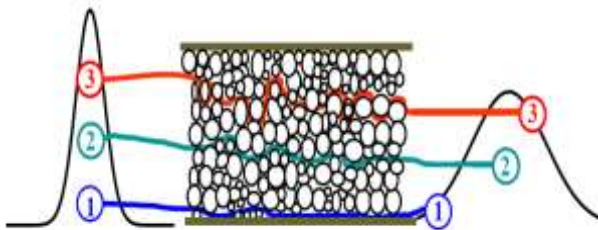


Figura 10. Trajectòries seguides per les molècules d'un mateix component d'una mostra durant la seva elució en una columna cromatogràfica. La distància recorreguda per les molècules serà diferent degut als diferents camins que poden seguir, fent que el pic cromatogràfic s'eixampli.

El terme A de l'equació de Van Deemter és independent de la velocitat de la fase mòbil, però depèn directament de la mida de les partícules de la fase estacionària, de manera que el terme A es pot expressar com:

$$A = \lambda \cdot d_p \quad [17]$$

on λ és una constant que depèn de les dimensions, geometria i uniformitat de l'empaquetament de la

columna, i d_p és el diàmetre mitjà de les partícules de la fase estacionària.

A partir de l'equació [17] es pot deduir que columnes cromatogràfiques amb partícules més petites i uniformement empaquetades presentaran una major eficàcia, si bé, això implicarà utilitzar sistemes cromatogràfics que treballin a pressions molt més elevades. D'altra banda, el terme A es pot considerar negligible en el cas que s'utilitzin columnes tubulars obertes, a causa que la fase estacionària en aquestes columnes es diposita directament sobre la paret de la columna.

5.4.2.2 Terme B de l'equació de Van Deemter: difusió longitudinal

El segon factor que pot contribuir en l'eixamplament d'un pic cromatogràfic és la difusió longitudinal de les molècules d'un component d'una mostra en la fase estacionària. Aquest fenomen es produeix com a conseqüència que aquestes molècules difonen des de la part central de la zona o banda cromatogràfica, on la seva concentració és major, cap a les regions més diluïdes que s'ubiquen per davant i per darrera de la banda. Algunes molècules es quedaran endarrerides, i eluiran més tard, mentre que unes altres aniran més ràpides que la majoria d'elles i, per tant, eluiran abans. Si la velocitat de la fase mòbil és alta, llavors les molècules del component passaran menys temps en la columna, disminuint l'efecte de la difusió longitudinal (Figura 11).

La difusió longitudinal es dificulta per les partícules de la fase estacionària i pel coeficient de difusió en la fase mòbil, D_M , de manera que el terme B es pot expressar com:

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_M \quad [18]$$

on γ és un factor d'impediment que depèn de les característiques del rebliment de la columna (γ sol

ser 0,7 per columnes empaquetades i 1,0 per columnes tubulars obertes).

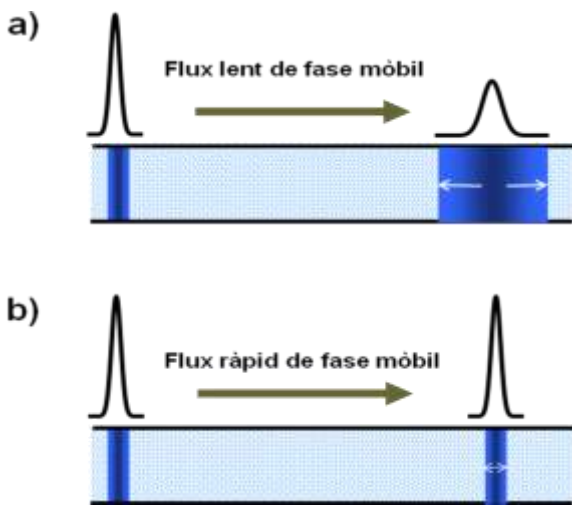


Figura 11. Representació esquemàtica del fenomen de difusió longitudinal que sofreixen les molècules d'un component d'una mostra durant la seva elució en una columna cromatogràfica, utilitzant: a) un flux lent de fase mòbil i b) un flux elevat de fase mòbil.

La contribució del terme B al valor del plat teòric, H , sol ser menyspreable en cromatografia líquida, pels valors baixos dels coeficients de difusió dels líquids.

5.4.2.3 Terme C de l'equació de Van Deemter: resistència a la transferència de massa

El terme C està relacionat amb el fet que l'equilibri per a la distribució d'un component d'una mostra entre les fases mòbil i estacionària s'estableix tan lentament que una columna cromatogràfica sempre opera en condicions lluny de l'equilibri. És dir, les diferents molècules d'un component d'una mostra requereixen un cert temps per aconseguir l'equilibri entre la fase estacionària i la fase mòbil. Si la velocitat de la fase mòbil és alta, i les molècules tenen una gran afinitat per la fase estacionària, llavors les molècules que es troben a la fase mòbil es mouran més ràpidament que les molècules retingudes en la fase estacionària (Figura 12). Aquest fenomen donarà lloc a un eixamplament del pic cromatogràfic. Quant major sigui la velocitat de la fase mòbil, major serà l'eixamplament produït.

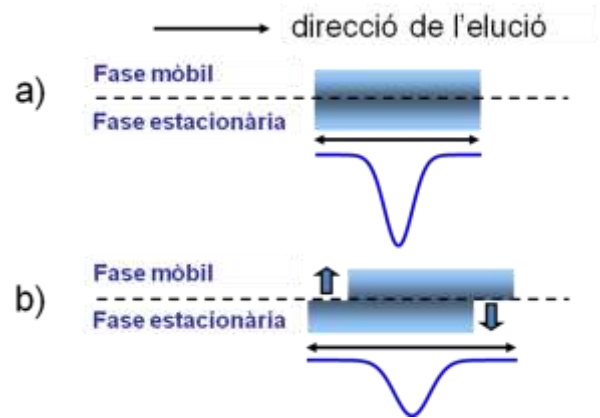


Figura 12. Representació esquemàtica del fenomen de transferència de massa: a) en condicions d'equilibri i b) en condicions de NO equilibri.

En realitat, el terme C pot descompondre en dos, C_S i C_M , segons es consideri la transferència de massa en la fase estacionària o en la fase mòbil, respectivament. Les equacions relacionades són:

$$C_S = \frac{f(k) \cdot d_f^2}{D_S} \quad [19] \quad C_M = \frac{f(k) \cdot d_p^2}{D_M} \quad [20]$$

on $f(k)$ és una funció matemàtica que depèn del factor de retenció, k , i del tipus de cromatografia utilitzada, d_f és l'espessor mitjà de recobriment de la columna, d_p és el diàmetre mitjà de la partícula de la columna, D_S és el coeficient de difusió de la fase estacionària i D_M és el coeficient de difusió de la fase mòbil.

La resistència a la transferència de massa en la fase estacionària és menyspreable per a les fases sòlides, ja que la transferència del component d'una mostra sobre la superfície d'un adsorbent és molt ràpida.

A la Figura 13 es representa la variació dels tres termes de l'equació de Van Deemter en funció de l'alçada del plat (H) i de la velocitat de la fase mòbil (u). Cal destacar que la contribució del terme A és independent de la velocitat, mentre que B augmenta quan la velocitat disminueix i C, predomina a velocitats elevades. Les corbes de l'equació de Van

Deemter són similars tan per la cromatografia de gasos com per la cromatografia líquida, presentant, en tots els casos un valor mínim d' H per a una determinada velocitat de la fase mòbil (condició òptima). Es produeix un increment en l'alçada de plat (H) i, en conseqüència un eixamplament del pic cromatogràfic, a velocitats inferiors a l'òptima degut a la difusió longitudinal (terme B) i a velocitats inferiors a l'òptima degut a la resistència de la transferència de massa entre les fases mòbil i estacionària (terme C).

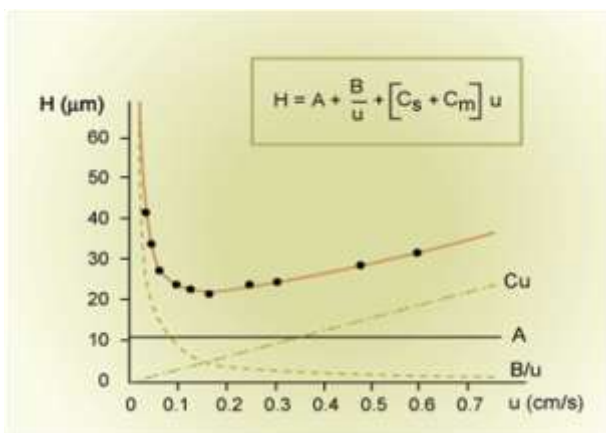


Figura 13. Gràfic de Van Deemter per a una columna cromatogràfica on la fase estacionària està composta per un líquid sobre un suport sòlid. En color marró, part superior del gràfic, es pot observar la corba resultant com a conseqüència de les distintes contribucions dels termes A, B i C sobre la velocitat de la fase mòbil. A la part inferior, es mostren les corbes corresponents a la difusió d'Eddy (terme A), a la difusió longitudinal (terme B) i a la transferència de massa (terme C).

Tenint en compte les equacions [17], [18], [19] i [20] i substituint-les a la [16], l'equació de Van Deemter es pot expressar com:

$$H = \lambda \cdot d_p + \frac{2 \cdot \gamma \cdot D_M}{u} + \left(\frac{f(k) \cdot d_f^2}{D_S} + \frac{f(k) \cdot d_p^2}{D_M} \right) \cdot u \quad [21]$$

5.4.3 Altres factors que influeixen en l'eficàcia

A més dels factors ja considerats que contribueixen a l'eixamplament dels pics cromatogràfics i que es produeixen en la pròpia columna cromatogràfica, cal esmentar alguns que poden tenir lloc en altres zones del sistema cromatogràfic. Entre ells, es poden

destacar els relacionats amb la introducció de les mostres i els relacionats amb els volums extra-columna.

En el cas de la introducció de la mostra, una injecció excessiva pot provocar una sobrecàrrega de la columna cromatogràfica i en conseqüència una disminució de la seva eficàcia però, també, que part de la mostra quedi adherida a les parets de la vàlvula d'injecció provocant la seva lenta però contínua eliminació. Tenint en compte aquestes situacions, sempre que sigui possible, s'han de fer servir volums de mostra petits en particular si es vol treballar amb columnes amb una elevada eficàcia (amb un nombre de plats teòrics elevat o amb una alçada de plat reduïda).

Per altra banda, el volum extra-columna (anomenat també pel terme no recomanat per la IUPAC *volum mort*) pot contribuir a l'aparició de fenòmens de difusió i, en conseqüència, a l'eixamplament dels pics cromatogràfics. Per aquest motiu, és necessari que s'emprin tubs estrets per a les connexions entre el sistema d'injecció i la columna, i entre aquesta i el detector.

5.5 Paràmetres de simetria

L'obtenció de pics cromatogràfics simètrics (gaussians) s'originen quan el coeficient de distribució, K_S , (equació [1]), és constant i independent de la quantitat del component d'una mostra. En realitat, gairebé sempre s'obtenen pics asimètrics, ja que la relació de les concentracions molars del component entre les fases estacionària i mòbil sol variar amb la quantitat de component que és injectat. Així, en la pràctica, els pics cromatogràfics rarament són gaussians, i la realització de càlculs sobre el cromatograma en base a aquesta suposició, pot portar a errors significatius si

es treballa amb pics molt distorsionats. El model de la corba de Gauss només és apropiat quan es treballa amb pics on l'anomenat factor d'asimetria (A_f) és proper a la unitat (Figura 14).

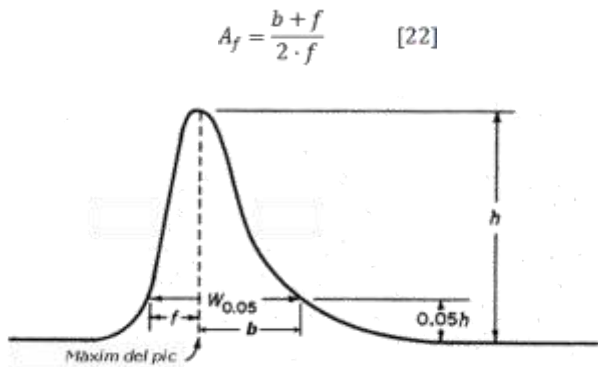


Figura 14. Paràmetres de simetria d'un pic cromatogràfic.

A la Figura 15, es mostren els diferents pics cromatogràfics que es poden obtenir en un cromatograma (pics gaussians (simètrics), pics amb cua i pics amb distorsió frontal).

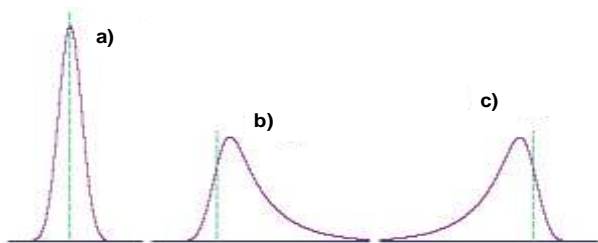


Figura 15. Tipus de pics cromatogràfics: a) simètric o gaussià, b) asimètric amb cua i c) asimètric amb distorsió frontal.

Per als pics gaussians, el factor d'asimetria és igual a 1, si els pics presenten cua, se'ls hi assigna un factor d'asimetria positiu, i quan els pics presenten distorsió frontal, se'ls hi assigna un valor negatiu. Els pics amb cua (Figura 15b) solen presentar-se quan existeixen buits d'aire entre les connexions de la columna o en algun dels components d'un cromatògraf, quan el pH de la fase mòbil no és l'adequada, quan la separació entre dos components d'una mostra no està ben resolta o quan la mostra reacciona químicament amb els centres actius de la columna. Per altra banda, els pics amb una distorsió frontal

(Figura 15c) solen aparèixer per aquells sistemes cromatogràfics on la fase estacionària reté fortament el component d'una mostra degut a una saturació dels centres actius de la columna, a una baixa temperatura de treball de la columna o a una columna cromatogràfica en mal estat.

5.6 Paràmetres de resolució

La resolució (R_s) és el paràmetre que indica la qualitat d'una separació d'una columna cromatogràfica (Figura 16), com una mesura numèrica de la separació entre dos components d'una mateixa mostra, i es defineix com:

$$R_s = \frac{\Delta z}{w_{bA}/2 + w_{bB}/2} = \frac{2 \cdot \Delta z}{w_{bA} + w_{bB}} = \frac{2 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_{bA} + w_{bB}} = \frac{2 \cdot [(V_R)_B - (V_R)_A]}{w_{bA} + w_{bB}} \quad [23]$$

on $(t_R)_A$, $(t_R)_B$, $(V_R)_A$, $(V_R)_B$, són els temps i els volums totals de retenció dels components A i B d'una mostra, w_{bA} i w_{bB} són les amplades dels pics cromatogràfics A i B, respectivament.

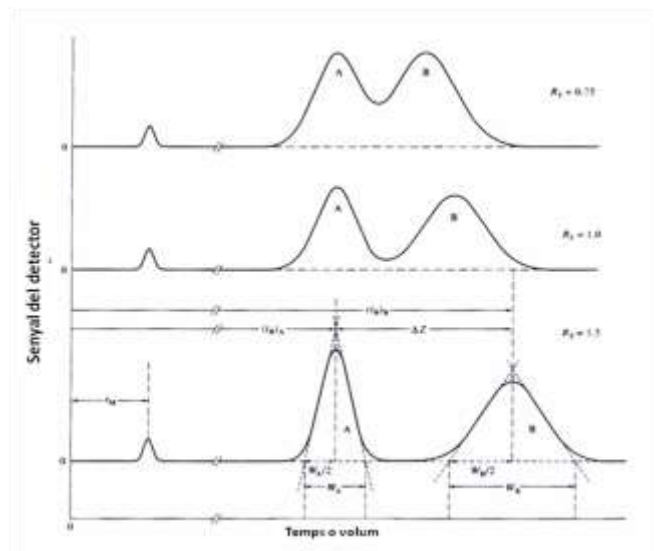


Figura 16. Separacions cromatogràfiques que corresponen a tres resolucions (R_s) distintes (0,75, 1,0 i 1,5). Paràmetres relacionats amb la resolució dels pics cromatogràfics, per a dos pics cromatogràfics: w_A = amplada del pic cromatogràfic A; w_B = amplada del pic cromatogràfic B; $(t_R)_A$ = temps total de retenció del component A; $(t_R)_B$ = temps total de retenció del component B i t_m = temps bàsic de retenció.

L'equació [23] resulta adequada per obtenir el valor de la resolució, però no proporciona informació sobre les propietats cinètiques o termodinàmiques de

la columna cromatogràfica, la qual cosa és important de cara a optimitzar la resolució. Per això, una equació alternativa per a la mateixa és:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k}{k-1}\right) \quad [24]$$

on N és el nombre de plats teòrics de la columna, α és el factor de separació entre dos components A i B i k és el valor mitjà dels factors de retenció dels dos components. Aquesta expressió matemàtica ens indica que la resolució depèn de l'eficàcia global de la columna (N), de la capacitat de la fase estacionària per retenir els components (α) i de les característiques de retenció de cada component (k). D'aquesta mateixa equació també es pot deduir que, en dependre la resolució de l'arrel quadrada de N , per augmentar significativament el valor de la resolució és necessari augmentar molt el valor de N . Això pot fer-se incrementant la longitud de la columna amb l'inconvenient que precisa de temps d'optimització excessius. Per això, normalment sol ser preferible optimitzar els valors d' α i k . Una forma relativament senzilla de millorar la resolució és optimitzant k , per exemple, augmentant la temperatura (principalment en la cromatografia de gasos) o canviant la composició de la fase mòbil (en la cromatografia líquida). En quant al valor d' α , aquest es pot modificar variant la composició de la fase mòbil, la composició de la fase estacionària (canviant la columna cromatogràfica), modificant la temperatura de la columna o bé, recorrent a factors químics especials com poden ser la incorporació d'algun agent complexant particular a la fase estacionària.

6. APLICACIÓ DE LA CROMATOGRAFIA EN LES CIÈNCIES DE LABORATORI CLÍNIC

Tot i que la cromatografia és el principi de mesura més important per a la separació de diferents components d'una mostra, també és possible la seva utilització en l'anàlisi qualitativa i, sobretot, en l'anàlisi quantitativa (1-6).

6.1 Anàlisi qualitativa

En l'anàlisi qualitativa, les seves aplicacions són bastant limitades, sobretot quan es compara la informació que proporciona un cromatograma amb la que es pot obtenir amb altres principis de mesura com l'espectroscòpia infraroja, l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear o l'espectrometria de masses. Tot i això, la cromatografia és un principi de mesura important per reconèixer la presència o absència de components en una mostra que contingui un nombre limitat de possibles substàncies de les que es conegui la seva identitat. D'altra banda, en ocasions interessa conèixer si un determinat component està absent en una mostra. En aquests casos, moltes vegades la cromatografia proporciona una evidència segura en aquest sentit, al no aparèixer un pic cromatogràfic per aquest component.

6.2 Anàlisi quantitativa

Les aplicacions quantitatives de la cromatografia en columna es basen en la comparació de l'alçada o de l'àrea del pic cromatogràfic del component d'una mostra amb els corresponents a uns patrons prèviament seleccionats. La utilització de les alçades del pic té l'avantatge que és fàcil de mesurar, però presenta l'inconvenient que s'ha de controlar rigorosament la temperatura de la columna, el flux de la fase mòbil i la velocitat d'injecció de la mostra, ja

que aquestes variables poden provocar un eixamplament dels pics degut a que estan inversament relacionades amb les corresponents alçades. No obstant això, l'àrea de pic és independent dels efectes deguts a les variables anteriorment esmentades, pel que és la magnitud que normalment s'utilitza en la quantificació. La seva mesura es porta a terme amb facilitat, ja que gairebé tots els cromatògrafs moderns estan proveïts d'integradors electrònics digitals. No obstant això, cal tenir en compte que la resposta del detector varia d'un component a un altre. Així, per exemple, el detector ultraviolat depèn de l'absortivitat dels corresponents components i el d'ionització de flama, de la formació d'ions. Per això, sovint s'utilitzen els anomenats factors de resposta, obtinguts de la relació entre l'àrea d'un component i l'àrea d'un altre component triat com a referència.

Els procediments de quantificació que principalment s'utilitzen en cromatografia són els procediments del patró extern, del patró intern i de normalització d'àrees.

6.2.1 Procediment del patró extern

El procediment del patró extern consisteix en la utilització de materials de calibratge de composició semblant a la de la mostra. Seguidament, s'obtenen els cromatogrames dels diferents calibradors i es representen les àrees (o les alçades) de pic en funció de la concentració. Idealment aquesta representació hauria de ser lineal i passar per l'ordenada en l'origen però en diversos casos aquestes condicions no es compleixen. Posteriorment, per a una mostra determinada, s'obté el seu cromatograma, l'àrea o l'alçada del pic que correspon al component en qüestió i es calcula la seva concentració mitjançant la interpolació de la seva àrea o alçada en l'esmentada representació.

En aquest procediment, la font més important d'error és la deguda a la incertesa en el volum de la mostra que és injectada, sobretot quan s'utilitzen micro-xeringues. Aquests errors es poden reduir considerablement amb l'ús de vàlvules rotatòries i emprant el procediment del patró intern.

6.2.2 Procediment del patró intern

En el procediment del patró intern, als materials de calibratge i a les mostres se'ls hi 'afegeix una quantitat exacta d'un component pur, absent en la mostra, anomenat patró intern. Seguidament, s'obtenen els cromatogrames dels diferents calibradors i els del patró intern i es representen els quocients entre les seves àrees (o alçades) de pic (calibradors/patró intern) en funció de la concentració. Posteriorment, per a una mostra determinada, s'obté el seu cromatograma, l'àrea o l'alçada del pic que correspon al component en qüestió i del seu patró intern, es duu a terme la relació entre aquestes àrees i es calcula la seva concentració mitjançant la interpolació de la seva relació d'àrees en l'esmentada representació.

Per poder aplicar aquest procediment en cromatografia, cal que el pic cromatogràfic del patró intern estigui ben aïllat dels pics dels altres components de la mostra, però presenti temps de retenció propers al del pic del component en qüestió.

6.2.3 Procediment de normalització d'àrees

El procediment de normalització de les àrees consisteix en eluir tots els components de la mostra, mesurar les seves àrees de pic i obtenir les corresponents àrees de pic corregides (mitjançant els factors de resposta del detector). La concentració del component d'una mostra s'obté de la relació entre la seva àrea i l'àrea total dels pics de tots els components existents en la mostra.

6.3 Exemple de propietats qualitatives i magnituds biològiques que poden ser examinades o mesurades mitjançant sistemes cromatogràfics

Com ja s'ha comentat, l'aplicació de la cromatografia com a principi de mesura en les ciències de laboratori clínic presenta dos avantatges principals. El primer està relacionat amb la seva elevada capacitat per separar i aïllar diversos components d'una mostra que estan estretament relacionats entre sí en diferents fluids biològics, i el segon i principal (avantatge), amb la possibilitat de mesurar la concentració d'aquests components ("anàlisi quantitativa") o bé d'examinar-los o identificar-los ("anàlisi qualitativa"). A continuació, i a mode d'exemple, es descriuen algunes propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant sistemes cromatogràfics, atenent al tipus de cromatografia utilitzada.

6.3.1 Cromatografia d'adsorció

Alguna de les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant la cromatografia d'adsorció són:

17-Hidroxicorticoides

- Pla—17-Hidroxicorticoides; taxon.
- Uri—17-Hidroxicorticoides; taxon.
- Pla—17-Hidroxipregnenolona; c.subst.
- Pla—17-Hidroxiprogesteronona; c.subst.
- Pla—Cortisol; c.subst.
- Uri—Cortisol; c.subst.

17-Cetoesteroïdes

- Pla—17-Cetoesteroïdes; taxon.
- Uri—17-Cetoesteroïdes; taxon.
- Pla—Aldosterona; c.subst.
- Pla—Corticosterona; c.subst.

- Uri—Corticosterona; c.subst.
- Pla—Pregnenolona; c.subst.
- Pla—Progesterona; c.subst.

Àcids grassos

- Pla—Àcids orgànics; taxon.
- Pla—Araquidonat; c.subst.
- Pla—Capriat; c.subst.
- Pla—Linoleat; c.subst.
- Pla—Oleat; c.subst.
- Pla—Palmitat; c.subst.

Andrògens i estrògens

- Pla—Androstenediol; c.subst.
- Pla—Androstenediona; c.subst.
- Pla—Estradiol; c.subst.
- Pla—Estriol; c.subst.
- Pla—Estrona; c.subst.
- Pla—Testosterona; c.subst.

Lípids

- Pla—Diglicèrids; taxon.
- Pla—Monoglicèrids; taxon.
- Pla—Triglicèrids; taxon.

6.3.2 Cromatografia de repartiment

Alguna de les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant la cromatografia de repartiment són:

Amines biogèniques

- Pla—3-metoxiadrenalini; c.subst.
- Pla—3-metoxinoradrenalini; c.subst.
- Uri—3-metoxiadrenalini; c.subst.
- Uri—3-metoxinoradrenalini; c.subst.
- Uri—3-metoxitiramini; c.subst.
- Uri—4-Hidroxi-3-metoximandelat; c.subst.
- Uri—5-Hidroxiindolilacetat; c.subst.
- Uri—Adrenalini; c.subst.

- Uri—Dopamini; c.subst.
- Uri—Noradrenalini; c.subst.
- Pla—Serotonini; c.subst.
- Uri—Serotonini; c.subst.

Drogues d'abús

- Uri—11-nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-11-carboxilat; c.subst.
- Uri—Amfetamines; c.arb.
- Uri—Benzoillegconina; c.subst.
- Uri—Cannabinoids; c.arb.
- Uri—Cocaïna; c.subst.
- Uri—Cocaïna+metabòlits; c.arb.
- Uri—Fenciclidina; c.subst.
- Uri—Heroïna; c.subst.
- Uri—Metadona; c.subst.
- Uri—Metamfetamina; c.subst.
- Uri—Morfina; c.subst.
- Uri—Opiacis; c.arb.

Fàrmacs analgèsics

- Pla—Analgèsics; taxon.
- Pla—Diclofenac; c.subst.
- Pla—Ibuprofè; c.subst.
- Pla—Naproxè; c.subst.
- Pla—Oxicodona; c.subst.
- Pla—Paracetamol; c.subst.

Fàrmacs antagonistes

- Pla—Fàrmacs antagonistes; taxon.
- Pla—Omeprazol; c.subst.
- Pla—Ranitidina; c.subst.

Fàrmacs antiagregants

- Pla—Fàrmacs antiagregants; taxon.
- Pla—Warfarina; c.subst.

Fàrmacs antiarítmics

- Pla—Digoxina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiarítmics; taxon.

- Pla—Metoprelol; c.subst.
- Pla—Procaïnàmidà; c.subst.
- Pla—Propanolol; c.subst.

Fàrmacs antibiòtics

- Pla—Antibiòtics; taxon.
- Pla—Amoxicil·lina; c.subst.
- Pla—Cefalosporina; c.subst.
- Pla—Ertapemen; c.subst.
- Pla—Meropenem; c.subst.
- Pla—Piperacil·lina; c.subst.

Fàrmacs antibacterians

- Pla—Fàrmacs antibacterians; taxon.
- Pla—Minociclina; c.subst.
- Pla—Sulfadiazina; c.subst.
- Pla—Sulfametoxazol; c.subst.
- Pla—Tetraciclina; c.subst.
- Pla—Trimetoprim; c.subst.

Fàrmacs antidepressius

- Pla—Amitriptilina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antidepressius; taxon.
- Pla—Fluoxetina; c.subst.
- Pla—Imipramina; c.subst.
- Pla—Nortriptilina; c.subst.
- Pla—Verapamil; c.subst.

Fàrmacs antiepileptics

- Pla—Carbamazepina; c.subst.
- Pla—Lamotrigina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiepileptics; taxon.
- Pla—Fenitoïna; c.subst.
- Pla—Gabapentina; c.subst.
- Pla—Oxcarbazepina; c.subst.
- Pla—Valproat; c.subst.

Fàrmacs antifúngics

- Pla—Fàrmacs antifúngics; taxon.
- Pla—Fluconazol; c.subst.

- Pla—Itraconazol; c.subst.
- Pla—Ketoconazol; c.subst.
- Pla—Posaconazol; c.subst.
- Pla—Voriconazol; c.subst.

Fàrmacs antiretrovirals

- Pla—Aciclovir; c.subst.
- Pla—Atazanavir; c.subst.
- Pla—Delfinavir; c.subst.
- Pla—Efavirenz; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiretrovirals; taxon.
- Pla—Ganciclovir; c.subst.

Fàrmacs antineoplàsics

- Pla—5-Fluoruracil; c.subst.
- Pla—Carmustina; c.subst.
- Pla—Cisplatí; c.subst.
- Pla—Docetaxel; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antineoplàsics; taxon.
- Pla—Gencitabina; c.subst.

Fàrmacs barbiturats

- Pla—Barbiturats; taxon.
- Uri—Barbiturats; taxon.
- Pla—Butabital; c.subst.
- Pla—Fenobarbital; c.subst.
- Pla—Pentotal; c.subst.
- Pla—Secobarbital; c.subst.

Fàrmacs benzodiazepines

- Pla—Benzodiazepines; taxon.
- Uri—Benzodiazepines; taxon.
- Pla—Clonazepam; c.subst.
- Pla—Diazepam; c.subst.
- Pla—Nordiazepam; c.subst.
- Pla—Oxazepam; c.subst.

Fàrmacs immunosupressors

- San—Ciclosporina A; c.subst.

- San—Everolimus; c.subst.
- Pla—Fàrmacs immunosupressors; taxon.
- Pla—Micofenolat; c.subst.
- San—Sirolimus; c.subst.
- San—Tacrolimus; c.subst.

Porfirines

- Uri—Coproporfirina I; c.subst.
- Uri—Coproporfirina III; c.subst.
- Uri—Heptacarboxiporfirina; c.subst.
- Uri—Hexacarboxiporfirina; c.subst.
- Uri—Pentacarboxiporfirina; c.subst.
- Uri—Porfirines; taxon.
- Uri—Uroporfirina; c.subst.

Vitamines

- Pla— α -Tocoferol; c.subst.
- Pla—Ascorbat; c.subst.
- Pla—Calcidiol; c.subst.
- Pla—Ercalcidiol; c.subst.
- Pla—Piridoxal-5'-fosfat; c.subst.
- Pla—Retinol; c.subst.
- San—Riboflavina; c.subst.
- San—Tiamina; c.subst.

6.3.3 Cromatografia de bescanvi iònic

Alguna de les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant la cromatografia de bescanvi iònic són:

Aminoàcids i acilcarnitines

- Pla—Acilcarnitines; taxon.
- Uri—Acilcarnitines; taxon.
- Pla—Aminoàcids; taxon.
- Uri—Aminoàcids; taxon.
- Pla—Alanina; c.subst.
- Uri—Alanina; c.subst.

- Pla—Citru·lina; c.subst.
- Uri—Citru·lina; c.subst.
- Pla—Glicina; c.subst.
- Uri—Glicina; c.subst.
- Pla—Leucina; c.subst.
- Uri—Leucina; c.subst.
- Pla—Ornitina; c.subst.
- Uri—Ornitina; c.subst.
- Pla—Triptòfan; c.subst.
- Uri—Triptòfan; c.subst.

Hemoglobines

- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina A2; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina C; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina D; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina E; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina F; fr.subst.
- Hb(San)—Hemoglobina S; fr.subst.

Fàrmacs

- Pla—Valproat; c.subst.

Isoenzims

- Pla—Creatina-cinasa; taxon.
- Pla—Creatina-cinasa 1; c.massa
- Pla—Creatina-cinasa 2; c.massa
- Pla—Creatina-cinasa 3; c.massa
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa; taxon.
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa 1; c.cat.
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa 2; c.cat.
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa 3; c.cat.
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa 4; c.cat.
- Pla—L-Lactat-deshidrogenasa 5; c.cat.

6.3.4 Cromatografia d'exclusió

Alguna de les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant la cromatografia d'exclusió molecular són:

- LAm—Acetilcolinesterasa; c.cat.
- Pla—Acetilcolinesterasa; c.cat.
- Pla—Angiotensina I; c.massa
- Pla—Angiotensina II; c.massa
- Uri—Eritropoetina; taxon.
- Pla—Eritropoetina; c.subst.arb.
- Uri—Eritropoetina; c.subt.arb.
- Pla—Oxitocina; c.massa
- Pla—Vasopressina; c.massa

6.3.5 Cromatografia d'afinitat

Alguna de les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant la cromatografia d'afinitat són:

- Pla—Albúmina; c.massa
- Pla—Colesterol; taxon.
- Pla—Colesterol HDL; c.subst.
- Pla—Colesterol IDL; c.subst.
- Pla—Colesterol LDL; c.subst.
- Pla—Colesterol VLDL; c.subst.
- Pla—Fibrinogen; c.massa
- Pla—Fosfatasa alcalina; taxon.
- Pla—Fosfatasa alcalina hepàtica; c.cat.
- Pla—Fosfatasa alcalina òssia; c.cat.
- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst.
- Pla—Immunoglobulina A; c.massa
- Pla—Immunoglobulina G; c.massa
- Pla—Immunoglobulina M; c.massa
- Pla—Transferrina; c.subst.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill·Interamericana; 2001.
2. Miller JM. Chromatography: concepts and contrasts. New Jersey: Miller; 2009.
3. Heftmann E. Chromatography. Amsterdam: Elsevier; 2004.
4. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. Bioquímica clínica y patología molecular. Barcelona: Reverté; 1998.
5. Brown PR. High-performance liquid chromatography: past developments, present status, and future trends. *Anal Chem* 1990;62:995A-1008A.
6. Lough WJ, Wainer IW. High-performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. Londres: Blackie Academic & Professional; 1995.
7. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl Chem* 1993;65:819-72.
8. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of chemical terminology—the Gold Book: <<http://goldbook.iupac.org/>>(acces: 2013-04-22).