



Continguts: [www.acclc.cat/volumen/vol-17/](http://www.acclc.cat/volumen/vol-17/)

*In vitro veritas*

Pàgina web de la revista: [www.acclc.cat/ivv.php](http://www.acclc.cat/ivv.php)



## Revisió

# Cromatografia líquida d'alta eficàcia. Part 1 —Fonaments i instrumentació

Raül Rigo Bonnin, Ariadna Arbiol Roca

Secció de Fàrmacs, Àrea de Bioquímica Especial, Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, L'Hospitalet de Llobregat

2016 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

## ÍNDEX

1. Introducció
2. Objecte i camp d'aplicació
3. Conceptes bàsics de la cromatografia líquida d'alta eficàcia
  - 3.1. Factor de retenció
  - 3.2. Factor de separació
  - 3.3. Eficàcia
  - 3.4. Resolució
  - 3.5. Factor d'asimetria
4. Tipus de cromatografia líquida d'alta eficàcia
  - 4.1. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'adsorció
    - 4.1.1. Fase estacionària
    - 4.1.2. Fase mòbil
    - 4.1.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic
  - 4.2. Cromatografia líquida d'alta eficàcia de repartiment
    - 4.2.1. Fase estacionària
    - 4.2.2. Fase mòbil
    - 4.2.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic
  - 4.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'interacció hidrofílica (HILIC)
    - 4.3.1. Fase estacionària
    - 4.3.2. Fase mòbil
    - 4.3.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic
  - 4.4. Cromatografia líquida d'alta eficàcia de bescanvi iònic
    - 4.4.1. Fase estacionària
    - 4.4.2. Fase mòbil
    - 4.4.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic
  - 4.5. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'exclusió molecular
    - 4.5.1. Fase estacionària
    - 4.5.2. Fase mòbil
    - 4.5.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic
5. Instrumentació de la cromatografia líquida d'alta eficàcia
  - 5.1. Dispositius de subministrament i emmagatzematge de la fase mòbil
  - 5.2. Dispositius de bombeig
  - 5.3. Dispositius d'injecció de la mostra
  - 5.4. Columnes
    - 5.4.1. Farcit químic
    - 5.4.2. Mida de la partícula
    - 5.4.3. Diàmetre intern
    - 5.4.4. Longitud
  - 5.5. Detectors
    - 5.5.1. Detectors d'absorció molecular
    - 5.5.2. Detectors de fluorescència
    - 5.5.3. Detectors d'índex de refracció
    - 5.5.4. Detectors electroquímics
    - 5.5.5. Espectròmetres de masses
6. Bibliografia

## 1. Introducció

La cromatografia és un principi de mesura físic de separació en el qual els components a separar d'una mostra (també anomenats *analits*) es distribueixen entre dues fases: una fase que és immòbil (fase estacionària) i una l'altra, que es troba en contacte amb l'estacionària, que es mou en una direcció determinada (fase mòbil) (1).

Segons la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC) (1), la cromatografia es pot classificar en cromatografia frontal, per desplaçament o per elució —atenent al tipus de procediment cromatogràfic desenvolupat—; cromatografia en columna o planar —atenent al tipus de fase estacionària utilitzada—; cromatografia líquida, de gasos o de fluids supercrítics —atenent a l'estat físic en què es troba la fase mòbil; i cromatografia d'adsorció, de repartiment, de bescanvi iònic, d'exclusió molecular o d'afinitat —atenent al tipus d'interacció que s'estableix entre els diferents components de la mostra i les fases mòbil i estacionària—. Cal tenir en compte que les diferents modalitats classificatòries de la cromatografia no són independents entre sí, és a dir, que per a un procediment de mesura determinat basat en la cromatografia (d'ara en endavant, procediment cromatogràfic), poden coexistir diferents tipus de cromatografia. Un exemple és la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*), la qual és una cromatografia líquida —la fase mòbil és un líquid—, en columna —la fase mòbil es troba dins d'un tub o columna— i en elució —la fase mòbil travessa contínuament la fase estacionària— (2-7).

Així, l'HPLC és un principi de mesura que permet separar una mescla de components d'una mostra en funció de la seva distribució entre dues fases: una fase estacionària (un sòlid o un líquid adsorbit sobre un suport sòlid) i una fase mòbil (un líquid). En aquest tipus de cromatografia, la mostra —o un extracte de la mostra— és injectada en el si de la fase mòbil, en la qual és soluble, i impulsada a una elevada pressió a través de la fase estacionària, la qual és immiscible (insoluble) amb la fase mòbil, perquè tingui lloc el procés físico-químic de separació. Posteriorment, un cop separats els diferents analits en el sistema cromatogràfic (eluats), aquests poden ser identificats o bé quantificats emprant un detector determinat o un altre en funció de quines siguin les seves propietats fisicoquímiques (1-7).

## 2. Objecte i camp d'aplicació

L'objecte d'aquesta revisió és donar a conèixer els conceptes bàsics de l'HPLC, enumerar els tipus d'HPLC existents en l'actualitat, les seves aplicacions en les ciències de laboratori clínic, així com la seva instrumentació.

## 3. Conceptes bàsics de la cromatografia líquida d'alta eficàcia

Fonamentalment, el procés de separació cromatogràfic pot ser descrit i estudiat en base a quatre paràmetres bàsics: el factor de retenció (també anomenat pel terme no recomanat per la IUPAC, capacitat), el factor de separació (també anomenat pel terme no recomanat per la IUPAC, selectivitat), l'eficàcia, i la resolució (2-7).

### 3.1. Factor de retenció

El factor de retenció ( $k'$ ) és un paràmetre cromatogràfic que permet conèixer el temps que un component d'una mostra roman en la fase estacionària (columna), en relació al temps que roman en la fase mòbil (1). Dóna idea de quin és l'ordre de magnitud amb què la columna reté un component donat. Es pot calcular en el cromatograma a partir del temps de retenció ajustat d'un component  $t'_R$  i el temps bàsic de retenció,  $t_0$ , segons l'equació:

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

El factor de retenció depèn principalment del material en què està empaquetada la columna, però també de la composició de la fase mòbil. El factor de retenció és un paràmetre important perquè permet comparar retencions de diferents components d'una mostra que s'han separat fent servir sistemes cromatogràfics diferents.

Valors de  $k'$  molt menors a la unitat indiquen que la retenció dels components per part de la columna és mínima. Pel contrari, valors iguals o superiors a 20 indiquen que els components són molt retinguts en la columna. Aquesta darrera situació pot provocar un augment de l'amplada dels seus pics cromatogràfics <sup>2</sup> i donar lloc a temps de separació cromatogràfics excessius. Tenint en compte totes aquestes consideracions, idealment, s'haurien de fer servir condicions cromatogràfiques que permetin obtenir, per a cada un dels components, valors de  $k'$  compresos entre 2 i 10 (2-7).

### 3.2. Factor de separació

El factor de separació ( $\alpha$ ) és un paràmetre cromatogràfic que permet conèixer la retenció relativa entre dos pics cromatogràfics pròxims, és a dir, permet descriure com d'eficaç és un procediment cromatogràfic per separar dos components (A i B) d'una mostra (1). Es pot calcular en el cromatograma a partir del temps bàsic de retenció i els temps de retenció dels components, segons l'equació:

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{t'_{R,A}}{t'_{R,B}} = \frac{t_{R,A} - t_0}{t_{R,B} - t_0}$$

El factor de separació depèn del material en què està empaquetada la columna però també de les propietats de la fase mòbil (composició, temperatura, pH, força iònica, entre altres) i del tipus d'elució utilitzada (isocràtica o en gradient). Un valor d' $\alpha$  igual a 1 indica que els dos components presenten un mateix temps de retenció i no podran ser separats (2-7).

### 3.3. Eficàcia

L'eficàcia d'un procediment cromatogràfic permet conèixer el grau d'eixamplament d'un pic cromatogràfic d'un component com a conseqüència del seu moviment a través de la columna (1). L'amplada d'un pic cromatogràfic està directament relacionada amb el temps de retenció del component en la columna ja que, a major temps, major amplada, de manera que els components que elueixen més tard presenten pics més amples que els que elueixen en primer lloc. Així, l'eixamplament dels pics dels diferents components actuarà en detriment de la seva separació.

L'eficàcia d'un procediment cromatogràfic pot ser abordat des de dos punts de vista: la *teoria del plat (teòric)* i la *teoria de la velocitat o cinètica* (2-7).

<sup>1</sup> **Temps de retenció ajustat:** temps total de retenció menys el temps bàsic de retenció (1).

**Temps total de retenció:** temps transcorregut des de que el component d'una mostra és injectat fins que arriba al detector (1).

**Temps bàsic de retenció:** temps transcorregut requerit per eluir un component d'una mostra que no és retingut per la fase estacionària. Aquest temps es sol anomenar pel terme no recomanat, *temps mort* (1).

<sup>2</sup> **Pic cromatogràfic:** part d'un cromatograma que mostra la resposta del detector quan un component d'una mostra és eluït de la columna (1).

**Cromatograma:** gràfic o altre tipus de representació de la resposta d'un detector que relaciona la concentració del component d'una mostra en la fase mòbil o d'una altra magnitud utilitzada per mesurar una propietat de la fase mòbil amb el temps de retenció dels components d'una mostra (1).

La teoria del plat (teòric) considera que la columna cromatogràfica està constituïda per nombroses, però discretes capes estretes, denominades plats teòrics, en termes anàlegs a 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 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 procediment cromatogràfic, el nombre de plats teòrics,  $N$ , i l'alçada del plat teòric,  $H$ , els quals estan relacionats entre sí mitjançant l'equació:

$$N = \frac{L}{H}$$

on  $L$  és la longitud de la columna.

Per altra banda, el nombre de plats teòrics,  $N$ , es relaciona amb el temps de retenció i amb la desviació estàndard —descrita com l'amplitud,  $w$ — d'una corba de Laplace-Gauss característica d'un pic cromatogràfic, mitjançant la següent equació:

$$N = 16 \cdot \frac{t_R^2}{w^2} = \frac{L}{H}$$

La teoria del plat (teòric) explica satisfactòriament la forma gaussiana dels pics cromatogràfics i la velocitat de desplaçament d'un component, 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 i s'adoptés l'anomenada teoria de la velocitat o cinètica.

La teoria de la velocitat, 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 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 a través de la columna,
- la difusió longitudinal de les molècules d'un component al llarg de la columna, i
- al lent equilibri entre les fases mòbil i estacionària al que es veu sotmès un component.

La contribució dels tres factors esmentats és considerada en l'anomenada equació de Van Deemter modificada:

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

on  $\lambda$  és una constant que depèn de les dimensions, geometria i uniformitat de l'empaquetament de la columna,  $d_p$  el diàmetre promig de les partícules de la columna,  $D_M$  el coeficient de difusió de la fase mòbil,  $\gamma$  un factor d'impediment que depèn de les característiques del rebliment de la columna,  $u$  la velocitat lineal o flux de la fase mòbil,  $f(k)$  una funció matemàtica que depèn del factor de retenció  $k$  i del tipus de cromatografia utilitzada,  $d_f$  l'espessor promig de recobriment de la columna,  $d_p$  el diàmetre promig de la partícula de la columna i  $D_S$  el coeficient de difusió de la fase estacionària.

L'eficàcia de la columna augmenta en fer-ho el nombre de transferències del component entre la fase mòbil i la fase

estacionària, és a dir, al augmentar el nombre de plats teòrics o al disminuir l'alçada entre aquests plats teòrics.

Així, l'eficàcia cromatogràfica depèn fonamentalment de diverses propietats de la fase estacionària però també de distintes propietats relacionades amb la fase mòbil, principalment, el seu flux i la seva composició (2-7).

### 3.4. Resolució

La resolució ( $R$ ) és un paràmetre cromatogràfic que permet conèixer el grau de separació entre dos pics cromatogràfics corresponents a dos components diferents (A i B) d'una mateixa mostra (1, 2). Es pot calcular en el cromatograma a partir del temps de retenció dels components i de seves amplades dels pics cromatogràfics ( $w$ ), segons l'equació:

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R,B} - t_{R,A})}{w_B + w_A}$$

Aquesta equació resulta adequada per obtenir el valor de la resolució, però no proporciona informació sobre les propietats cinètiques o termodinàmiques, fet que és important quan es vol optimitzar els valors de la resolució. Per això, una equació alternativa per a la mateixa és:

$$R = \left( \frac{k}{k-1} \right) \cdot \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

on  $N$  és el nombre de plats teòrics de la columna,  $\alpha$  és el factor de separació entre dos components A i B i  $k$  és el valor promig dels factors de retenció dels dos components. Aquesta expressió matemàtica ens indica que la resolució depèn de l'eficàcia de la columna ( $N$ ), de la capacitat de la fase estacionària per retenir els components ( $\alpha$ ) i de les característiques de retenció de cada component ( $k$ ).

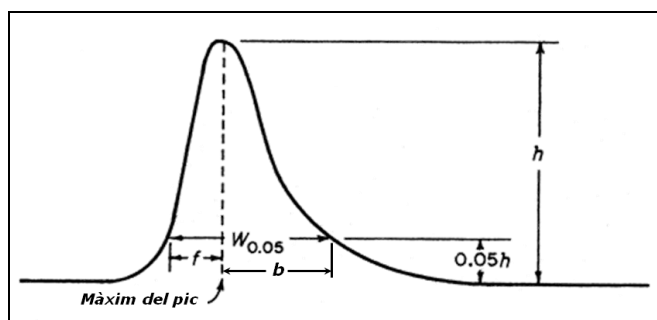
Una forma relativament senzilla de millorar la resolució és optimitzant  $k'$ , per exemple, augmentant la temperatura o canviant la composició de la fase mòbil. També es pot millorar modificant el valor d' $\alpha$  variant la composició de la fase mòbil, la composició de la fase estacionària (canviant la columna cromatogràfica) o bé, recorrent a factors químics especials com poden ser la incorporació d'algun agent complexant particular a la fase estacionària (2-7).

Es considera que dos pics cromatogràfics estan ben resolts quan el valor de  $R$  és major o igual a 1,5 (2-7).

### 3.5. Factor d'asimetria

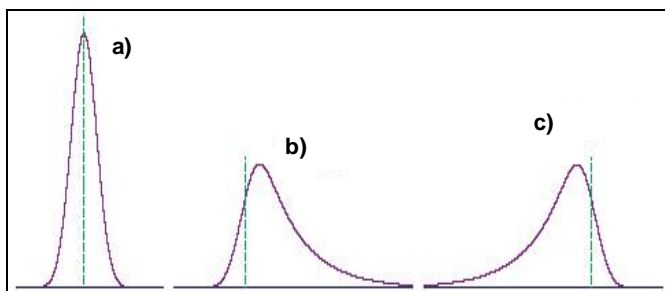
L'obtenció de pics cromatogràfics simètrics (gaussians) s'originen quan la distribució d'un component entre les fases mòbil i estacionària és constant i independent de la seva concentració. En realitat, gairebé sempre s'obtenen pics asimètrics, ja que la relació de les concentracions molars del component 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 1) (2-7). Aquest factor es pot calcular en el cromatograma a partir de la següent equació:

$$A_f = \frac{b+f}{2 \cdot f}$$



**Figura 1.** Paràmetres de simetria d'un pic cromatogràfic.

A la Figura 2, 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 2.** 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 2b) solen presentar-se quan existeix 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 2c) solen aparèixer per aquells sistemes cromatogràfics on la fase estacionària reté fortament al component 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 (2-7).

#### 4. Tipus de cromatografia líquida d'alta eficàcia

Com s'ha esmentat anteriorment, l'HPLC és una cromatografia líquida, en columna i d'elució. A més, l'HPLC també pot classificar-se, atenent al mecanisme mitjançant el qual es produeix el procés fisicoquímic de separació, en HPLC d'adsorció, de repartiment, de bescanvi iònic o d'exclusió molecular (2-7).

##### 4.1. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'adsorció

En l'HPLC d'adsorció o líquid-sòlid, la fase estacionària és un sòlid —habitualment sílice o alumina finament dividida— amb una superfície que conté grups funcionals amb unes propietats fisicoquímiques determinades que permet la seva interacció amb l'analit i la fase mòbil. El mecanisme de retenció més àmpliament acceptat per explicar aquesta interacció està basat en la *teoria de desplaçament*. Aquesta teoria postula l'existència d'una competència, entre l'analit i la fase mòbil, pels centres actius de la superfície de la fase estacionària. Així, quan la fase mòbil sense l'analit passa a través de la columna, s'arriba a un equilibri en el qual les molècules d'aquesta queden adsorbides sobre la superfície del sòlid formant una monocapa. Quan l'analit és

introduït a la columna conjuntament amb la fase mòbil, aquest competeix pels centres actius de la superfície de la fase estacionària ocupats per la monocapa de fase mòbil, arribant-se a nous equilibris d'adsorció-desorció entre fase mòbil, la fase estacionària i l'analit. En aquests equilibris influeixen la quantitat de centres actius existents sobre la superfície de la fase estacionària, la força eluotrópica ( $\epsilon^\circ$ ) de la fase mòbil, la relació entre les quantitats de fase mòbil adsorbida i no adsorbida i la naturalesa fisicoquímica de l'analit (2-7)

##### 4.1.1. Fase estacionària

Les fases estacionàries més emprades en l'HPLC d'adsorció són la sílice i l'alumina les quals presenten una propietat en comú, la seva elevada activitat superficial. Les principals magnituds que permeten conèixer quina serà aquesta activitat superficial són la superfície específica i la mida de porus de la partícula. Ambdues permetran orientar sobre el nombre de centres actius existents en la superfície del farciment i sobre si aquests centres actius estaran o no a l'abast de les molècules d'analit, és a dir, seran més o menys actius. Així, per exemple, un valor de superfície específica elevat conjuntament amb un valor baix de mida de porus indicaran que un gran nombre de centres actius es trobaran en zones del porus que seran inaccessibles per l'analit (2-7).

Un altre aspecte important a tenir en compte és la reactivitat en què es troben els centres actius sobre la superfície de l'adsorbent, ja que aquests poden estar inactius per la presència de molècules que s'adsorbeixin fortament sobre ells. Així, per exemple, la presència de molècules d'aigua en la fase mòbil pot provocar una inactivació de la superfície de la fase estacionària, donat que l'aigua és una molècula amb una elevada polaritat i s'adsorbirà fortament a la superfície evitant l'adsorció i retenció de l'analit (2-7).

##### 4.1.2. Fase mòbil

En l'HPLC d'adsorció, la única variable que es pot fer servir per controlar la retenció i separació cromatogràfiques (els valors de  $k'$  i  $\alpha$ ) és la composició de la fase mòbil. Les fases mòbils solen estar compostes fonamentalment per dissolvents orgànics que presenten una polaritat baixa o mitjana com l'*n*-hexà, l'*iso*-octà, l'acetonitril, el metanol, el clorur de butil, el cloroform, el clorur de metilè, el tetrahidrofurà i el 2-propanol (2-7).

La polaritat d'un dissolvent —propietat química en la que existeix una separació estable entre les càrregues positives i negatives de les seves molècules— està directament relacionada amb l'anomenada *força eluotrópica* ( $\epsilon^\circ$ ). La força eluotrópica d'un dissolvent permet conèixer la seva energia d'adsorció per unitat de superfície en un material de sílice o alumina respecte al valor d'un dissolvent apolar, l'*n*-pentà, el qual presenta un valor assignat convencionalment igual a zero. El coneixement dels valors d' $\epsilon^\circ$  d'un dissolvent (Taula 1) són de gran utilitat a l'hora de dur a terme la selecció de la fase mòbil (2-7).

El procediment per a l'elecció del dissolvent en cromatografia d'adsorció es basa principalment en la tria de dos dissolvents compatibles (solubles o miscibles entre si), un dels quals presenta un valor d' $\epsilon^\circ$  elevat (dissolvent anomenat fort o modificador) i l'altre amb un valor d' $\epsilon^\circ$  baix (dissolvent anomenat feble). Variant la proporció entre els dos dissolvents es pot obtenir un valor adequat de  $k'$  (entre 2 i 10). Habitualment, un augment de 0,05 unitats en el valor d' $\epsilon^\circ$  dona lloc a una disminució de 3-4 vegades el valor de  $k'$ . D'aquesta manera, es poden aconseguir variacions considerables de  $k'$  i trobar un sistema binari de dissolvents (vegeu Taula 1) que proporcionin uns temps de retenció adequats per a la separació dels components de qualsevol tipus de mostra (2-7).



Tot i que els valors d' $\epsilon^0$  no varien linealment amb la composició d'una mescla de dissolvents, a la pràctica, per al càlcul aproximat de la força eluotrópica d'una barreja de dissolvents A i B pot ser d'utilitat l'aplicació de la següent equació:

$$\epsilon_{AB}^0 = \varphi_A \cdot \epsilon_A^0 + \varphi_B \cdot \epsilon_B^0$$

on  $\varphi$  és la fracció en volum de cada dissolvent.

**Taula 1.** Índex de polaritat i forces eluotrópiques ( $\epsilon^0$ ) dels principals dissolvents utilitzats com a fase mòbil en l'HPLC.

Dissolvent	Índex de polaritat	$\epsilon^0$ (Alúmina)	$\epsilon^0$ (Sílice)
Fluoralcans	-2	-0,25	-0,20
Ciclohexà	0,04	-0,20	-0,15
<i>n</i> -Pentà	0,08	0,00	0,00
<i>n</i> -Hexà	0,1	0,01	0,03
<i>Iso</i> -octà	0,4	0,01	0,01
Clorur de butil	1,0	0,23	0,18
Tetraclorur de carboni	1,7	0,18	0,12
<i>iso</i> -Propilèter	2,2	0,28	0,22
Toluè	2,3	0,29	0,23
Dietilèter	2,8	0,38	0,30
Cloroform	3,4	0,36	0,26
Clorur de metilè	3,4	0,44	0,32
Tetrahidrofurà	4,2	0,45	0,35
Acetat d'etil	4,3	0,58	0,41
2-propanol	4,3	0,82	0,66
Etanol	5,2	0,88	0,68
Acetona	5,4	0,58	0,47
Acetonitril	5,8	0,65	0,46
Nitrometà	6,0	0,64	0,51
Dimetil sulfòxid	6,5	0,62	0,50
Metanol	6,6	0,95	0,73
Etilenglicol	6,9	1,11	0,89
Aigua	10,2	>5	>5

#### 4.1.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic

L'HPLC d'adsorció s'utilitza fonamentalment per a la separació de components no polars de baixa massa molar relativa ( $\leq 5000$  g/mol). Una característica particular d'aquest tipus de cromatografia és la seva capacitat per diferenciar compostos isòmers de mesclades complexes (2-7).

En les ciències de laboratori clínic, les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant l'HPLC d'adsorció són:

##### 17-Hidroxicorticoides

- Pla—17-Hidroxicorticoides; taxon.

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

##### 17-Cetoesteroides

- Pla—17-Cetoesteroides; taxon.
- Uri—17-Cetoesteroides; 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.

#### 4.2. Cromatografia líquida d'alta eficàcia de repartiment

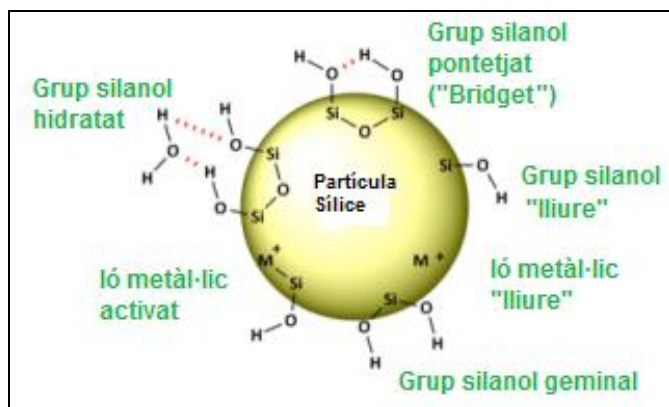
L'HPLC més emprada en l'actualitat en diferents àmbits científics (inclosa les ciències de laboratori clínic) és la cromatografia de repartiment, en la qual la fase estacionària és un líquid retingut sobre un sòlid i la separació es basa fonamentalment en la diferent distribució (solubilitat) de l'anàlit entre la fase mòbil i la fase estacionària (2-7).

La cromatografia de repartiment, a la vegada, es pot classificar en cromatografia líquid-líquid i cromatografia amb fase unida químicament (enllaçada). La diferència entre ambdues rau en com es reté la fase estacionària sobre un sòlid compost per un farcit de partícules. En la cromatografia líquid-líquid, la fase estacionària líquida es reté sobre la superfície del sòlid per adsorció física mentre que en la cromatografia amb fase unida químicament, la fase estacionària s'uneix químicament a la superfície del sòlid (2-7).

##### 4.2.1. Fase estacionària

En l'HPLC de repartiment, gairebé totes les fases estacionàries són de fase unida químicament les quals es preparen sobre la superfície de partícules de sílice rígida. Aquests partícules són mecànicament resistents, poroses, uniformes i amb una mida compresa entre 1,3  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$ . La superfície de la sílice

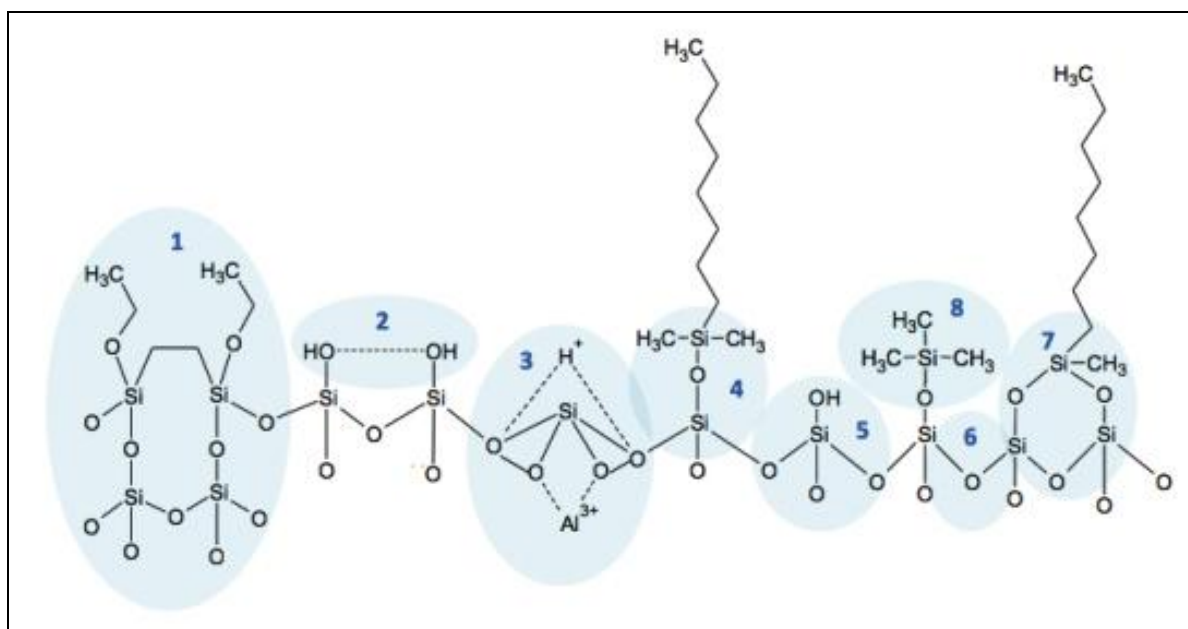
s'hidrolitza formant grups silanols (-SiOH) que són químicament reactius (Figura 3) que posteriorment es fan reaccionar amb un organoclorosilà determinat formant grups siloxans (Figura 4) (2-7).



**Figura 3.** Partícula de sílice que presenta grups silanols a la seva superfície.

La polaritat de la fase estacionària i, per tant, les seves propietats per a la separació dependran del tipus d'organoclorosilà utilitzat, és a dir, del grup alquil que presenta.

Atenent a les polaritats relatives de les fases mòbil i estacionària, es distingeixen dos tipus d'HPLC de repartiment: *en fase normal* i *en fase inversa*. Inicialment, l'HPLC utilitzava fases estacionàries d'elevada polaritat tals com l'aigua o el trietilenglicol col·locades sobre partícules de sílice o alumina i fases mòbils apolars (no polars) —amb freqüència un hidrocarbur—. Per raons històriques, a aquest tipus de cromatografia se la coneix com *cromatografia en fase normal*. Per altra banda, en la *cromatografia en fase inversa*, la fase estacionària és apolar (no polar) o poc polar, i la fase mòbil és polar —habitualment aigua, metanol o acetonitril—. En la cromatografia en fase normal, el component menys polar s'elueix en primer lloc, degut a que és el més soluble en la fase mòbil. A més, un augment de la polaritat de la fase mòbil provoca una disminució del temps d'elució de l'analit. Per contra, en la cromatografia de fase inversa, els components més polars apareixen primer, i un augment de la polaritat de la fase mòbil augmenta el seu temps d'elució (2-7).



**Figura 4.** Superfície d'una partícula de sílice on es poden observar diferents grups silanol (números 2 i 5) i siloxans (números 1, 4, 8 i 7).

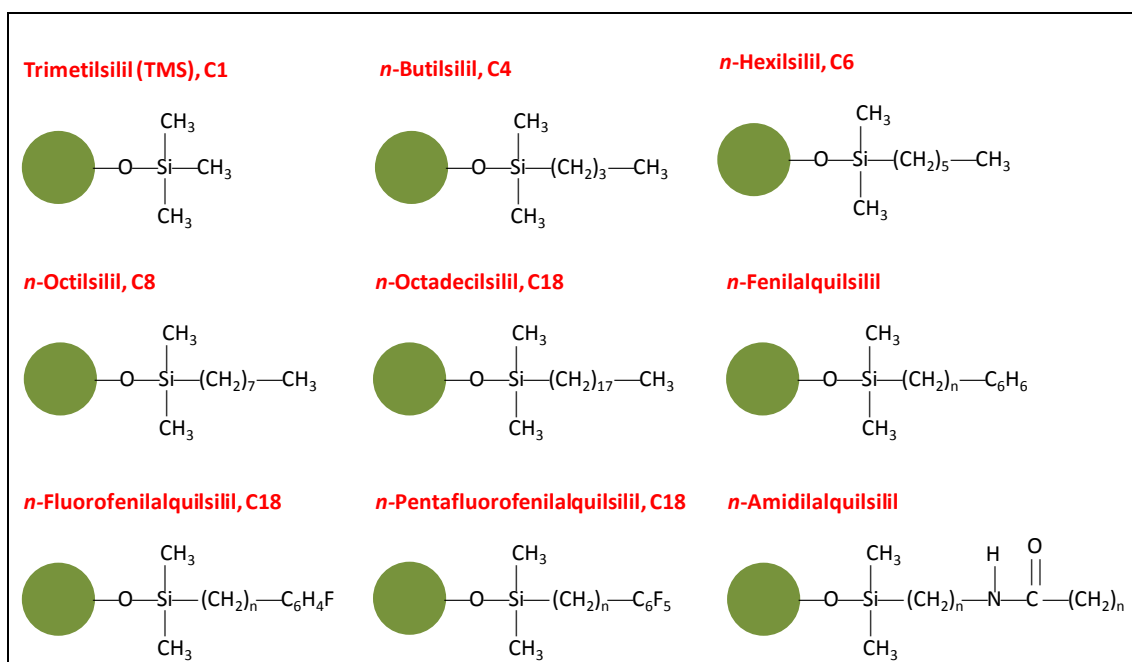
Les fases estacionàries de fase unida químicament es poden classificar com de fase inversa quan el recobriment unit químicament té propietats no polars, i de fase normal quan el recobriment presenta propietats polars. Actualment, la majoria dels procediments cromatogràfics treballen amb fases estacionàries de fase inversa.

En general, en les fases estacionàries de fase inversa, el grup alquil del siloxà és una cadena C1 (metil), C4 (*n*-butil), C6 (*n*-hexil), C8 (*n*-octil), C18 (*n*-octadecil), conté un grup fenil, fluorofenil, pentafluorofenil o amida (Figura 5), entre d'altres (2-7).

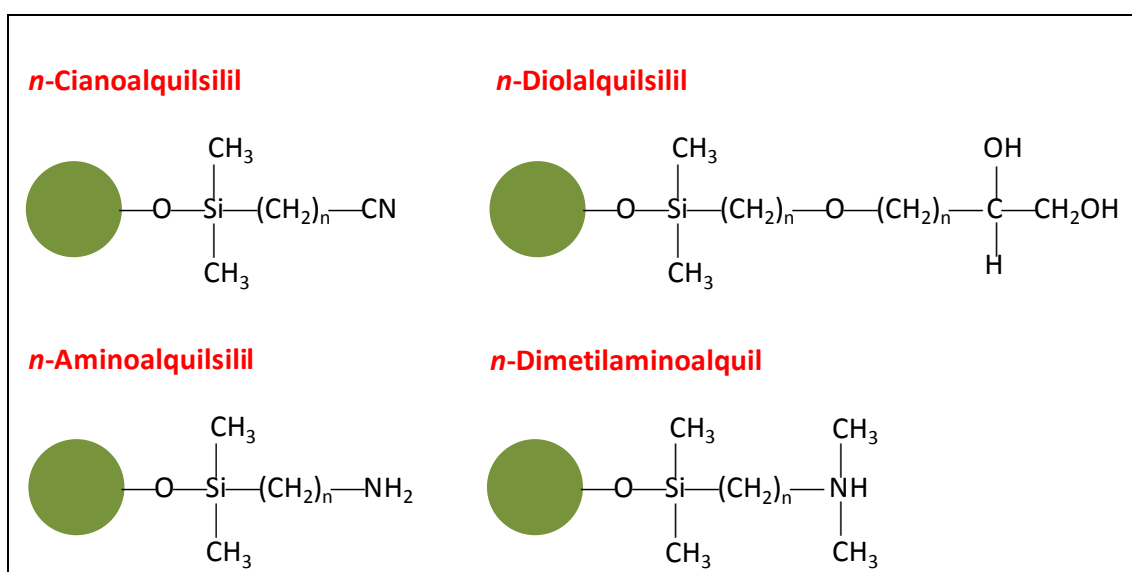
Per altra banda, en les fases estacionàries de fase normal, el grup alquil del siloxà conté un grup funcional polar, com per exemple, un grup ciano (CN), un grup diol ((OH)<sub>2</sub>), un grup amino (NH<sub>2</sub>) o un grup dimetilamino (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Figura 6).

Les polaritats d'aquestes fases estacionàries varien gradualment, sent els de tipus ciano els menys polars i els de tipus amino els més polars. Les de tipus diol presenten una polaritat intermèdia. Amb aquest tipus de fase estacionària, l'elució es realitza amb dissolvents relativament no polars, com ara l'etilèter, el cloroform o l'*n*-hexà (2-7).

A l'hora de triar una columna per a una separació cromatogràfica de repartiment, s'ha de tenir en compte que la polaritat de la fase estacionària ha de ser el més semblant possible a la dels analits i, per a l'elució, utilitzar una fase mòbil amb una polaritat considerablement diferent. En general, aquest procediment resulta més adequat que si les polaritats de l'analit i de la fase mòbil són semblants però difereixen molt pel que fa a la fase estacionària.



**Figura 5.** Principals fases estacionàries emprades en l'HPLC en fase inversa.



**Figura 6.** Principals fases estacionàries utilitzades en l'HPLC en fase normal.

#### 4.2.2. Fase mòbil

Un altre aspecte important a l'hora de treballar amb l'HPLC de repartiment és la composició de la fase mòbil.

Per a l'elecció de la seva composició, és recomanable tenir en compte diverses consideracions o aspectes, tals com (2-7):

- L'ordre de polaritat dels grups funcionals del dissolvent a utilitzar. Aquest ordre és: hidrocarburs < èters < èsters < cetones < aldehids < amides < amines < alcohols < aigua.
- Tenir en compte que, habitualment, la polaritat de la fase estacionària és similar a la dels analits i que, per a l'elució, es sol utilitzar una fase mòbil amb una polaritat considerablement diferent.

- Es pot millorar la separació cromatogràfica modificant el factor de retenció ( $k'$ ), variant la composició de la fase mòbil, fins obtenir uns valors compresos entre 2 i 10.
- Mantinent els valors de  $k'$  entre 2 i 10, es pot millorar la separació cromatogràfica modificant el factor de separació ( $\alpha$ ) canviant la naturalesa química de la fase mòbil.
- Fer servir l'anomenat *índex de polaritat* ( $P$  o  $\log P$ ), el qual permet conèixer la polaritat d'un dissolvent (Taula 1). L'índex de polaritat d'una barreja de dissolvents A i B es pot calcular com:

$$P_{AB} = \varphi_A \cdot P_A + \varphi_B \cdot P_B$$

on  $\varphi$  és la fracció en volum de cada dissolvent.

En general, un canvi de dues unitats de  $P$  modifica aproximadament 10 vegades el valor de  $k'$  d'un analit:

- En fase normal,  $\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P_1 - P_2)/2}$
- En fase inversa,  $\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P_2 - P_1)/2}$

on  $k'_1$  i  $k'_2$  són els valors de  $k'$  inicial i final d'un analit, respectivament, i  $P_1$  i  $P_2$  les seves polaritats inicials i finals.

#### 4.2.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic

En les ciències de laboratori clínic, les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant l'HPLC de repartiment són:

##### 17-Hidroxicorticoïds

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

##### 17-Cetoesteroïds

- Pla—17-Cetoesteroïds; taxon.
- Uri—17-Cetoesteroïds; 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.

##### 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.

##### 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.

##### Drogues d'abús

- Uri—11-nor- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol-11-carboxilat; c.subst.
- Uri—Amfetamines; c.arb.
- Uri—Benzoilegconina; c.subst.
- Uri—Cannabinoïds; 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—Heparina; c.subst.
- Pla—Warfarina; c.subst.

##### Fàrmacs antiarítmics

- Pla—Digoxina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiarítmics; taxon.
- Pla—Metoprelol; c.subst.
- Pla—Procaïnàmidia; 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 antiepilèptics

- Pla—Carbamazepina; c.subst.
- Pla—Lamotrigina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiepilèptics; c.subst.
- 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; c.arb.
- Pla—Butabital; c.subst.
- Pla—Fenobarbital; c.subst.
- Pla—Pentotal; c.subst.

- Pla—Secobarbital; c.subst.

#### Fàrmacs benzodiazepines

- Pla—Benzodiazepines; taxon.
- Uri—Benzodiazepines; c.arb.
- 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— $\alpha$ -Tocoferol; c.subst.
- Pla—Ascorbat; c.subst.
- Pla—Calcediol; c.subst.
- Pla—Difosfat de tiamina; c.subst.
- Pla—Ercalcidiol; c.subst.
- Pla—Piridoxal-5'-fosfat; c.subst.
- Pla—Retinol; c.subst.
- San—Riboflavina; c.subst.

### **4.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'interacció hidrofílica**

La cromatografia líquida d'interacció hidrofílica o HILIC (acrònim de l'anglès *hydrophilic interaction liquid chromatography*), és una variant de la cromatografia en fase normal donat que s'empra una fase estacionària polar. La fase mòbil utilitzada és de naturalesa altament orgànica (> 60-70 %, generalment acetonitril) que conté baixes proporcions d'un dissolvent/tampó aquós o un altre dissolvent polar.

En aquest tipus de cromatografia, en una primera etapa, l'aigua de la fase mòbil forma una capa aquosa adsorbida en la superfície polar de la fase estacionària. Posteriorment, els analits es reparteixen entre aquesta capa d'aigua generada i la fase mòbil (repartiment hidrofílic) (Figura 7) (8-11). Tot i que, a data d'avui, no es coneix amb total certesa quin és el mecanisme de la cromatografia HILIC, sembla que existeixen altres processos de retenció addicionals (8-11):

- La formació d'enllaç d'hidrogen entre els grups funcionals polars i la fase estacionària.
- Interaccions electrostàtiques amb grups funcionals ionitzats.



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.

Bases nitrogenades nucleiques

- Pla—Bases nucleiques; taxon.
- Pla—Adenina; c.subst.
- Pla—Citosina; c.subst.
- Pla—Guanina; c.subst.
- Pla—Timina; c.subst.
- Pla—Uracil; c.subst.

Drogues d'abús

- Uri—Amfetamines; 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—Heparina; c.subst.
- 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 antibacterians

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

Fàrmacs antiepilèptics

- Pla—Carbamazepina; c.subst.
- Pla—Lamotrigina; c.subst.
- Pla—Fàrmacs antiepilèptics; c.subst.
- 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—Fàrmacs antineoplàsics; taxon.
- Pla—Gencitabina; c.subst.

Iminoglúcids

- Pla—1-Desoxinojirimicina; c.subst.
- Pla—2,5-didesoxi-2,5-imino-D-manitol; c.subst.
- Pla— $\alpha$ -Homonojirimicina; c.subst.
- Pla—Australina; c.subst.
- Pla—Calistegina; c.subst.
- Pla—Fagomina; c.subst.
- Pla—Iminoglúcids; taxon.
- Pla—Swainsonina; c.subst.

### Nucleòsids i desoxinucleòsids

- Pla—Adenosina; c.subst.
- Pla—Citidina; c.subst.
- Pla—Desoxiadenosina; c.subst.
- Pla—Desoxicitidina; c.subst.
- Pla—Desoxiguanosina; c.subst.
- Pla—Desoxinucleòsids; taxon.
- Pla—Desoxitimidina; c.subst.
- Pla—Desoxiuridina; c.subst.
- Pla—Guanosina; c.subst.
- Pla—Nucleòsids; taxon.
- Pla—Timidina; c.subst.
- Pla—Uridina; 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.

### Sacàrids prebiòtics

- Pla—1-Kestosa; c.subst.
- Pla—3-Galactosil-lactosa; c.subst.
- Pla—Oligosacàrids; taxon.
- Pla—Lactulosa; c.subst.
- Pla—Inulina; c.subst.

### Vitamines

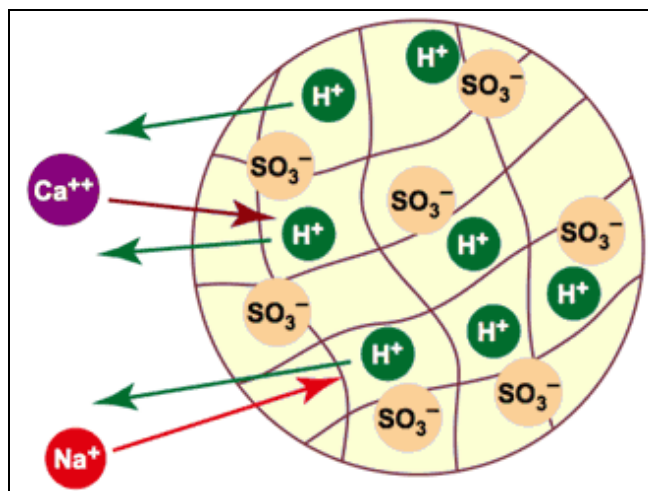
- Pla—Ascorbat; c.subst.
- Pla—Difosfat de tiamina; c.subst.
- Pla—Piridoxal-5'-fosfat; c.subst.
- San—Riboflavina; c.subst.

## 4.4. Cromatografia líquida d'alta eficàcia de bescanvi iònic

En l'HPLC de bescanvi iònic o iònica s'empra una resina de bescanvi iònic d'elevada massa molar i insoluble amb aigua com a fase estacionària, i una fase mòbil polar essencialment aquosa (2-7).

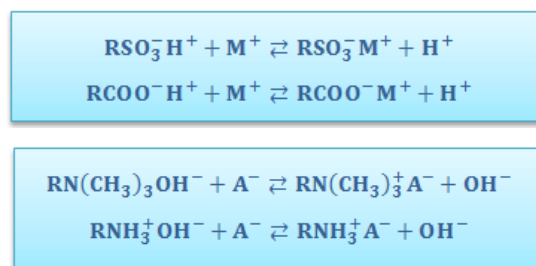
Els processos d'intercanvi iònic es basen en equilibris de bescanvi entre els ions d'una dissolució i els ions del mateix signe que es troben en la superfície de la resina —anomenats intercanviadors— (Figura 9) (2-7).

Els intercanviadors més comuns de les resines de bescanvi catiònic són els que presenten grups d'àcid sulfònic ( $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ ) —un àcid fort— o grups carboxílics ( $-\text{COO}^- \text{H}^+$ ) —un àcid dèbil—. Per contra, les resines de bescanvi aniònic contenen centres actius amb grups d'amina quaternària ( $-\text{NR}_3^+ \text{OH}^-$ ) —una base forta— o grups d'amina primària ( $-\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$ ) —una base dèbil—. Quan un intercanviador catiònic es posa en contacte amb un dissolvent aquós que conté els analits catiònics  $\text{M}^+$ , s'estableix un equilibri de bescanvi entre aquests analits  $\text{M}^+$  i els protons ( $\text{H}^+$ ) del grup àcid de la resina.



**Figura 9.** Processos de bescanvi iònic sobre la fase estacionària.

En el cas dels intercanviadors aniònics, l'equilibri s'estableix entre l'analit aniònic del dissolvent aquós ( $\text{M}^-$ ) i els ions hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) dels grups amina de la resina (2-7):



#### 4.4.1. Fase estacionària

Les fases estacionàries utilitzades en l'HPLC de bescanvi iònic poden classificar-se, segons la càrrega dels intercanviadors, en aniòniques o catiòniques. Les fases estacionàries més habitualment usades en l'HPLC iònica estan constituïdes per copolímers d'estirè-divinilbenzè sobre els quals s'enllacen els intercanviadors. També es troben amb certa freqüència altres copolímers com el polimetacrilat i el poliàcrilat-divinilbenzè. Actualment, estan prenent una major importància els intercanviadors d'ions sobre sòlids rígids, com són el cas de les sílices d'estructura controlada sobre les que s'enllacen els intercanviadors. Aquestes sílices ofereixen una gran resistència mecànica, una elevada uniformitat en la mida de les partícules i la possibilitat d'utilitzar partícules més petites. Tot i això, presenten com a principal inconvenient que la sílice és inestable a valors de pH extrems (especialment a pH bàsics), el que obliga a treballar a intervals de pH reduïts (2-7).

#### 4.4.2. Fase mòbil

Comunament, les fases mòbils utilitzades solen ser solucions aquoses que contenen baixes proporcions d'un dissolvent orgànic fort miscible en aigua (modificador orgànic), com per exemple, metanol.

En l'HPLC de bescanvi iònic, la fase mòbil presenta el paper principal durant la retenció de l'analit perquè permet controlar els equilibris existents entre l'analit i la fase estacionària. Existeixen tres propietats que poden afectar a la retenció d'un analit iònic sobre la fase estacionària: la força iònica, el pH i la proporció i el tipus de modificador orgànic utilitzat en la fase mòbil (2-7).

La força iònica està relacionada amb la concentració i la càrrega dels possibles contraions dissolts que puguin existir en la fase mòbil. Aquesta concentració de contraions influirà en

l'equilibri entre els intercanviadors de la superfície i l'analit, permetent que aquest sigui atret i desplaçat, alternativament, pels ions de la fase estacionària, durant el seu recorregut al llarg de la columna. Si la concentració dels contraions en la fase mòbil és massa elevada, l'analit no trobarà cap intercanviador disponible i no serà retingut. Per contra, si la concentració és massa baixa, l'analit serà més retingut pels intercanviadors i no serà s'eluirà (2-7).

El pH també juga un important paper en la separació perquè permet controlar el grau d'ionització de l'analit, modificant el seu equilibri àcid-bàsic dins de la fase mòbil. Com a norma general, per garantir la ionització de l'analit, si aquest és de naturalesa bàsica, el pH de la fase mòbil ha de ser dues unitats inferiors al seu  $pK_b$ , i dues unitats superior al seu  $pK_a$  si l'analit és de naturalesa àcida (2-7).

La utilització de modificadors orgànics, és necessària quan l'analit presenta, a més de la seva càrrega, propietats apolars prou significatives com per possibilitar que es produeixin fenòmens d'adsorció. En aquests casos, és necessari afegir a la fase mòbil petites proporcions d'un dissolvent orgànic miscible amb l'aigua, amb la finalitat de poder desfer les interaccions no iòniques que puguin tenir lloc (2-7).

#### 4.4.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic

Tot i que l'HPLC de bescanvi iònic pot ser utilitzada per a la separació, identificació i quantificació de components inorgànics i orgànics, en les ciències de laboratori clínic, són els components de naturalesa orgànica els que presenten un major nombre d'aplicacions. Les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant l'HPLC 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—Citrul·lina; c.subst.
- Uri—Citrul·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—Tryptòfan; c.subst.
- Uri—Tryptòfan; 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.

#### 4.5. Cromatografia líquida d'alta eficàcia d'exclusió molecular

En l'HPLC d'exclusió molecular, també anomenada de filtració en gel, la fase estacionària està composta per un material porós que permet la separació dels analits en funció de la seva mida o massa molar relativa. Aquest materials estan constituïts per petites partícules polimèriques o de sílice que contenen una xarxa uniforme de porus per les quals poden difondre els analits i la fase mòbil. Els analits amb una mida major que la mida mitjana de porus seran excloses i gairebé no seran retingudes, sent els primers en eluir. Per contra, els analits que tenen una mida significativament menor que la mida mitjana dels porus poden penetrar a través d'ells, ser "atrapats" durant més temps i eluir en darrer lloc. Entre aquests dos extrems, hi haurà analits amb una mida intermèdia on la seva penetració en el porus dependrà de la seva mida i del diàmetre del porus (2-7).

Aquest tipus de cromatografia difereix de les altres, en què no impliquen una interacció química o física entre els analits i la fase estacionària. De fet, es procura evitar aquest tipus d'interaccions atès que poden originar una disminució de l'eficàcia cromatogràfica.

##### 4.5.1. Fase estacionària

Les fases estacionàries utilitzades en l'HPLC d'exclusió molecular estan compostes per partícules inerts, resistents, estables químicament, amb porus uniformes i amb una mida compresa entre 5  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$ . Fonamentalment, existeixen dos tipus fases estacionàries: unes que contenen partícules polimèriques i unes altres que estan compostes per partícules de sílice. Les compostes per partícules de sílice tenen l'avantatge de presentar una elevada rigidesa —facilita l'empaquetament de les columnes—, una major estabilitat —permet l'ús d'una gran varietat de dissolvents, inclosa l'aigua—, i una bona estabilitat a elevades temperatures. Tot i això, tenen com a principals inconvenients, que les partícules de sílice poden retenir els analits per adsorció (2-7).

Inicialment, es feien servir copolímers d'estirè-divinilbenzè entrecruats amb una estructura química semblant als utilitzats en l'HPLC de bescanvi iònic. La mida de porus en aquests polímers es controlava a partir del grau d'entrellaçament entre les cadenes polimèriques, el qual depenia de la quantitat relativa de divinilbenzè addicionat. Aquestes eren hidrofòbiques i, conseqüentment, només podien utilitzar-se amb fases mòbils no aquoses. No obstant això, en l'actualitat, existeixen copolímers hidrofílics que fan possible l'ús de dissolvents aquosos. Aquests, principalment, estan constituïts per polímers d'estirè-divinilbenzè que presenten grups sulfònics, o polímers d'acrilamida. Per altra banda, les fases estacionàries que empen partícules de sílice



poroses tenen una mida mitjana de porus que oscil·la entre 40 Å i 2500 Å. Per tal de reduir el procés d'adsorció, les superfícies d'aquestes partícules són modificades fent-les reaccionar amb diferents tipus de molècules orgàniques (2-7).

#### 4.5.2. Fase mòbil

En l'HPLC d'exclusió molecular la fase mòbil actua únicament com a portador dels analits, donat que no intervé en el procés de separació. Per garantir la realització d'aquesta tasca, la fase mòbil ha de solubilitzar completament la mostra, no ha de dissoldre la fase estacionària i no ha de interaccionar ni amb l'analit ni amb la fase estacionària. Existeixen diversos dissolvents que poden complir aquestes propietats —p.ex. aigua amb diferents proporcions de dissolvents orgànics— però s'ha de tenir en compte amb quin tipus de fase estacionària es treballa, per tal de garantir que la seva utilització no interferirà en el procés de separació (2-7).

#### 4.5.3. Aplicacions en les ciències de laboratori clínic

Les principals propietats biològiques que poden ser mesurades o examinades mitjançant l'HPLC d'exclusió molecular són:

- LAm—Acetilcolinesterasa; c.cat.
- Pla—Acetilcolinesterasa; c.cat.
- Pla—Àcids orgànics; taxon.
- Pla—Angiotensina I; c.massa
- Pla—Angiotensina II; c.massa
- Pla—Araquidonat; c.subst.
- Pla—Capriat; c.subst.
- Pla—Eritropoetina; taxon.
- Uri—Eritropoetina; taxon.
- Pla—Eritropoetina; c.massa
- Uri—Eritropoetina; c.massa
- Pla—Linoleat; c.subst.

- Pla—Oleat; c.subst.
- Pla—Oxitocina; c.massa
- Pla—Palmitat; c.subst.
- Pla—Vasopressina; c.massa

### 5. Instrumentació de la cromatografia líquida d'alta eficàcia

Tot i que per a la cromatografia líquida únicament és necessari disposar, a més de la mostra, de les fases implicades en el procés cromatogràfic —la fase mòbil i la fase estacionària—, en l'HPLC degut al reduït diàmetre de les partícules de la fase estacionària que s'utilitza —entre 3 µm i 5 µm—, es requereixen fer servir diferents dispositius que permetin suportar elevades pressions —fins a 5000 psi ( $3,45 \cdot 10^7$  Pa, 345 bar o 340 atm)—. Aquests dispositius componen la instrumentació d'un procediment de mesura basat en l'HPLC, anomenat cromatògraf líquid d'alta eficàcia (Figura 10). Cal esmentar que, en l'actualitat, existeixen sistemes de mesura que permeten utilitzar fases estacionàries amb un diàmetre de partícula menor —entre 1,3 µm i 3,5 µm— que poden suportar pressions de fins 15000 psi ( $1,03 \cdot 10^8$  Pa, 1034 bar o 1021 atm). Aquests sistemes permeten, principalment, una millora de l'eficàcia i reduir considerablement els temps de separació cromatogràfica. A la cromatografia líquida que fa servir aquests sistemes de mesura se l'anomena cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UHPLC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) per diferenciar-la de l'HPLC (2-7, 12).

Els cromatògrafs líquids d'alta eficàcia presenten, bàsicament, els següents dispositius (2-7):

- Dispositius de subministrament i emmagatzematge de la fase mòbil.
- Dispositius de bombeig
- Dispositius d'injecció de la mostra
- Columnes
- Detectors

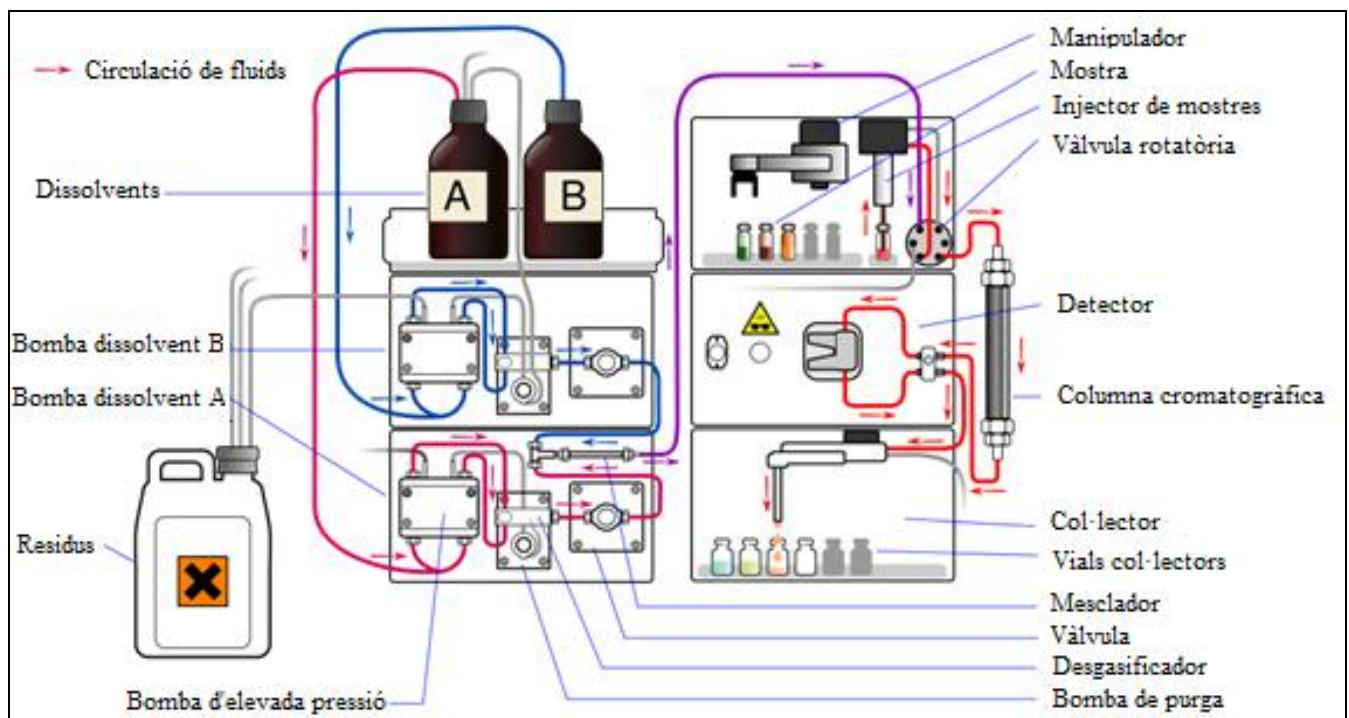


Figura 10. Esquema d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia.

### 5.1. Dispositius de subministrament i emmagatzematge de la fase mòbil

Els dispositius de subministrament i emmagatzematge de la fase mòbil garanteixen la disponibilitat de la fase mòbil al sistema de mesura cromatogràfic en unes condicions determinades tals, que permeten evitar la contaminació i la degradació de la mateixa.

La fase mòbil està formada per un dissolvent o per una barreja d'ells, cada un dels quals està contingut en un recipient, generalment de vidre. Els recipients han de disposar de taps que impedeixin la contaminació per gasos o partícules en suspensió presents en l'aire. Per altra banda, els recipients sovint estan connectats a dispositius, anomenats *desgasificadors*, que permeten eliminar els gasos dissolts —en general oxigen i nitrogen— que poden interferir formant bombolles en els detectors. Un desgasificador pot consistir en un dispositiu de bombeig per buit (bomba de purga), un dispositiu de destil·lació, dispositius per escalfar i agitar els dissolvents o, dispositius de difusió que permeten arrossegar els gasos dissolts fora de la solució fent fluir un gas inert de baixa solubilitat. Sovint els desgasificadors també contenen altres components que permeten la filtració de pols i altres partícules sòlides en suspensió que puguin existir en els dissolvents. Cal esmentar que no tots els cromatògrafs presenten desgasificadors, motiu pel qual el propi usuari és qui ha de dur a terme el tractament previ dels dissolvents abans de fer-los servir. Aquest tractament, que permet eliminar els gasos a més de la matèria en suspensió, consisteix en filtrar els dissolvents emprant filtres amb una mida de porus molt petit —habitualment de 0,2  $\mu\text{m}$ — mitjançant un dispositiu de buit (2-7).

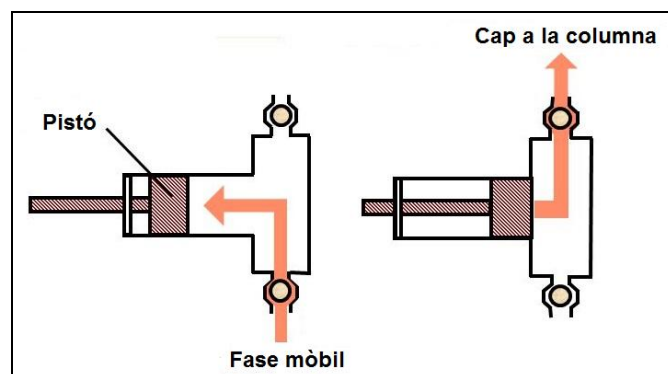
En l'HPLC s'empren diferents modalitats d'elució de la fase mòbil en funció del nombre de dissolvents emprats i de com varia la composició de cada un d'ells amb el temps. La modalitat d'elució que utilitza un únic dissolvent o bé una mescla de dissolvents on la seva composició roman constant durant tot el procés cromatogràfic s'anomena *elució isocràtica* (1). Per altra banda, la modalitat d'elució que fa servir dos o més dissolvents i a on la composició d'un o varis d'ells canvia contínuament o en diferent etapes durant el procés cromatogràfic, s'anomena *elució en gradient*. Sovint, el cromatògraf està equipat amb uns dispositius, anomenats *mescladors*, que permeten introduir els dissolvents des de dos o més recipients en una càmera de mescla i controlar el flux i la composició dels dissolvents al llarg del procés cromatogràfic (2-7).

### 5.2. Dispositius de bombeig

La finalitat dels dispositius de bombeig d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia és la de subministrar un flux constant de fase mòbil a través de la fase estacionària. Addicionalment, aquests dispositius han de ser capaços de poder gestionar elevades pressions, mantenir fluxos lliure de polsos, proporcionar fluxos constants i reproduïbles, permetre canvis de dissolvents, permetre variar la composició dels dissolvents, així com ser químicament inerts i resistents a la corrosió (2-7).

Els sistemes de bombeig més utilitzats són les bombes recíproques, les bombes de xeringa o de desplaçament i les bombes neumàtiques o de pressió constant, sent les recíproques les més àmpliament utilitzades. Aquestes consisteixen en una petita cambra en la qual el dissolvent és impulsat pel moviment de vaivé d'un pistó accionat per un motor. L'entrada i la sortida

del dissolvent es regula mitjançant dues vàlvules antiretorn que s'obren i tanquen alternativament, permetent el pas del dissolvent en un sol sentit (Figura 11) (2-7).



**Figura 11.** Esquema de funcionament d'una bomba recíproca d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia.

### 5.3. Dispositius d'injecció de la mostra

Per poder obtenir injeccions reproduïbles quan s'injecten petits volums de mostra —entre 1  $\mu\text{L}$  i 500  $\mu\text{L}$ — així com per pertorbar el mínim possible el règim de circulació de la fase mòbil, els dispositius d'injecció han d'estar ubicats el més a prop possible de l'entrada de la columna i permetre realitzar injeccions el més aviat possible.

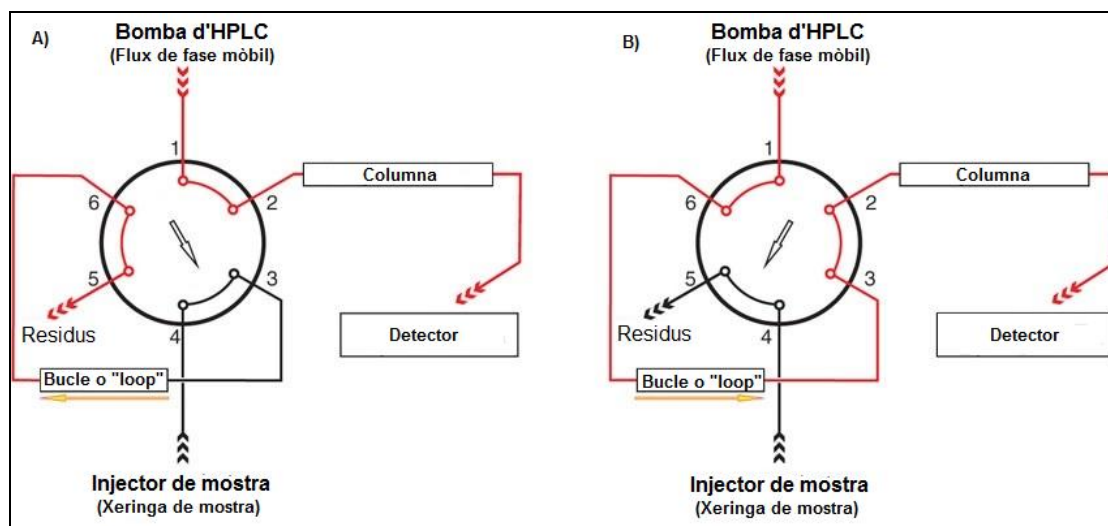
Habitualment, els dispositius d'injecció estan format per un injector de mostres (xeringa de mostra), un bucle o "loop" i una vàlvula rotatòria d'alta pressió de diverses vies —normalment de 6 vies— (Figura 12). La vàlvula rotatòria consta d'un doble circuit podent intercanviar-se de forma ràpida i simple, en funció de quina sigui la seva funció a realitzar: aspiració de la mostra (posició de càrrega) o injecció de la mostra (posició d'injecció). Quan la vàlvula en troba en la posició de càrrega (Figura 12A), la fase mòbil passa de la bomba d'HPLC a la columna i d'aquesta al detector mentre que la mostra s'injecta en un altre circuit que inclou el bucle. Per contra, quan la vàlvula gira cap a la posició d'injecció (Figura 12B), la fase mòbil arrossega la mostra ubicada al bucle cap a la columna i, posteriorment, al detector. L'objectiu d'utilitzar aquest tipus de vàlvules és de no interrompre el flux de fase mòbil a través de la columna i introduir, en el flux de la mateixa, un volum de mostra fix (el contingut en el bucle) (2-7).

### 5.4. Columnes

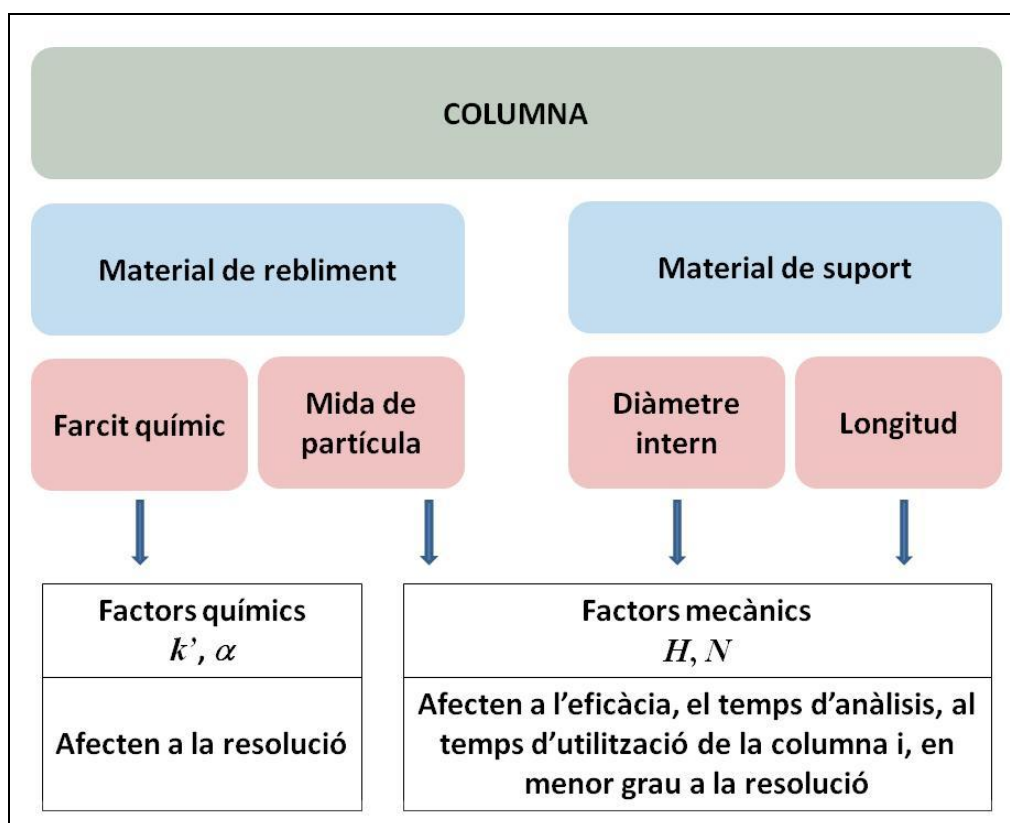
La columna és el dispositiu essencial d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia donat que en ella es troba la fase estacionària i, conseqüentment, és on tindrà lloc el procés fisicoquímic de separació.

Les columnes d'HPLC consten de dues parts, el material de rebliment de la columna i el seu suport (Figura 13). El suport està constituït per materials —habitualment acer inoxidable— que permeten suportar elevades pressions i que són químicament resistents a la fase mòbil. Respecte al material de rebliment, aquest s'ha d'escollir atenent a la naturalesa fisicoquímica de l'analit i al tipus de separació cromatogràfica que es vulgui realitzar (2-7).

Existeixen diverses propietats d'una columna que influeixen en una separació cromatogràfica: el farcit químic, la mida de partícula, el diàmetre intern i la longitud (Figura 13).



**Figura 12.** Dispositiu d'injecció d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia amb una vàlvula de 6 vies: A) en posició de càrrega de mostra, B) en posició d'injecció.



**Figura 13.** Components d'una columna i les seves propietats que poden afectar a la separació cromatogràfica.  $k'$ , factor de retenció;  $\alpha$ , factor de separació;  $N$ , nombre de plats teòrics.

Moltes vegades, per allargar el temps d'utilització útil de la columna, es col·loca davant d'ella una *precolumna* la qual permet eliminar els contaminants dels dissolvents i la matèria en suspensió que poden existir en la fase mòbil. A més, la precolumna permet saturar la fase estacionària amb la fase mòbil i poder minimitzar la seva degradació. La composició de les precolumnes sol ser semblant a la de les columnes encara que amb un diàmetre de partícula més gran per tal d'evitar la pèrdua de pressió del sistema.

#### 5.4.1. Farcit químic

El farcits emprats en les columnes d'HPLC han de ser químicament inerts —excepte a la seva superfície en alguns

casos—, mecànicament resistents i tenir una mida de partícula ben definit. Habitualment estan formats per partícules esfèriques microporoses de sílice d'elevada puresa, permeables al dissolvent i amb una elevada àrea superficial. També es solen emprar farcits d'alúmina o materials polimèrics sintètics (2-7).

El farcit pot no intervenir durant el procés de separació o, convenientment tractat i com sol ser habitual, pot intervenir-ne directament. Tal com s'ha esmentat, atenent a la naturalesa fisicoquímica de l'analit i al tipus de separació que es vulgui realitzar s'ha d'escollir un tipus de farcit o un altre (vegeu els apartats 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1 i 4.5.1 d'aquest document) (2-7).

#### 5.4.2. Mida de la partícula

La mida de la partícula està directament relacionada amb l'alçada del plat teòric,  $H$  (i inversament amb el nombre de plats teòrics,  $N$ ) i, conseqüentment, amb l'eficàcia cromatogràfica (vegeu l'equació de Van Deemter modificada a l'apartat 3.3).

Les columnes amb una mida de partícula compresa entre 3  $\mu\text{m}$  i 5  $\mu\text{m}$  són les més àmpliament utilitzades en l'HPLC. Partícules amb una menor mida  $< 3 \mu\text{m}$  ofereixen una major superfície, un increment de l'eficàcia i resolució cromatogràfiques i un menor temps d'anàlisi. No obstant, donen lloc a un augment considerable de la pressió —no tolerat pels sistemes de mesura basats en l'HPLC—, fent necessari utilitzar sistemes que permetin suportar aquestes pressions, com els basats en la UHPLC (2-7).

#### 5.4.3. Diàmetre intern

El diàmetre intern de la columna està directament relacionat amb el flux de la fase mòbil i determina la quantitat de mostra que pot ser injectada dins de la columna sense saturar-la. Si s'empra una columna amb un diàmetre intern elevat, majors quantitats de mostra es podran introduir però provocarà una ràpida saturació de la columna disminuint la seva eficàcia cromatogràfica. A més, s'haurà de fer servir un major flux de la fase mòbil —per tal que es pugui mantenir el cabal (flux per unitat de superfície) constant— el qual donarà lloc a una dilució de la mostra, suposant una pèrdua de la capacitat de detecció del sistema cromatogràfic (2-7).

En general, les columnes d'HPLC amb un diàmetre intern comprès entre 5 mm i 10 mm es solen emprar per l'aïllament i purificació de compostos (columnes preparatives), mentre que les que presenten valors entre 3 mm i 5 mm són utilitzades per a la identificació i quantificació de compostos (columnes analítiques). Per altra banda, les columnes d'UHPLC solen presentar uns valors de diàmetre intern inferiors a 3 mm i proporcionen una major capacitat de detecció al sistema cromatogràfic, fent-les ideals per treballar en detectors com els espectròmetres de masses (2-7).

#### 5.4.4. Longitud

Com es pot comprovar en les equacions de l'eficàcia cromatogràfica (vegeu l'apartat 3.3 d'aquest document), l'eficàcia d'una columna depèn, entre d'altres factors, de la seva longitud. Així, si es mantenen constants els altres factors que poden afectar a l'eficàcia, la utilització d'una columna amb una major longitud donarà lloc a un increment de l'eficàcia cromatogràfica. Malgrat això, un augment de la longitud de la columna incrementarà, per una banda, el temps d'anàlisi necessari per dur a terme la separació dels components i, per una altra, la seva pressió a l'entrada accelerant el seu deteriorament.

Les columnes emprades en l'HPLC solen presentar una longitud que oscil·la entre els 5 cm i 30 cm (2-7).

### 5.5. Detectors

Un detector cromatogràfic és un dispositiu que permet mesurar, a la sortida de la columna, una propietat física o química de l'eluent la qual està relacionada amb la concentració de l'anàlit.

Idealment, els detectors cromatogràfics haurien de presentar les següents propietats (2-7):

- Han de presentar una elevada sensibilitat (metrològica) per als analits.
- El seus senyals i derives han de ser mínims en absència dels analits.
- Els senyals dels analits han de ser estables i reproduïbles al llarg del temps.
- Han de presentar una elevada capacitat de detecció.
- Han de presentar intervals de mesura amplis.

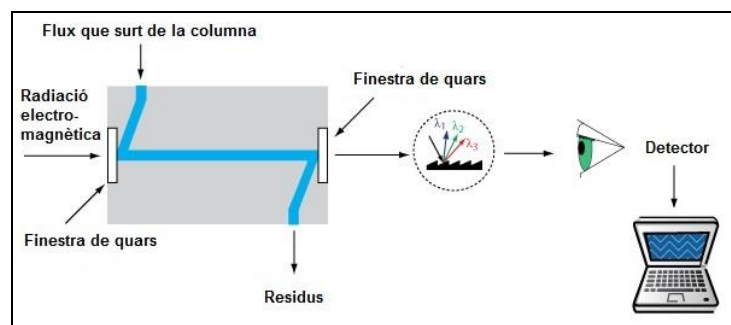
- Han de presentar una resposta lineal entre els seus senyals i la concentració dels analits.
- Han de presentar curts temps de resposta, és a dir, han de ser capaços de detectar precoçment petites variacions en la concentració de l'anàlit.
- La seva presència no ha d'afectar al procés cromatogràfic.
- Han de ser selectius, és a dir, han de poder diferenciar distints tipus d'analits.

Els detectors emprats en l'HPLC s'han dissenyat, adaptat i perfeccionat per tal d'incorporar cel·les de flux que permetin mesurar les baixes concentracions d'anàlit existents en la fase mòbil. Existeixen dos tipus diferents de detectors d'HPLC: els *detectors basats en una propietat de la dissolució* (fase mòbil), els quals responen a una propietat de la fase mòbil —p.ex.: l'índex de refracció i la conductivitat— que es veu modificada per la presència de l'anàlit; i els *detectors basats en una propietat del solut* (anàlit), que responen de manera directa a una propietat de l'anàlit —p.ex.: l'absorció molecular, la fluorescència, el potencial electroquímic i la massa—.

#### 5.5.1. Detectors d'absorció molecular

Els detectors d'absorció molecular —detectors que es basen en una propietat del solut— es fonamenten en el fenomen d'absorció que té lloc quan es fa interaccionar radiació electromagnètica —principalment a la zona del visible i de l'ultraviolat— sobre la matèria. Aquests tipus de detectors són els més àmpliament utilitzats en l'HPLC degut a que permeten detectar multitud d'analits, tenen amplis intervals de mesura lineals, són de fàcil maneig i el seu cost és relativament baix i (2-7).

En aquests detectors, el flux de líquid que surt de la columna passa a través d'una petita cel·la —d'una capacitat de volum entre 1  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$ — on es fa incidir radiació electromagnètica (Figura 14). La mesura de l'absorbància del líquid que la travessa en funció del temps constitueix el cromatograma.



**Figura 14.** Esquema de funcionament d'una cel·la de flux d'un detector d'absorció molecular.

Existeixen diferents tipus de detectors d'absorció molecular (2-7):

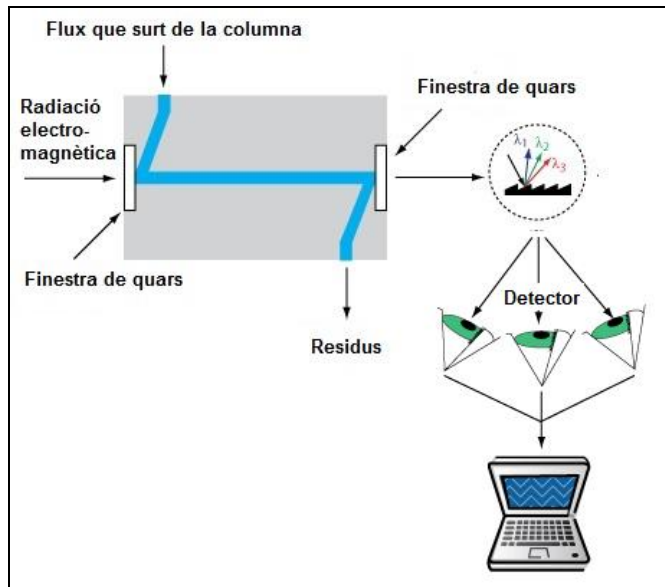
- De longitud d'ona fixa. Aquests detectors són els més simples i consten d'una làmpada de mercuri a baixa pressió, que emet una radiació monocromàtica de 254 nm.
- De longitud d'ona variable. Aquests detectors són més versàtils que els de longitud d'ona fixa. Constent d'una làmpada de deuteri, xenó o wolframi que permeten treballar en un interval de longitud d'ona compresos entre 190 nm i 650 nm, i un monocromador, amb el qual es pot escollir una longitud de treball determinada.
- De matriu de díodes o PAD (acrònim de l'anglès photoarray detector). Aquests detectors són els més moderns, versàtils i ràpids de tots. Constent d'una sèrie de díodes alineats entre sí que permeten realitzar un escaneig a distintes longituds d'ona per a cada un dels components de la mostra.



### 5.5.2. Detectors de fluorescència

Els detectors de fluorescència —detectors que es basen en una propietat del solut— es fonamenten en la propietat de diferents compostos per emetre fluorescència, és a dir, aquells compostos que s'exciten amb una radiació electromagnètica a una longitud d'ona determinada i emeten radiació a una longitud d'ona diferent a de l'excitació. La radiació emesa es mesura en direcció perpendicular a la d'excitació per evitar interferències relacionades amb el fenomen d'absorció. Aquest tipus de detectors també són bastant emprats en l'HPLC degut a la seva sensibilitat, selectivitat i capacitat de detecció. La seva selectivitat rau en què són pocs els compostos que són capaços d'emetre fluorescència per sí mateixos. Tot i això, és habitual fer reaccionar els analits de la mostres amb compostos fluorescents (reacció de derivatització), per aconseguir fer-los fluorescentment actius (2-7).

En aquests detectors, el flux de líquid que surt de la columna passa a través d'una petita cel·la —d'una capacitat de volum entre 1  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$ — on es fa incidir radiació electromagnètica per a l'excitació dels components de la mostra. Posteriorment, es mesura la seva radiació emesa en una direcció perpendicular al feix de radiació incident (Figura 15). Aquesta mesura en funció del temps constitueix el cromatograma (2-7).



**Figura 15.** Esquema de funcionament d'una cel·la de flux d'un detector de fluorescència.

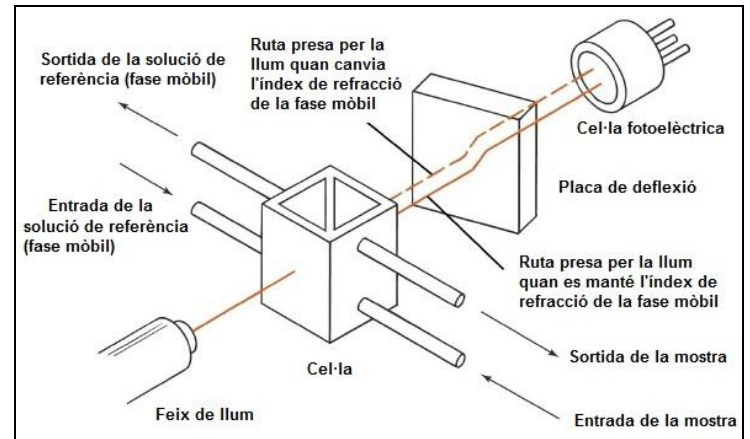
Els detectors de fluorescència més senzills empen una font d'excitació de mercuri i un o més filtres per aïllar la radiació fluorescent (emesa). Els instruments més sofisticats consisteixen en una font de radiació de xenó i empen un monocromador de xarxa per aïllar la radiació fluorescent (2-7).

### 5.5.3. Detectors d'índex de refracció

Els detectors d'índex de refracció —detectors que es basen en una propietat de la dissolució— es fonamenten en el canvi en l'índex de refracció que una dissolució (fase mòbil) experimenta com a conseqüència de la presència de diferents soluts (analits) en ella. Aquests detectors són considerats "universals" donat que l'índex de refracció és una propietat física que presenten tots els compostos en solució (solut). Els valors dels seus senyals varien considerablement amb la temperatura i amb la composició de la fase mòbil, fent que siguin detectors poc sensibles i amb una reduïda capacitat de detecció (2-7).

Aquest tipus de detectors consten d'una cubeta —d'una capacitat de volum entre 1  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$ — amb dos compartiments

separats per una placa de vidre, per un dels quals només passa la fase mòbil, com a dissolvent de referència, i per l'altre passa l'eluat que abandona la columna (fase mòbil amb els analits). Sobre la cubeta s'irradia un feix de llum el qual és desviat quan les dues solucions presenten un índex de refracció diferent. El desplaçament del feix de llum és captat per una placa de deflexió i conduïda a una cel·la fotoelèctrica (Figura 16). La mesura dels canvis de llum detectada a la cel·la en funció del temps constitueix el cromatograma (2-7).

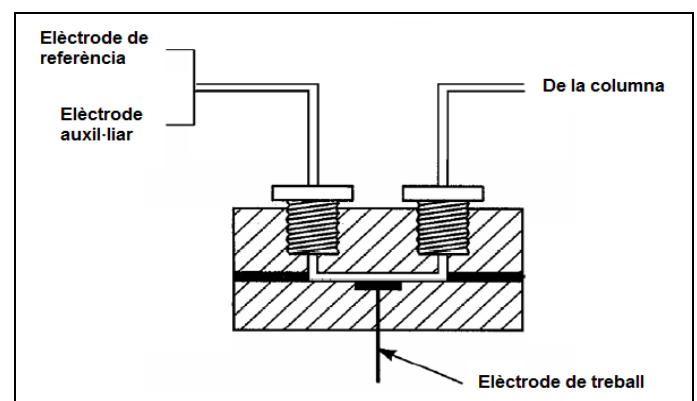


**Figura 16.** Esquema de funcionament d'una cel·la de flux d'un detector d'índex de refracció.

### 5.5.4. Detectors electroquímics

En l'actualitat existeixen 4 tipus de detectors electroquímics, els amperomètrics, voltamperomètrics —detectors que es basen en una propietat del solut—, i els coulombimètrics i conductimètrics —detectors que es basen en una propietat del dissolvent—. El més àmpliament emprats són els amperomètrics i els conductimètrics (2-7).

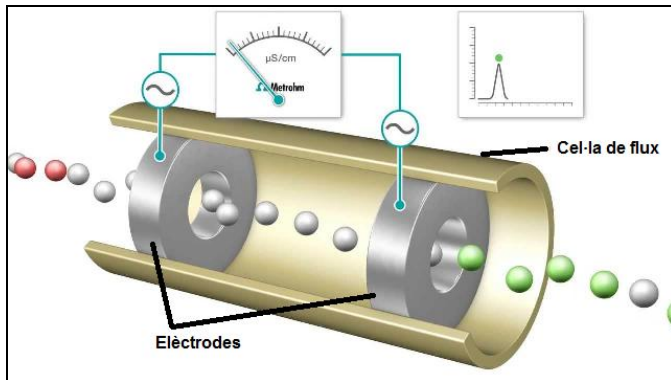
Els detectors amperomètrics es fonamenten en l'oxidació o la reducció de diferents compostos en un elèctrode de treball i en la intensitat de corrent generada com a conseqüència de seva reacció d'òxid-reducció (redox). Aquest tipus de detectors consten d'una cubeta —d'una capacitat de volum entre 1  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$ — i diferents elèctrodes (de referència, de treball i auxiliar). Després d'aplicar un potencial constant entre l'elèctrode de treball i el de referència, el qual desencadena la reacció redox, es mesura la intensitat de la corrent que es va generant entre l'elèctrode de treball i un elèctrode auxiliar, a mesura que avança la reacció (Figura 17). La intensitat de corrent generada en funció del temps constitueix el cromatograma. La seva aplicabilitat en l'HPLC és molt inferior a la de la resta de detectors però presenten com a principals avantatges la seva elevada sensibilitat i capacitat de detecció (2-7).



**Figura 17.** Esquema de funcionament d'una cel·la de flux d'un detector amperomètric.



Els detectors conductimètrics es fonamenten en el canvi de conductivitat que experimenta una dissolució (fase mòbil) com a conseqüència de la presència de diferents soluts (analits). Aquest tipus de detectors consten d'una cubeta —d'una capacitat de volum entre 1  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$ — i dos elèctrodes. S'aplica un potencial constant entre els elèctrodes i es mesura la intensitat de corrent deguda a la resistència que els analits exerceixen sobre la fase mòbil. Els canvis en la intensitat de corrent en funció del temps constitueix el cromatograma (Figura 18). Aquests detectors tenen com avantatge principal que presenten un interval de mesura lineal ampli i, com a inconvenient, que són molt sensibles a petites variacions de la temperatura. Són els detectors més àmpliament utilitzats en l'HPLC de bescanvi iònic (2-7).



**Figura 18.** Esquema de funcionament d'una cel·la de flux d'un detector conductimètric.

#### 5.5.5. Espectròmetres de masses<sup>2</sup>

Més que un detector pròpiament dit d'HPLC, els espectròmetres de masses són *per se* uns instruments de mesura que permeten, a partir del mesurament de magnituds bàsiques com la càrrega i la massa, separar, aïllar, identificar i quantificar de manera inequívoca els diferents components d'una mostra. De fet, la seva elevada especificitat intrínseca i capacitat d'anàlisi de mescules complexes que presenta fa que siguin considerablement superiors a la resta de detectors d'HPLC existents en l'actualitat. El seu principal avantatge sobre la resta de detectors és, d'una banda, la seva capacitat per subministrar informació útil des d'un punt de vista identificatiu, de manera que un espectre de masses es presenta com una prova gairebé inequívoca de la identitat d'un component i, d'altra banda, es tracta d'un detector universal donat que es basa en la separació de components d'acord amb la seva relació massa/càrrega, propietats que presenten tots els compostos (3, 13).

## 6. Bibliografia

- (1) International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl Chem* 1993;65:819-72.
- (2) Rigo Bonnin R. La cromatografia com a principi de mesura: classificació, fonaments teòrics i aplicació en les ciències de laboratori clínic. *In vitro veritas* 2013;14:80-103.
- (3) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2001.
- (4) Miller JM. Chromatography: concepts and contrasts. New Jersey: Miller; 2009.
- (5) Heftmann E. Chromatography. Amsterdam: Elsevier; 2004.
- (6) Brown PR. High-performance liquid chromatography: past developments, present status, and future trends. *Anal Chem* 1990;62:995A-1008A.
- (7) Lough WJ, Wainer IW. High-performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. Londres: Blackie Academic & Professional; 1995.
- (8) Alpert AJ. Hydrophilic-Interaction chromatography for the separation of peptides nucleic-acids and other polar compounds. *J Chromatogr A* 1990;499:177-96.
- (9) Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – A powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:231-47.
- (10) Greco G, Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *J Chromatogr Sci* 2013;51:1-10.
- (11) García-Sarrió MJ, Rodríguez-Sánchez S, Martín-Ortiz A. Análisis de carbohidratos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). *CTA* 2014;35:47-58.
- (12) Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, Ozkan SA. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatograph* 2013;76:1365-1427.
- (13) Rigo Bonnin R. L'espectrometria de masses com a principi de mesura: fonaments i aplicació en les ciències de laboratori clínic. *In vitro veritas* 2013;14:161-83.

<sup>2</sup> Donades les característiques pròpies que presenta l'espectrometria de masses i que l'objectiu d'aquesta revisió és l'HPLC, no es descriu en detall aquest principi de mesura. Es pot trobar una àmplia revisió sobre l'espectrometria de masses a l'article "L'espectrometria de masses com a principi de mesura: fonaments i aplicació en les ciències de laboratori clínic" (13).