



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 2 —Desenvolupament de procediments de mesura

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. Vocabulari
3. Objecte i camp d'aplicació
4. Desenvolupament de procediments de mesura
  - 4.1. Recollida d'informació relacionada amb l'analit
  - 4.2. Establiment dels objectius del procediment de mesura cromatogràfic
  - 4.3. Recerca bibliogràfica
  - 4.4. Tractament o preparació de la mostra
    - 4.4.1. Filtració
    - 4.4.2. Centrifugació
    - 4.4.3. Dilució i injecció
    - 4.4.4. Precipitació de proteïnes
    - 4.4.5. Extracció líquid-líquid
    - 4.4.6. Extracció en fase sòlida
  - 4.5. Selecció de la fase mòbil
  - 4.6. Elecció del tipus de cromatografia líquida i modalitat de treball
  - 4.7. Posada a punt del procediment cromatogràfic i optimització de la separació cromatogràfica
    - 4.7.1. Selecció de la fase mòbil
    - 4.7.2. pH de la fase mòbil
    - 4.7.3. Modalitat d'elució de la fase mòbil
    - 4.7.4. Temperatura de la fase mòbil
    - 4.7.5. Selecció de la fase estacionària. Columna analítica
  - 4.8. Validació de procediments de mesura cromatogràfics
5. Bibliografia

## 1. Introducció

Com a conseqüència de l'elevada capacitat per separar, aïllar, identificar i quantificar que presenta la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (*acrònim de l'anglès high-performance liquid chromatography*), els procediments i sistemes de mesura basats en aquest principi porten anys aplicant-se en els centres d'investigació, la indústria farmacèutica i diverses empreses del diagnòstic *in vitro* per al desenvolupament de nous fàrmacs o per a la identificació o mesurament de noves propietats biològiques. En canvi, en els laboratoris clínics, són pocs els procediments de mesura basats en l'HPLC (d'ara endavant, procediments cromatogràfics) que són utilitzats en l'actualitat, a causa, principalment, de la manca d'automatització dels processos que aquests requereixen (preparació de reactius, tractament de la mostres, interpretació de la informació obtinguda, entre d'altres) i a la necessitat de precisar de personal qualificat per al seu maneig.

Actualment, per a diverses magnituds biològiques, hi ha un nombre reduït d'empreses que han desenvolupat procediments cromatogràfics per al diagnòstic *in vitro* i amb la marca "CE", obligant als laboratoris clínics a tenir-los que desenvolupar i validar (1-4).

## 2. Vocabulari

En aquest document són aplicables els termes generals, cromatogràfics o químics de la Federació Internacional de Química Pura i Aplicada i del Vocabulari Internacional de Metrologia (5-8):

**alçada de plat (teòric):** longitud de la columna dividida pel nombre de plats (teòrics)

**analit:** component d'una mostra que es vol separar i quantificar

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

**constant d'acidesa:** constant d'equilibri,  $K_a$ , que expressa la dissociació n-èssima d'un àcid carregat o no

NOTA: Es sol expressar com  $pK_a$ , és a dir, el logaritme decimal de la constant d'acidesa  $K_a$ .

**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

**cromatografia líquida:** cromatografia on la fase mòbil és un líquid i la fase estacionària un sòlid o un líquid adsorbit sobre una superfície sòlida

**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'empra per designar un cromatògraf.

**detector:** dispositiu o substància que indica la presència d'un fenomen, cos o substància quan s'excedeix un valor llindar d'una magnitud associada

**eficàcia:** grau d'eixamplament d'un pic cromatogràfic com a conseqüència del seu moviment a través de la columna

NOTA: L'eficàcia depèn de la resolució i del nombre de plats (teòrics), l'alçada del plat (teòric) i la longitud de la columna.

**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 diferent passos durant el procés cromatogràfic

**factor de retenció:** valor 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 mateix (*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 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

**Instrument de mesura:** dispositiu emprat per efectuar mesures sol o associat a un o diversos dispositius annexes

**magnitud:** propietat d'un fenomen, d'un cos o d'una substància, que es pot expressar quantitativament mitjançant un número i una referència

**massa molar relativa:** quocient entre la massa molecular i la unitat de massa atòmica unificada

NOTA: Aquest terme també es anomena pes molecular o massa molecular relativa.

**mètode de mesura:** descripció genèrica de l'organització lògica de les operacions emprades en una mesura

**mesura:** procés per a obtenir experimentalment un o més valors que es poden atribuir de forma raonable a una magnitud

**mesurand:** magnitud que es vol mesurar

**nombre de plats (teòric):** nombre que indica les prestacions i eficàcia d'una columna

NOTA: 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.

**pH:** magnitud de dimensió 1 utilitzada per expressar la concentració de l'ió hidrogen ( $H^+$ ) en una solució aquosa diluïda, on  $pH = -\log [H^+]$

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

**principi de mesura:** fenomen que serveix com a base d'una mesura

**procediment de mesura:** descripció detallada d'una mesura d'acord amb un o més principis de mesura i a un mètode de mesura determinat, fonamentat en un model de mesura i incloent tot el càlcul destinat a obtenir un resultat de mesura

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

**selectivitat:** característica d'un sistema de mesura, emprant un procediment de mesura determinat, gràcies a la qual el sistema subministra valors mesurats, per a un o més mesurands, de manera que els valors de cada mesurand són independents d'altres mesurands o altres magnituds del fenomen, cos o substància que s'investiga

**sistema de mesura:** conjunt d'un o més instruments de mesura i sovint d'altres dispositius, incloent qualsevol reactiu i subministrament, acoblats i adaptats per donar informacions destinades a obtenir valors mesurats en intervals especificats per a magnituds d'un tipus determinat

NOTA: Un sistema de mesura pot consistir en un únic instrument de mesura.

**solubilitat:** composició analítica d'una solució saturada, expressada en termes de la proporció d'un solut en un dissolvent designat. La solubilitat pot ser expressada com una concentració, molalitat, fracció molar, relació molar, etc

**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 Federació Internacional de Química Pura i Aplicada (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

**unitat de massa atòmica unificada:** unitat no SI de massa (igual a la constant de massa atòmica), definida com la dotzena part de la massa d'un àtom de carboni 12 i usada per expressar les masses de les partícules atòmiques,  $1,660 \cdot 10^{-27}$  kg

**validació:** verificació en la que els requisits especificats són adequats per a un ús determinat

**verificació:** provisió de proves objectives que una entitat donada satisfà uns requisits determinats

### 3. Objecte i camp d'aplicació

L'objecte d'aquest document és descriure el procés que haurien de realitzar els laboratoris clínics per al desenvolupament de procediments de mesura basats en l'HPLC.

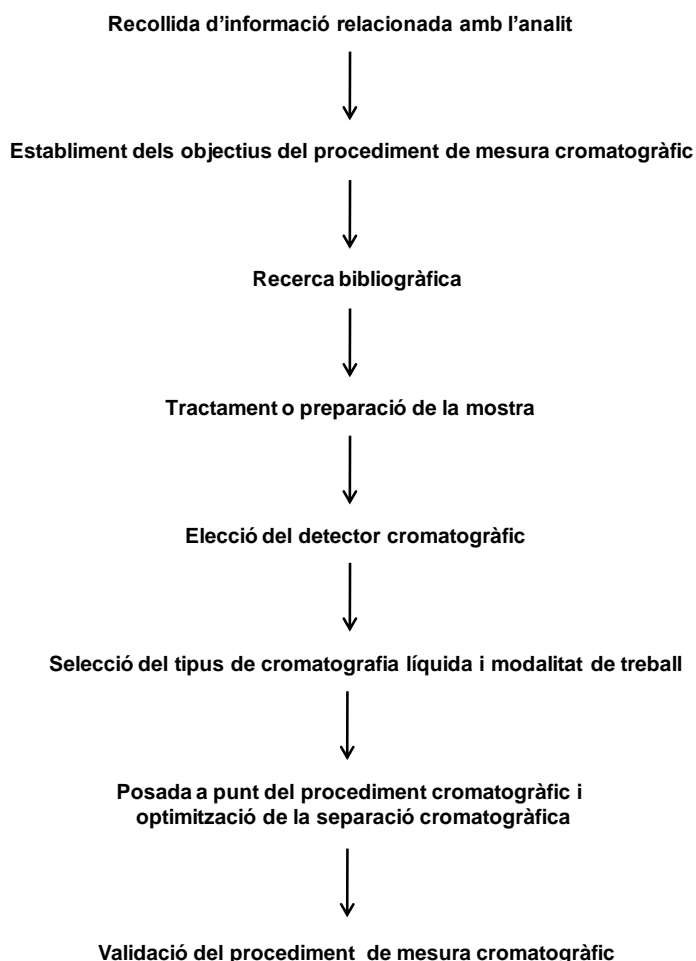
El camp d'aplicació d'aquest document abasta als procediments cromatogràfics que permeten el mesurament de propietats biològiques corresponents, fonamentalment, a escales racionals i ordinals i que utilitzen, com a principis de mesura, l'HPLC acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular (a l'ultraviolat o al visible), l'HPLC acoblada a la fluorimetria, l'HPLC acoblada a la voltamperometria, l'HPLC a la conductimetria, l'HPLC acoblada a la refractometria, l'HPLC a l'espectrometria de masses o MS (acrònim de l'anglès *mass spectrometry*) (HPLC-MS) o l'HPLC acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS).

### 4. Desenvolupament de procediments de mesura cromatogràfics

Idealment, un procediment cromatogràfic ha de presentar una separació, eficàcia i resolució cromatogràfiques adequades, unes

apropiades propietats metroloègiques (imprecisió, biaix, capacitat de detecció, entre altres), un temps d'anàlisi el més reduït possible, permetre treballar a pressions adequades, consumir la menor quantitat de dissolvent possible per tal de poder minimitzar costos, entre d'altres.

Existeixen diferents aspectes a considerar en el desenvolupament d'un procediment cromatogràfic que van des de la recollida d'informació relacionada amb l'analít o els analítics a estudiar, fins a la validació del procediment cromatogràfic (Figura 1) (9-21).



**Figura 1.** Descripció dels aspectes a considerar per al desenvolupament d'un procediment cromatogràfic.

#### 4.1. Recollida d'informació relacionada amb l'analít

El primer aspecte a considerar en el desenvolupament d'un procediment cromatogràfic és recollir tota la informació relacionada amb l'analít en estudi com l'estructura química, la massa molar relativa (també anomenat pel terme no recomanat, *pes molecular*), la polaritat ( $P$  o  $\log P$ ), la solubilitat, la constant d'acidesa ( $pK_a$ ), entre altres. Existeixen diversos recursos d'Internet (webs) que permeten conèixer les principals propietats fisicoquímiques d'un analít. En són un exemple:

- La base de dades *PubChem* de l'Institut Nacional de la Salut dels Estats Units: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- La base de dades *ChemSpider* de la Reial Societat de Química: <http://www.chemspider.com/>
- La base de dades *ChEMBL* de l'Institut Europeu de Bioinformàtica: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
- La base de dades *ChEBI* de l'Institut Europeu de Bioinformàtica: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/downloadsForward.do>

- La base de dades *ZINC* de la Universitat de Califòrnia, San Francisco, Estats Units: <http://zinc.docking.org/>
- La base de dades de fàrmacs *Drug bank*: <http://www.drugbank.ca/>
- La base de dades de fàrmacs *ACToR* de l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units: <http://actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp>

La informació de les propietats fisicoquímiques de l'analit és de valuosa importància per a l'elecció del tipus i la modalitat de cromatografia líquida a emprar, la selecció de les condicions cromatogràfiques a utilitzar i el tipus de detector a fer servir (9-21).

#### 4.2. Establiment dels objectius del procediment de mesura cromatogràfic

Abans de desenvolupar un procediment cromatogràfic, el laboratori clínic ha d'establir quins són els objectius principals del mateix, per tal de decidir el tipus i la modalitat cromatogràfica i el sistema cromatogràfic que es farà servir. De fet, en funció de quins siguin aquests objectius, el procediment a desenvolupar serà més o menys complex o laboriós.

Així, el laboratori clínic ha de considerar els següents aspectes (9-14):

- Si el procediment serà emprat per estudiar analits no desitjats (impureses), per a la caracterització o quantificació d'un o diversos analits d'una mostra desconeguda, o per a l'aïllament o separació d'un material purificat.
- Si l'objectiu principal serà la "determinació quantitativa" de l'analit o bé, serà suficient conèixer la presència del mateix en una mostra determinada ("determinació qualitativa").
- Si serà necessari estudiar més d'un analit.
- Si serà necessari separar tots els components de la mostra.
- Saber en quants tipus de líquids biològics es vol desenvolupar el procediment cromatogràfic.
- Conèixer el nombre aproximat de mostres que seran processades.
- Establir la periodicitat del processament de les mostres (p.ex.: diària, quinzenal, mensual, etc.).
- Tenir en compte el tipus de cromatògraf líquid d'alta eficàcia i el detector amb què compta el laboratori.
- Conèixer quines són les habilitats que presenten els operadors principals del sistema cromatogràfic

#### 4.3. Recerca bibliogràfica

Abans de dur a terme el desenvolupament d'un procediment cromatogràfic és recomanable realitzar una recerca bibliogràfica sobre altres procediments cromatogràfics que hagin sigut desenvolupats prèviament, donat que poden servir com a punt de partida o com a referència del procediment cromatogràfic a desenvolupar. A més, aquesta recerca, pot permetre simplificar el procés de desenvolupament així com el temps de posada a punt (9-14).

#### 4.4. Tractament o preparació de la mostra

El tractament o la preparació de les mostres biològiques és una procés essencial en el desenvolupament de procediments cromatogràfics. La seva importància radica en l'eliminació de distints components interferents que poden existir en els diferents tipus de mostres biològiques per tal d'aconseguir una apropiada separació, eficàcia i resolució cromatogràfiques. La presència de components de la mostra com proteïnes, lípids, sals i components cel·lulars poden interferir en el mesurament de la magnitud en estudi —senyals errònies en el detector, pics cromatogràfics

asimètrics, resolucions cromatogràfiques inadequades, manca de reproduïbilitat dels temps de retenció, capacitats de detecció menors, entre altres—, així com condicionar el bon funcionament del sistema cromatogràfic —obstrucció de cànules, tubs, vàlvules, injectors, detectors, entre altres— (9-21).

Els principals procediments de tractament o preparació de la mostra que s'empren en l'HPLC són la filtració, la centrifugació, la dilució i injecció (*dilute and shoot* en anglès), la precipitació de proteïnes, l'extracció líquid-líquid i l'extracció en fase sòlida. En funció del tipus de mostres biològiques en les que es treballi, moltes vegades serà necessari la combinació de dos o més d'aquests procediments de tractament o preparació (9-21).

Tot i els avantatges que suposa l'aplicació d'aquests procediments, la majoria d'ells poden donar lloc a una pèrdua de l'analit durant el procés de tractament de la mostra, per una banda, i no tots permeten eliminar totalment els diferents components de la mostra, per una altra

##### 4.4.1. Filtració

La filtració és un procediment de preparació de mostres que permet la separació dels sòlids que es troben en suspensió en un líquid mitjançant la utilització d'un material porós. Concretament, els sòlids són retinguts en el material porós mentre que el líquid el travessa. L'eficàcia del procediment de filtració, i per tant els tipus de components d'una mostra biològica que es poden separar, depèn de la composició i la mida del material porós utilitzat. Els principals materials porosos solen estar composts per cel·lulosa, polipropilè amb grups hidrofílics (GHP), politetrafluoretilè (PTFE), niló, fibra de vidre o fluorur de polivinilidè (PVDF), amb una mida de porus comprès entre 0,2 µm i 5 µm. Cal esmentar que, donades les reduïdes mides de porus amb la que es sol treballar, el líquid es fa travessar pel material porós mitjançant l'ajuda de diferents dispositius de pressió.

##### 4.4.2. Centrifugació

En les ciències de laboratori clínic la centrifugació és el procediment de preparació de mostres més àmpliament utilitzat. Durant la centrifugació, actuen dos tipus de forces sobre els components d'una mostra —la força de la gravetat i la força centrífuga—, que són originades com a conseqüència d'una rotació a alta velocitat ( $\geq 1200$  g). Aquestes forces generades permeten separar els diversos components en funció, principalment, de la seva densitat. Aquest procediment permet separar i eliminar majoritàriament els components cel·lulars d'una mostra però no separa altres components com proteïnes, lípids o sals.

##### 4.4.3. Dilució i injecció

El procediment de tractament de mostres basat en la dilució i injecció és un dels més simples de tots els utilitzats en l'HPLC. Es sol emprar en mostres biològiques relativament poc complexes com l'orina i el líquid cefalorraquidi. Consisteix en diluir la mostra amb un dissolvent adequat i injectar la dissolució realitzada al sistema cromatogràfic. Aquest procediment permet reduir el possible efecte negatiu dels diferents components interferents de la mostra biològica sobre el mesurament de la magnitud en estudi però, al no eliminar-los, és molt probable que s'acumulin al sistema cromatogràfic provocant un mal funcionament del mateix al llarg del temps.

Les dilucions més àmpliament utilitzades en l'HPLC són 1/5 i 1/10.

##### 4.4.4. Precipitació de proteïnes

La precipitació de proteïnes és el procediment de preparació de mostres més emprat en l'HPLC degut a la seva simplicitat i al reduït nombre de reactius o materials necessaris que requereix.

Aquest consisteix en afegir un volum específic d'un reactiu químic particular a un volum determinat d'una mostra, per tal de reduir la solubilitat de les proteïnes existents en la mateixa i afavorir la seva precipitació. Posteriorment, aquest precipitat és eliminat per filtració o centrifugació deixant un sobrenedant, el qual, habitualment, és injectat directament al sistema cromatogràfic. Dependent del reactiu de precipitació utilitzat, de les condicions experimentals i de les propietats fisicoquímiques de la mostra, es poden arribar a eliminar fins al 98 % de les proteïnes de la mostra.

El procediment de precipitació de proteïnes més popular es basa en l'addició d'un dissolvent orgànic (acetoneitril, metanol, entre altres) com a reactiu químic sobre la mostra en una proporció 3:1. Els dissolvents orgànics actuen mitjançant la reducció de la constant dielèctrica de les proteïnes de la mostra augmentant la seva interacció electrostàtica. Per altra banda, el dissolvent orgànic també provoca un desplaçament de les molècules d'aigua que estan associades amb la fracció hidrofòbica de les proteïnes. Aquest augment de les interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques dona lloc a que les proteïnes s'agreguin i, per tant, precipitin. També es fan servir, de manera conjunta o individual amb l'addició de dissolvents orgànics, altres reactius químics (reactius àcids —p.ex.: àcid tricloracètic— i sals d'àcids o bases fortes —p.ex.: hidròxid de zinc, sulfat de zinc, clorur de magnesi—) els quals també afavoreixen la precipitació de proteïnes. Els reactius àcids formen sals insolubles amb els grups *amino* de les proteïnes i els ions metàl·lics de les sals d'àcids o bases fortes s'uneixen als grups *amino* de la proteïna provocant, tots ells, l'agregació de proteïnes degut a una minimització de les interaccions hidrofòbiques i a un augment de les interaccions electrostàtiques, tal i com passa amb els dissolvents orgànics.

Cal tenir present que en aquest tipus de procediment no es concentra l'analit, de fet, es produeix una dilució del mateix. A més, no s'eliminen tots els components de la mostra (únicament s'eliminen les proteïnes) quedant en el sobrenedant altres components —sals i lípids— que poden interferir en el mesurament de la magnitud biològica o en el bon funcionament del sistema cromatogràfic.

#### 4.4.5. Extracció líquid-líquid

L'extracció líquid-líquid és un procediment de tractament de mostres que es fonamenta en la transferència de l'analit entre dos fases líquides insolubles entre si (immiscibles), una fase aquosa i una fase orgànica. De manera general, a la mostra que conté l'analit (fase aquosa) s'addiciona un líquid orgànic (fase orgànica) que actua com a extractant. Després d'un període d'agitació i repòs, l'analit es distribueix entre les dues fases fins a arribar a una situació d'equilibri. La transferència de l'analit es regeix per la llei de distribució de Nernst la qual estableix que en l'estat d'equilibri, i a pressió i temperatura constants, el quocient de la concentració de l'analit en les dues fases és manté constant. Aquesta llei es materialitza en la constant de distribució ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{[A]_o}{[A]_a}$$

on  $[A]_o$  representa la concentració d'analit en la fase orgànica i  $[A]_a$  la concentració d'analit en la fase aquosa. Cada analit té un valor característic de  $K_D$  per a un parell de dissolvents concrets. Quan major sigui el valor de  $K_D$ , més gran serà l'eficàcia de l'extracció, de manera que cal tenir una idea inicial de la polaritat de l'analit i dels dissolvents a utilitzar. Si un analit és poc soluble en aigua, la seva extracció es veurà més afavorida si s'empren dissolvents apolars enlloc de dissolvents polars. En l'HPLC, els dissolvents orgànics que se solen emprar són l'hexà, el diclorometà, l'1,2-dicloretà, el metil *tert*-butil èter, entre altres.

En aquest tipus de procediment, al igual que ocorre amb el de la precipitació de proteïnes, però en major grau, no es concentra l'analit sinó que es produeix una dilució del mateix motiu pel qual, la majoria de vegades, es duu a terme una evaporació del dissolvent orgànic i una reconstitució posterior amb un dissolvent apropiat per concentrar l'analit. Addicionalment, en aquest procediment, no s'eliminen tots els components de la mostra —únicament s'eliminen components cel·lulars, les sals i algunes proteïnes— quedant en el sobrenedant altres components com els lípids, els quals poden interferir en el mesurament de la magnitud biològica.

#### 4.4.6. Extracció en fase sòlida

L'extracció sòlid-líquid o extracció en fase sòlida, que comparteix fonament amb la cromatografia líquida, és un procediment de preparació de mostres en el qual l'analit es separa en funció de la seva afinitat relativa entre la matriu de la mostra i un suport sòlid que conté una fase sorbent. La interacció sorbent-analit pot respondre a diferents mecanismes entre els quals cal destacar l'adsorció, el repartiment, el bescanvi iònic, l'exclusió molecular, l'afinitat o una combinació d'ells. Aquestes característiques de l'extracció en fase sòlida fan que sigui un procediment de tractament de mostres molt versàtil i selectiu.

Generalment, aquest procediment comprèn la realització de cinc etapes:

1. Etapa d'activació o condicionament de la fase sòlida (sorbent).

Consisteix en la solvatació del sòlid emprant un dissolvent orgànic que permet preparar la fase enllaçada per a una adequada interacció i unió entre l'analit i el sorbent.

2. Etapa d'equilibrat del sorbent.

En aquesta etapa s'empra un dissolvent amb propietats similars a les de la matriu de la mostra, permetent eliminar l'excés de dissolvent condicionador.

3. Etapa d'addició de la mostra líquida sobre el suport sòlid que conté el sorbent.

L'analit és selectivament retingut pel sorbent, mentre que els potencials interferents són eliminats degut a seva nul·la o mínima afinitat pel sorbent.

4. Etapa de rentat del sorbent.

Consisteix en fer servir un dissolvent o barreja d'ells per a l'eliminació selectiva dels potencials interferents que hagin pogut quedar retinguts dèbilment al sorbent. Per aconseguir-ho, les propietats dels dissolvents utilitzats han de ser similars a les dels interferents.

5. Etapa d'elució de l'analit.

En aquesta darrera etapa, per tal d'aconseguir recuperar selectivament l'analit, s'addiciona un dissolvent que permet disminuir les interaccions que mantenen unit l'analit al sorbent.

En aquest procediment, a diferència de la resta de procediments de preparació de la mostra, no es dilueix la mostra (o aquesta és mínima). A més, permet eliminar pràcticament la totalitat dels components interferents de la mostra.

### 4.5. Selecció del detector cromatogràfic

La selecció d'un tipus de detector cromatogràfic o un altre dependrà de la naturalesa química de l'analit a estudiar, de les possibles interferències que puguin existir després de realitzar el procés de preparació de la mostra, de la capacitat de detecció que es requereixi, de la disponibilitat dels detectors cromatogràfics existents al laboratori clínic, del cost que es vulgui invertir en la compra d'un detector cromatogràfic nou, entre d'altres (9-22).

Sempre que sigui possible, el laboratori clínic hauria de seleccionar aquells detectors cromatogràfics que presentin una major versatilitat —detectors "universals"—, com ara els d'absorció molecular, els d'índex de refracció i els espectròmetres de masses. Generalment, els detectors cromatogràfics d'absorció molecular solen ser els més emprats donada la naturalesa orgànica dels analits que s'estudien als laboratoris clínics —la majoria d'analits absorbeixen la radiació electromagnètica a una o diverses longituds d'ona específiques—. A més, solen presentar un cost assumible per als laboratoris (entre 5000 i 15000 €, depenent del tipus de detector i fabricant). En el cas que els analits no absorbeixin aquest tipus de radiacions o bé presentin una baixa absorció (p.ex.: glúcids, àcids grassos i alguns lípids), és recomanable utilitzar els detectors d'índex de refracció. Aquests tipus de detectors presenten una menor sensibilitat metrològica, capacitat de detecció i selectivitat que els d'absorció i el seu cost oscil·la entre els 5000 i 10000 € (depenent del fabricant). De tots aquests detectors "universals", el més versàtil i selectiu és l'espectròmetre de masses donat que es basa en el mesurament de propietats de la matèria que presenten tots els analits, la massa i la càrrega. Malgrat això, la seva principal limitació és el seu cost (entre 100000 i 400000 €, depenent del tipus d'analitzador de masses i fabricant) (9-22).

A més dels detectors "universals" existeixen altres que són més selectius, sensibles i amb una major capacitat de detecció que aquests —excepte els espectròmetres de masses— com són els detectors de fluorescència i els electroquímics. D'aquests dos detectors, els de fluorescència són els que presenten la major sensibilitat i capacitat de detecció sent aquestes propietats indispensables quan es pretén mesurar magnituds biològiques que presenten valors baixos. Malgrat això, per poder utilitzar un detector de fluorescència cal que els analits tinguin la capacitat d'emetre fluorescència o bé, que aquests l'emetin quan se'ls fa reaccionar amb altres compostos (procés de derivatització). El seu preu oscil·la entre els 7500 i 15000 € (depenent del fabricant). Els detectors electroquímics —principalment els voltamperomètrics i els conductimètrics— és recomanable utilitzar-los quan es pretenen estudiar analits que tenen elevades propietats oxidants o reductores com ara les amines biogèniques (catecolamines, metanefrines, vanilmandelat, 5-hidroindolilacetat, entre d'altres), en el cas dels voltamperomètrics, o bé presenten una naturalesa iònica (p.ex.: ions metàl·lics com els ion ferro, calci, zinc, magnesi, entre altres) en el cas dels conductimètrics. El seu cost està comprès entre 7500 i 15000 €, depenent del tipus de detector i fabricant (9-22).

#### 4.6. Elecció del tipus de cromatografia líquida i modalitat de treball

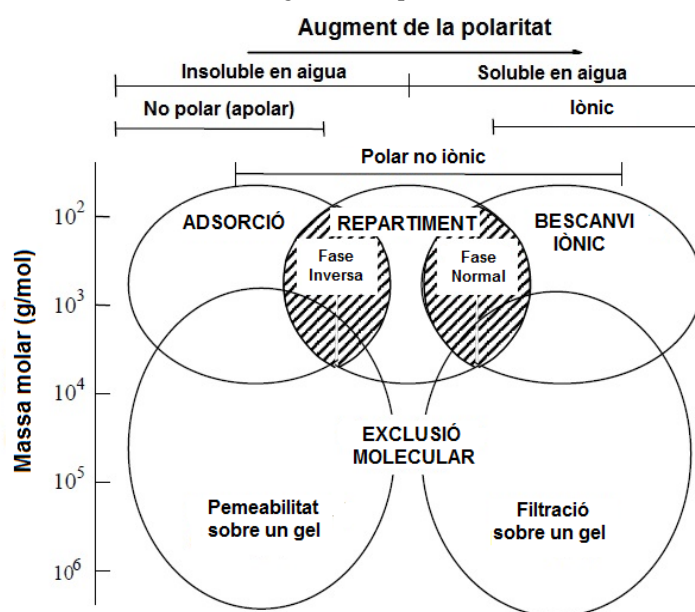
Perquè tingui lloc una adequada separació, eficàcia i resolució cromatogràfiques, el laboratori clínic ha de seleccionar un tipus de cromatografia líquida o una altra —d'adsorció, de repartiment, de bescanvi iònic o d'exclusió molecular— atenent a quines siguin les interaccions que puguin tenir lloc entre l'analit (depenen de les seves propietats fisicoquímiques) i les fases mòbil i estacionària (9-22).

A la Figura 2 es mostra els diferents tipus de d'HPLC existents amb les seves corresponents modalitats de treball, segons sigui la naturalesa de l'analit. Com es pot observar, els diferents tipus de cromatografia solen ser complementàries pel que fa als seus camps de aplicació. Així, per als analits amb masses molars superiors a 10000, sovint s'utilitza l'HPLC d'exclusió molecular, tot i que també és possible utilitzar l'HPLC de repartiment en fase inversa per a la seva separació i quantificació. Per als analits iònics de baixa massa molar, s'utilitza freqüentment l'HPLC de bescanvi iònic. Les diferents modalitats d'HPLC de repartiment (fase normal i fase inversa) s'apliquen als analits poc polars però

no iònics. La cromatografia d'adsorció es sol fer servir per separar analits que són isòmers estructurals (estereoisòmers) (9-22).

Generalment, és preferible utilitzar la cromatografia de repartiment en la modalitat de fase inversa, donada la seva elevada capacitat per separar una gran varietat d'analits. Malgrat això, per als analits que presenten unes propietats fisicoquímiques molt específiques i diferenciades és aconsellable emprar altres tipus d'HPLC:

- Per als analits que presenten una elevada massa molar (p.ex.: macromolècules com enzims i proteïnes), és preferible utilitzar l'HPLC d'exclusió molecular.
- Per als analits inorgànics iònics (p.ex.: ferro, zinc) o per als analits fàcilment ionitzables (p.ex.: amines biogèniques, hemoglobines), és preferible emprar l'HPLC de bescanvi iònic.
- Per als analits que presenten diversos estereoisòmers i una polaritat elevada, és recomanable fer servir la cromatografia d'adsorció o la cromatografia de repartiment en fase normal.



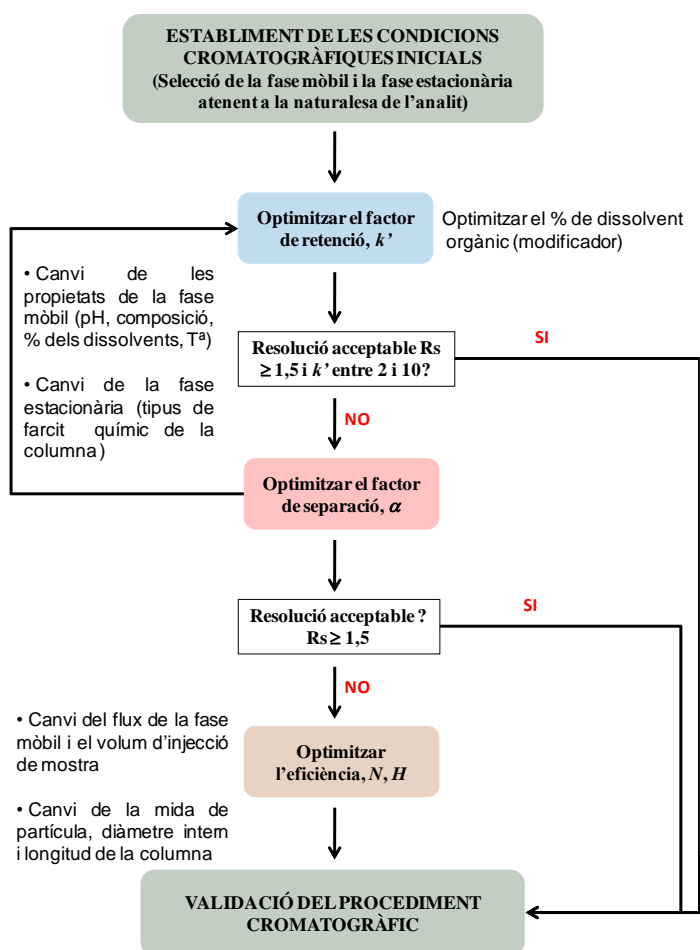
**Figura 2.** Tipus d'HPLC i modalitats de treball en funció de dos de les principals propietats fisicoquímiques que presenten els analits: la seva massa molar i polaritat.

#### 4.7. Posada a punt del procediment cromatogràfic i optimització de la separació cromatogràfica

A l'hora de desenvolupar un procediment cromatogràfic d'HPLC s'ha de tenir present que ha d'existir un adequat equilibri entre les forces intermoleculares dels tres participants actius que tenen lloc en el procés de separació: l'analit, la fase mòbil i la fase estacionària. Per tant, a més de la necessitat de conèixer la naturalesa fisicoquímica de l'analit, s'han de tenir presents diferents aspectes relacionats amb les diferents fases (9-22):

- Aspectes relacionats amb la fase mòbil com per exemple: la composició de la fase mòbil, el control del pH de la fase mòbil, la modalitat d'elució emprada i la temperatura de la fase mòbil.
- Aspectes relacionats amb la fase estacionària com per exemple: la química de l'empaquetat o farcit, la mida de porus, la mida de partícula, el diàmetre intern i la longitud de la columna cromatogràfica.

A la Figura 3 es mostra un exemple de com procedir en el desenvolupament d'un procediment cromatogràfic, així com en l'optimització de la separació cromatogràfica.



**Figura 3.** Diagrama de flux per al desenvolupament d'un procediment cromatogràfic i la seva optimització.

#### 4.7.1. Selecció de la fase mòbil

El coneixement de la polaritat de l'analít permet seleccionar els dissolvents que s'han de fer servir en la fase mòbil. De fet, la solubilitat de les substàncies pot explicar-se en base a la seva polaritat. En general, en química analítica es diu que "semblant dissol a semblant", és a dir, que les molècules amb polaritats similars seran solubles entre sí. Així, la selecció dels dissolvents s'ha de dur a terme en base a la seva solubilitat amb l'analít. De fet, existeix una estreta relació entre el temps de retenció o elució dels analítics amb la composició de la fase mòbil com a conseqüència de l'efecte de la polaritat. Addicionalment, s'ha de tenir present que l'analít no ha de reaccionar químicament amb cap dels dissolvents que componen la fase mòbil.

En l'HPLC de repartiment de fase inversa —la més àmpliament utilitzada en els laboratoris clínics—, els temps d'elució dels analítics poden modificar-se canviant la polaritat de la fase mòbil, per exemple, variant la composició química dels dissolvents a utilitzar o bé, modificant la quantitat emprada de cada un d'ells (la seva proporció volum/volum). La utilització d'una o ambdues d'aquestes condicions de treball permet obtenir, en general, valors del factor de retenció ( $k'$ ) adequats (entre 2 i 10) (22). Un punt de partida per optimitzar la separació cromatogràfica seria emprar una barreja d'aigua i un dissolvent orgànic polar (metanol o acetonitril), en una proporció determinada, i observar com varien els temps d'elució i la resolució dels analítics al modificar la proporció de cada un dels dissolvents. Pot donar-se el cas que, tot i obtenir valors de  $k'$  compresos entre 2 i 10, els pics cromatogràfics dels analítics es solapen o bé no estiguin ben resolts (valors de resolució  $< 1,5$ ). Per tal d'evitar aquesta situació, es recomana modificar el valor

del factor de separació ( $\alpha$ ), per exemple, canviant el pH, la composició química o la temperatura de la fase mòbil o bé, la modalitat d'elució (isocràtica o en gradient). Si tot i així no s'obté una resolució acceptable, s'hauria de recórrer a canviar la fase estacionària (columna) bé sigui modificant el seu empaquetat o farcit químic, la seva mida de porus, la seva mida de partícula, el seu diàmetre intern, la seva longitud o una combinació d'ells. Tots aquests canvis relacionats amb la fase estacionària afectarien a l'eficàcia cromatogràfica i, conseqüentment, a la resolució (9-22).

#### 4.7.2. pH la fase mòbil

El pH de la fase mòbil i el coneixement del pKa de l'analít tenen un paper molt important de cara al desenvolupament i l'optimització d'un procediment cromatogràfic. En l'HPLC, per poder realitzar quantificacions fiables d'un analít, és necessari que els pics cromatogràfics estiguin ben resolts i a més siguin simètrics, estrets i punxeguts. Per poder aconseguir aquestes formes de pic, sobretot quan l'analít presenta una naturalesa iònica, és necessari que s'optimitzi i mantingui el pH de la fase mòbil mitjançant l'addició d'una solució tampó (*buffer* en anglès). Per exemple, en l'HPLC de repartiment de fase inversa, els analítics d'una mostra se separen en funció de la seva polaritat i, per tant, aquells que siguin menys polars presentaran una major retenció a la columna i viceversa. Quan s'ionitza un analít, aquest es torna més polar i, per tant, disminueix la seva retenció per la fase estacionària. Els analítics de naturalesa àcida s'ionitzen quan el pH és superior al seu pKa i els analítics bàsics, quan el pH és inferior al seu pKa. Així, s'obté una major retenció dels analítics àcids a la fase estacionària quan es treballa a pH àcids i per sota del seu pKa, i a pH bàsics i per sobre de la seva pKa, si els analítics són de naturalesa bàsica. Aquestes assumpcions es deriven de l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

on [HA] és la concentració de la forma àcida de l'analít i, [A<sup>-</sup>], la concentració de la forma bàsica de l'analít.

Tenint en compte totes aquestes consideracions, per obtenir una major retenció de l'analít i, per tant, uns pics cromatogràfics acceptables i una reproductibilitat adequada, s'han d'afegir solucions tampó a la fase mòbil que donin lloc a un pH que presentin, com a mínim, dos unitats per sota del pKa de l'analít, si aquest és de naturalesa àcida, i dues unitats per sobre del pKa de l'analít si és de naturalesa bàsica (el 99 % de la forma de l'analít no estarà ionitzada). Les principals solucions tampó i els seus corresponents intervals de tamponament de pH utilitzats en l'HPLC es mostren a la Taula 1 (9-22).

Un aspecte a tenir en compte durant la selecció d'una solució tampó és la seva longitud d'ona màxima d'absorció i el detector amb el qual es treballarà. Si s'empra un detector d'absorció molecular per a la detecció d'un analít que absorbeix a la zona del visible —a una longitud d'ona compresa entre 380 nm i 750 nm—, es pot utilitzar qualsevol de les solucions tampó de la Taula 1, donat que cap d'elles absorbirà a una longitud d'ona propera a la de l'analít. En canvi, per tal d'evitar una interferència òptica i obtenir valors d'absorbència no atribuïbles a l'analít, si es pretén detectar un analít que absorbeix a la zona de l'ultraviolat —a una longitud d'ona compresa entre 10 nm i 380 nm—, s'ha d'assegurar que la solució tampó escollida no absorbeixi a la mateixa longitud d'ona de l'analít i, a poder ser, que aquesta presenti una longitud d'ona 10-20 nm vegades per sota i per sobre de la longitud d'ona d'absorció de l'analít.

Les solucions tampó de fosfat són les més àmpliament utilitzades en l'HPLC acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular, donades les seves propietats absorbives i tamponants. En contraposició, s'han d'emprar tampó volàtils (acetat, formiat,

trietilamina) i evitar l'ús de tampons no volàtils (fosfat, citrat), si es fan servir espectròmetres de masses com a detectors.

Una altra consideració important a tenir en compte quan s'empren solucions tampó és quina concentració de treball s'ha de fer servir. Idealment, la solució tampó ha de presentar una concentració prou elevada com per poder controlar el pH de la fase mòbil, però no ha de ser excessiva per tal d'evitar la possible precipitació de les sals del tampó quan s'utilitzen dissolvents orgànics. Habitualment, una concentració apropiada de la solució tampó és aquella que està compresa entre 20 mmol/L i 50 mmol/L (9-22).

**Taula 1.** Principals solucions tampó emprades en l'HPLC.

Solució tampó	pKa	Interval de pH òptim de treball	Longitud d'ona màxima (nm) d'absorció
Formiat d'amoni	3,8	(2,8 - 4,8)	210
	9,2	(8,2 - 10,2)	
Acetat d'amoni	4,8	(3,8 - 5,8)	210
	9,2	(8,2 - 10,2)	
Citrat/Àcid clorhídric	3,1	(2,1 - 4,1)	230
	4,7	(3,7 - 5,7)	
	5,4	(4,4 - 6,4)	
Àcid tricloracètic	< 2,0	(1,5 - 2,5)	210
Dihidrogen fosfat/àcid fosfòric	2,1	(1,1 - 3,1)	< 200
Formiat/Àcid fòrmic	3,8	(2,8 - 4,8)	210
Acetat/Àcid acètic	4,8	(3,8 - 5,8)	210
Hidrogen fosfat/Dihidrogen fosfat	7,2	(6,2 - 8,5)	< 200
Tris-(hidroximetil)-aminometano	8,3	(7,3 - 9,3)	220
Amoni/Amoníac	9,2	(8,2 - 10,2)	210
Borat	9,2	(8,2 - 10,2)	210
Trietilamina	10,8	(9,8 - 11,8)	200
Pirrolidina	11,3	(10,3 - 12,3)	200
Fosfat/Hidrogen fosfat	12,3	(11,3 - 13,3)	< 200

#### 4.7.3. Modalitat d'elució de la fase mòbil

Per norma general, treballar amb una modalitat d'elució isocràtica de la fase mòbil permet obtenir separacions cromatogràfiques més reproduïbles que amb la modalitat d'elució en gradient. Malgrat això, utilitzar la modalitat d'elució isocràtica presenta una sèrie de desavantatges com són una pèrdua aparent de l'eficàcia (augment de l'alçada del pic,  $H$ ) i l'obtenció de pics cromatogràfics més amples en aquells analits que són més retinguts a la fase estacionària afectant, així, a la resolució cromatogràfica.

Per contra, treballar en la modalitat en gradient permet augmentar significativament la resolució com a conseqüència d'un augment aparent de l'eficiència cromatogràfica (disminució de l'alçada del pic,  $H$ ), a més de permetre disminuir el temps de la cromatografia i reduir el consum dels dissolvents que conformen la fase mòbil.

Un adequat punt de partida per a l'optimització de la separació cromatogràfica seria emprar la modalitat d'elució isocràtica, a no ser que es requereixi separar un nombre elevats d'analits amb una resolució acceptable o bé reduir significativament el temps de la cromatografia. Si aquest és el cas, s'hauria de treballar en la modalitat d'elució en gradient (9-22).

#### 4.7.4. Temperatura de la fase mòbil

La temperatura influeix considerablement en la solubilitat, la difusivitat, la viscositat i la polaritat de la fase mòbil (9-22).

A elevades temperatures (> 40 °C), la viscositat de la fase mòbil es redueix i la velocitat de difusió augmenta, causant que la taxa de transferència de massa de l'analit entre la fase estacionària i la fase mòbil s'incrementi i, conseqüentment, també la separació, l'eficàcia i la resolució cromatogràfiques. Així, es pot treballar amb fluxos de fase mòbil més grans que amb els que es treballaria a temperatura ambient, fet que permetria escurçar substancialment el temps d'anàlisi sense una pèrdua d'eficàcia.

Un punt de partida per a l'optimització de la separació cromatogràfica podria ser emprar inicialment una temperatura ambient (25-30 °C), i un flux de fase mòbil determinat, i observar com varien els temps d'elució dels analits i la resolució cromatogràfica a l'incrementar la temperatura (p.ex.: de 5 °C en 5 °C) i el flux de la fase mòbil (p.ex.: de 0,1 mL/min en 0,1 mL/min).

#### 4.7.5. Selecció de la fase estacionària. Columna analítica

Com s'ha esmentat amb anterioritat, la selecció del tipus de fase estacionària (columna) depèn de la naturalesa fisicoquímica de l'analit que es pretén separar, del tipus i modalitat d'HPLC utilitzades i de quina sigui la finalitat de la separació cromatogràfica.

Per a la correcta selecció d'una columna analítica s'haurien de considerar els següents aspectes (9-22):

##### 1. Selecció de la mida de porus

La selecció de la mida de porus dependrà de la massa molar de l'analit. És recomanable que es faci servir un farciment de columna amb una mida de porus comprès entre 60 Å i 100 Å si la massa molar de l'analit és inferior o igual a 2000 g/mol. En cas contrari, s'ha d'utilitzar un farciment de columna amb una mida de porus de 300 Å.

##### 2. Selecció del farciment químic

En l'actualitat, hi ha una gran varietat de columnes comercials disponibles amb diferents tipus de farciments químics. A la Taula 2 es mostren alguns exemples.

A mode d'exemple, en l'HPLC de repartiment de fase inversa, un bon punt de partida podria ser emprar columnes amb farciments químics del tipus C18 o C8. Si els analits de la mostra no es separen adequadament en aquestes, es recomanable utilitzar les columnes de CN i fenil.

En general, els analits amb una elevada massa molar, com les proteïnes, es separen millor en columnes de fase inversa que presenten farciments químics de cadena curta (C3, CN) i els pèptids i els analits amb baixa-mitja massa molar, se separen millor en columnes amb farciments químics de cadenes més llargues (C8, C18).



**Taula 2.** Principals farcits químics utilitzats en les columnes d'HPLC.

Tipus de farcits químics	Tipus de cromatografia	Modalitat de treball
C <sub>18</sub> (octadecil)	Repartiment	Fase inversa
C <sub>8</sub> (octil)	Repartiment	Fase inversa
C <sub>6</sub> (Hexil)	Repartiment	Fase inversa
C <sub>4</sub> (Butil)	Repartiment	Fase inversa
C <sub>1</sub> (trimetilsilil)	Repartiment	Fase inversa
Fenil	Repartiment	Fase inversa
PFP (Pentafluorfenil)	Repartiment	Fase inversa
CONH <sub>2</sub> (amida)	Repartiment	Fase inversa
CN (ciano)	Repartiment	Fase inversa Fase normal
NH <sub>2</sub> (amina)	Repartiment	Fase inversa Fase normal
NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (dimetilamina)	Repartiment	Fase inversa Fase normal
Poliestirè	Repartiment	Fase inversa Fase normal
Síllice	Repartiment	Fase normal
(OH) <sub>2</sub> (diol)	Repartiment	Fase normal
NR <sub>4</sub> (amina quaternària)	Bescanvi iònic	-
SO <sub>3</sub> (àcid sulfònic)	Bescanvi iònic	-
CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> (dietilamina)	Bescanvi iònic	-
COOH (àcid carboxílic)	Bescanvi iònic	-
Polímers/síllices específiques/Alúmina	Exclusió molecular	-

### 3. Selecció de la mida de partícula

En l'HPLC, la mida de partícula estàndard és de 5 µm però, en l'actualitat, s'estan emprant columnes amb una mida de partícula que està compresa entre 1,3 µm i 3,0 µm.

Si es pretén obtenir una separació cromatogràfica en el menor temps possible o amb una major resolució i eficàcia, es poden utilitzar columnes amb una mida de partícula de 3,0 µm o bé, amb mides inferiors a 2,0 µm. Cal destacar que les columnes amb una mida de partícula de 3,0 µm operen a una pressió < 300 bar i es poden fer servir en la majoria de cromatògrafs líquids. En canvi, si la mida de partícula de la columna és < 2,0 µm, es produeixen pressions ≥ 400 bar i es precisen de cromatògrafs líquids que permetin suportar aquestes elevades pressions (UHPC).

### 4. Diàmetre intern de la columna

La quantitat de mostra que pot ser injectada en una columna dependrà del seu diàmetre intern. Quan menor sigui el diàmetre, menor serà la quantitat de mostra que es podrà injectar i una millor forma de pic cromatogràfic s'obtindrà, però majors pressions haurà de suportar l'entrada de la columna i, en conseqüència, menor serà el seu temps de vida útil. Per norma general, les columnes més utilitzades per al desenvolupament de procediments cromatogràfics són aquelles que presenten un diàmetre intern de 4,6 mm. Malgrat això, cal destacar que les columnes amb un diàmetre intern menor proporcionen una major capacitat de detecció i, per tant, es solen utilitzar en l'HPLC-MS o quan el volum de mostra del que es disposa és reduït.

### 5. Longitud de la columna

Com a norma general, les columnes més emprades són aquelles que presenten una longitud de 100 mm, 150 mm o 250 mm conjuntament amb una mida de partícula de 5 µm. Aquestes condicions proporcionen temps de retenció compresos entre 20-30 min. Si es desitja escurçar aquests temps, es recomanable emprar columnes amb una longitud menor (30 mm, 50 mm o 75 mm) però amb una mida de partícula ≤ 3,5 µm.

## 4.8. Validació de procediments cromatogràfics

Una vegada que el laboratori clínic ha desenvolupat un procediment cromatogràfic, l'ha de sotmetre a un procés de validació que permeti comprovar, mitjançant la provisió d'evidència objectiva, que és apte per a la seva aplicació amb mostres de pacients. Per altra banda, el laboratori també ha de detallar, documentar i enregistrar tota la informació relacionada amb el procés de validació (procediment de mesura cromatogràfic desenvolupat, sistema cromatogràfic utilitzat, reactius o materials emprats, requisits metrològics establerts o adoptats, resultats obtinguts de les propietats metrològiques estudiades, entre altres) (1-4).

Cal esmentar que el procés de validació d'un procediment cromatogràfic no difereix de qualsevol altre que s'utilitza en un laboratori clínic. Tot i així, degut a les característiques pròpies que presenta un procediment cromatogràfic, algunes de les propietats metrològiques considerades en el procés de validació hauran d'estudiar-se d'una manera més exhaustiva i particular (23).

En el procés de validació d'un procediment cromatogràfic, el laboratori ha de tenir present o estudiar els següents aspectes o propietats metrològiques: la preparació de solucions i materials diversos, el calibratge i la corba de calibratge, la sensibilitat metrològica, l'interval de mesura i la linealitat, la capacitat de detecció (valor crític, límit de detecció i límit de quantificació), la precisió de mesura (en condicions de repetibilitat i en condicions intermèdies), la veracitat de mesura, l'error de mesura, la

selectivitat, l'arrossegament, la recuperació, l'efecte matriu (principalment en procediments basats en l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS) i l'estabilitat de les magnituds biològiques i de les solucions de treball (23).

## 5. Bibliografia

- (1) Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea. Directiva 98/79/CE de 27 de Octubre de 1998 sobre productos sanitarios para diagnóstico in Vitro. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1998-12-07 (L331) 1-37.
- (2) Real Decreto 1662/2000, de 29 de septiembre, sobre productos sanitarios para diagnóstico "in vitro". Boletín Oficial del Estado 235, Sábado 30 septiembre 2000, pág 33482.
- (3) Asociación Española de Normalización. Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia. UNE-EN-ISO 15189. Madrid AENOR; 2012.
- (4) Asociación Española de Normalización. Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. UNE-EN ISO 9001:2000. Madrid AENOR; 2000.
- (5) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Compendium of chemical terminology—the Gold Book. <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>> (Consultat: 2016-04-01).
- (6) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Definitions of terms relating to mass spectrometry—IUPAC Recommendations 2013. *Pure Appl Chem* 2013;85:1515-609.
- (7) International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl Chem* 1993;65:819-72.
- (8) Comissió Electrotècnica Internacional, Cooperació Internacional per a l'Accreditació de Laboratoris, Federació Internacional de Química Clínica, Oficina Internacional de Pesos i Mesures, Organització Internacional de Metrologia Legal, Organització Internacional de Normalització, Unió Internacional de Física Pura i Aplicada, Unió Internacional de Química Pura i Aplicada. Vocabulari internacional de metrologia. Conceptes fonamentals i generals i termes associats. (VIM). 3a edició. 2008. <<http://www.acclcat.cat/continguts/ivv114.pdf>> (Consultat: 2016-04-01).
- (9) Singh R. HPLC method development and validation—an overview. *J Pharm Educ Res* 2013; 4:26-33.
- (10) Pandey S. Review on sample preparation for drug discovery. *Int J Adv Res Tech* 2013; 2:1-3.
- (11) Gupta V, Kumar Jain AD, Gill NS, Gupta K. Development and validation of HPLC method—a review. *Int Res J Pharm App Sci* 2012; 2:17-25.
- (12) Kaushal C, Srivastava B. A process of method development: a chromatographic approach. *J Chem Pharm Res* 2010; 2:519-45.
- (13) Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods* 2010; 1:14-24.
- (14) Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch. Practical HPLC method development. New York: Wiley Interscience; 1997.
- (15) Miller JM. Chromatography: concepts and contrasts. New Jersey: Miller; 2009.
- (16) Heftmann E. Chromatography. Amsterdam: Elsevier; 2004.
- (17) Brown PR. High-performance liquid chromatography: past developments, present status, and future trends. *Anal Chem* 1990;62:995A-1008A.
- (18) Lough WJ, Wainer IW. High-performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. Londres: Blackie Academic & Professional; 1995.
- (19) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2001.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) Rigo Bonnin R, Arbiol Roca A. Cromatografia líquida d'alta eficàcia. Part 1—Fonaments i instrumentació. *In vitro veritas* 2016;17:20-38.
- (23) Rigo Bonnin R. Validació de sistemes de mesura basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia. *In vitro veritas* 2015;16:9-29.