



## Cromatografia líquida d'interacció hidrofílica (HILIC) per a la determinació de substàncies polars d'interès biològic

HILIC:

- ✓ Combinació d'una fase estacionària polar amb una fase mòbil hidroorgànica.
- ✓ Disminueix la retenció dels anàlits polars en augmentar el contingut de solvent polar (tampó aquós) en la fase mòbil.
- ✓ La fase mòbil forma una capa d'aigua adsorbida sobre la superfície de la fase estacionària.

Altres mètodes:

- ✗ Cromatografia líquida de fase invertida: Retenció insuficient dels anàlits.
- ✗ Cromatografia líquida de fase normal: Reproductibilitat compromesa i baixa solubilitat de soluts polars en fases mòbils apolars.
- ✗ Cromatografia líquida de bescanvi iònic: Només aplicable a compostos ionitzats.

## Estudi de columnes cromatogràfiques: caracterització del mode de retenció i mesura del volum mort mitjançant sèries homòlogues

Interaccions específiques entre el solut i les fases que l'envolten.

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

$\log SP$  procés global, factor de retenció cromatogràfica ( $\log k$ )

$eE$  dispersió (electrons  $\pi$  i  $n$ )

$sS$  interaccions de dipolaritat/polaritzabilitat

$aA$  i  $bB$  acidesa i basicitat d'enllaç d'hidrogen, respectivament

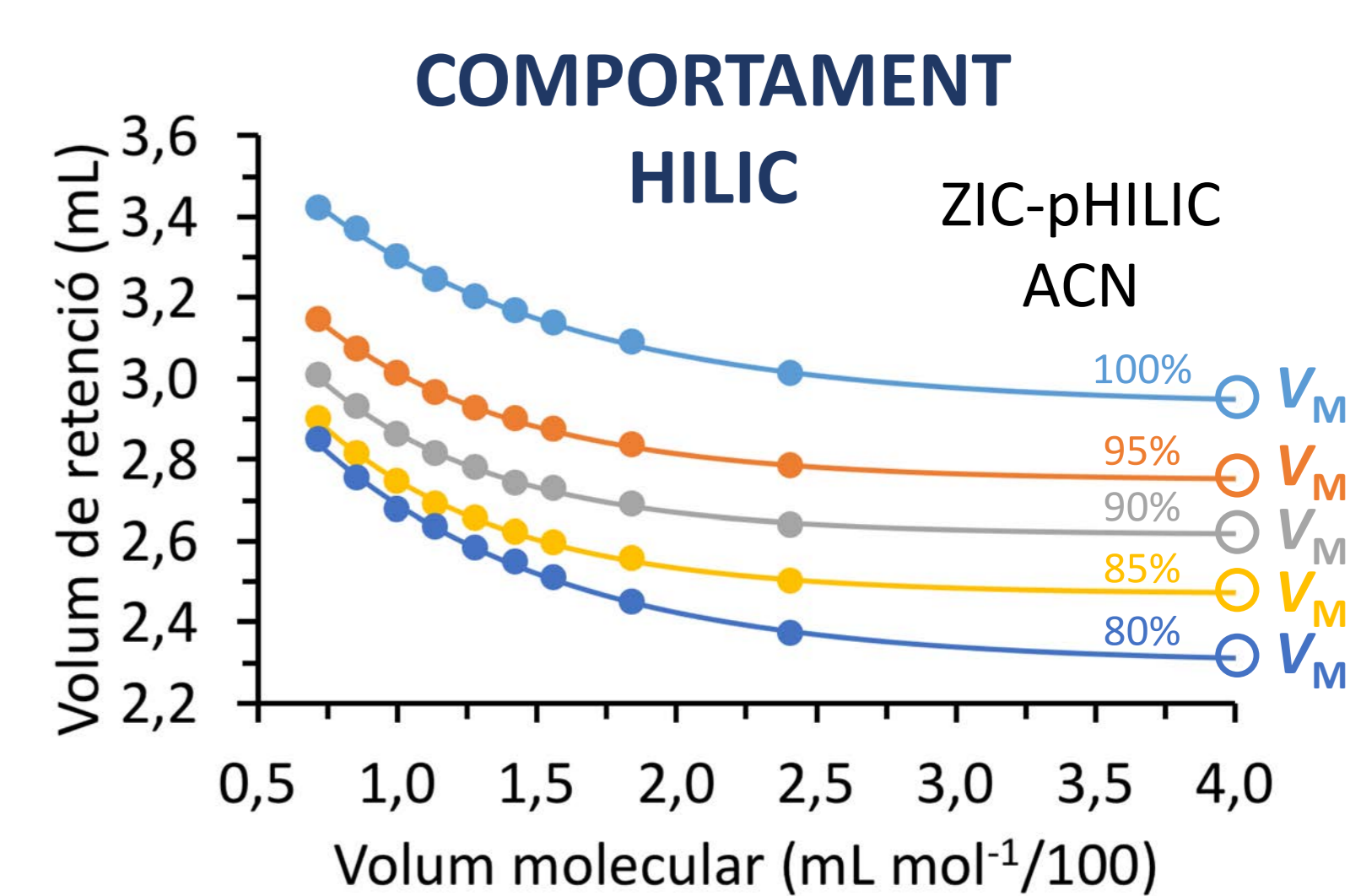
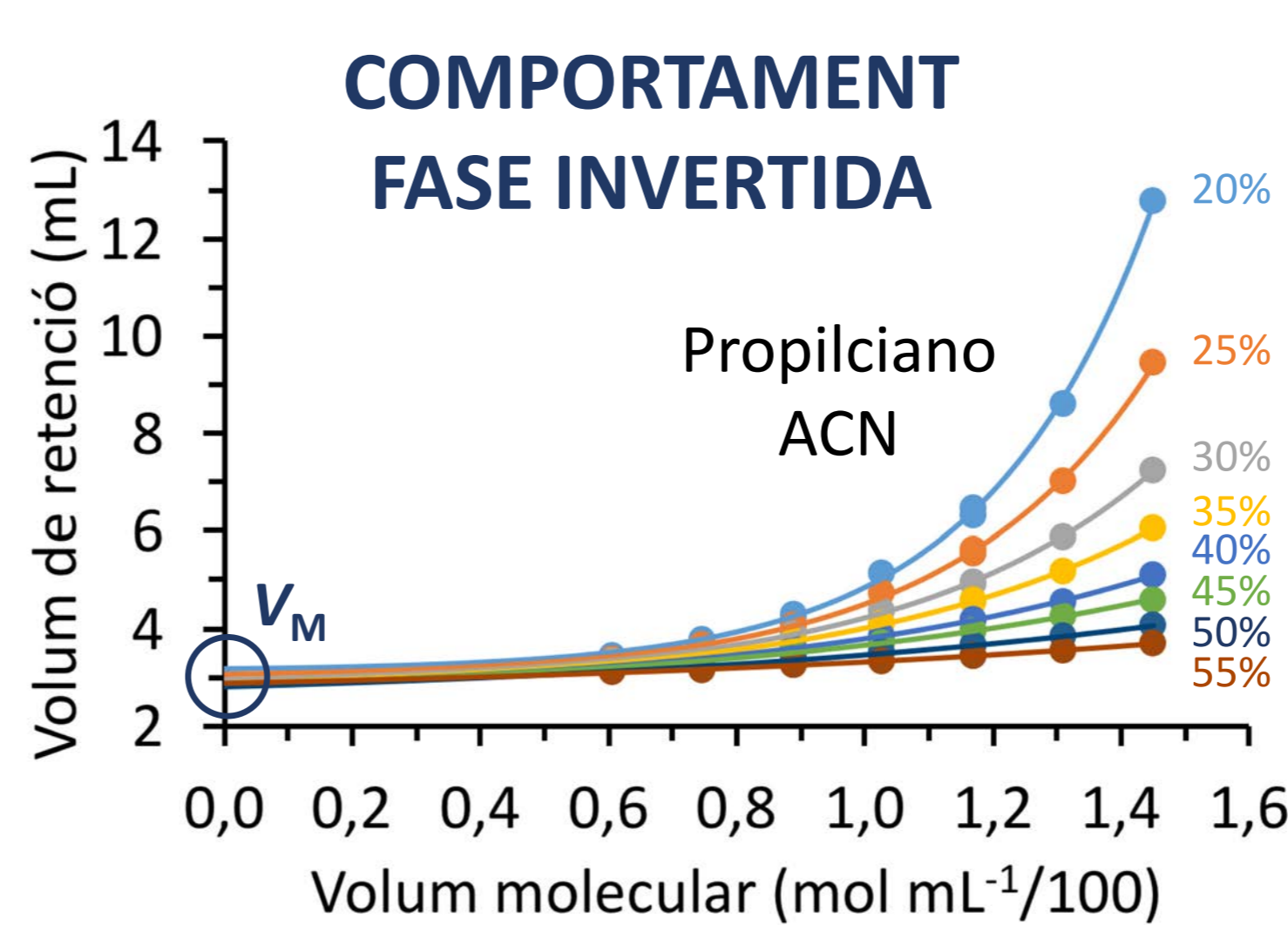
$vV$  volum molecular de McGowan (formació de la cavitat)

$V_M$  i  $V_R$  volum mort i volum de retenció

$$\log k = \log \frac{V_R - V_M}{V_M} = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

$$V_R = V_M + V_M \cdot 10^{c + eE + sS + aA + bB + vV}$$

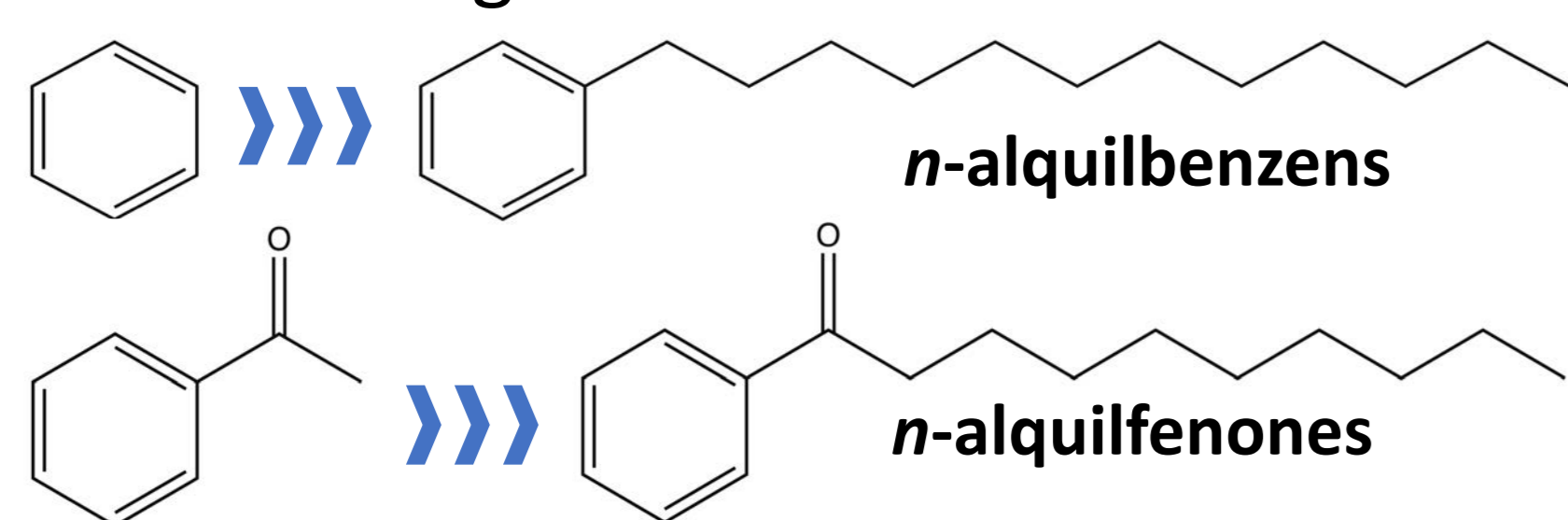
$$V_R = V_M + r \cdot 10^{vV}$$



A diferència del comportament en fase invertida, en HILIC el volum mort depèn molt significativament del contingut d'aigua en la fase mòbil.

## Estudi del mode de retenció predominant en columnes HILIC en funció del contingut de solvent orgànic a la fase mòbil

Sèries homòlogues:

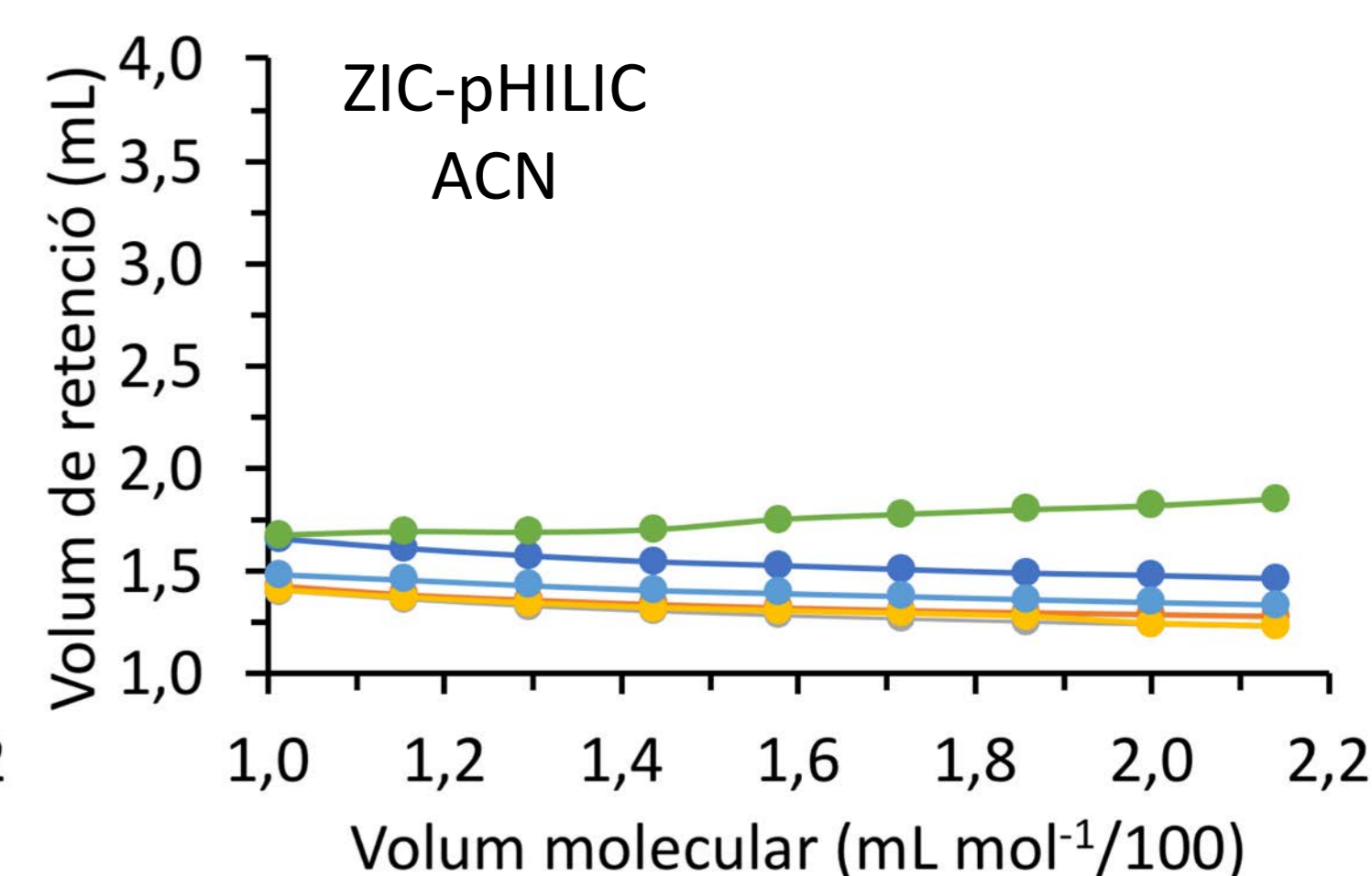
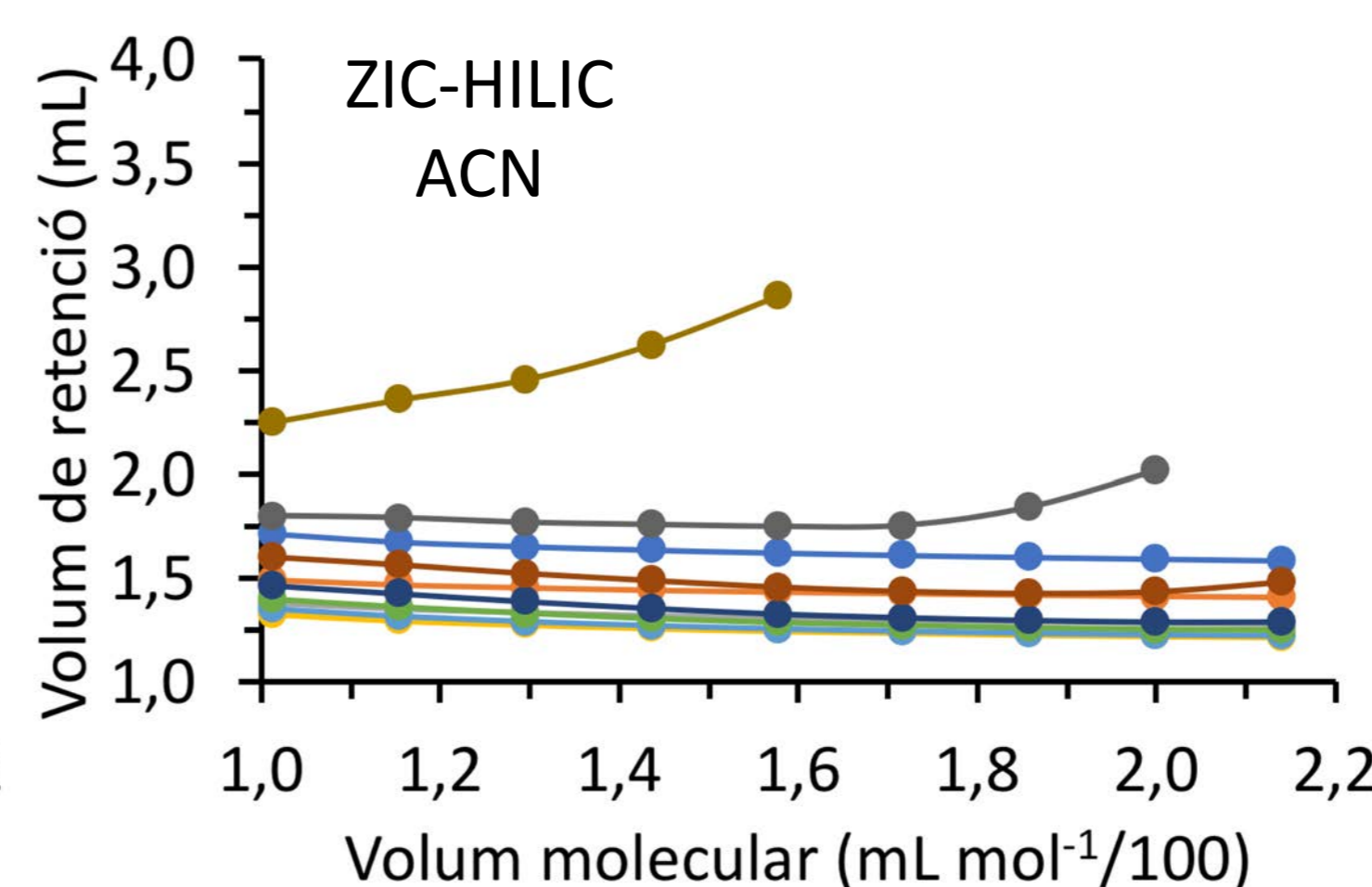
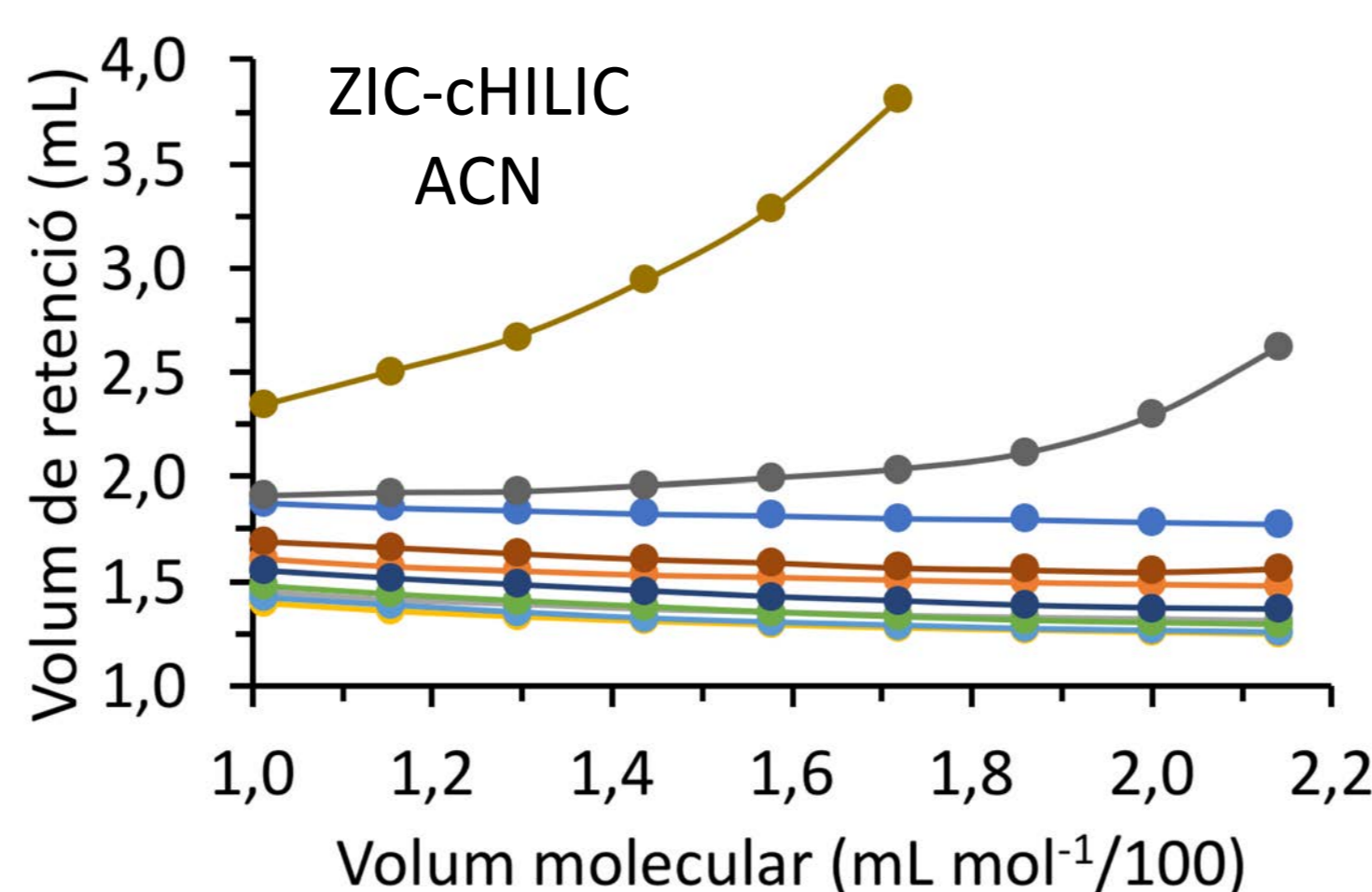


Columnes cromatogràfiques:

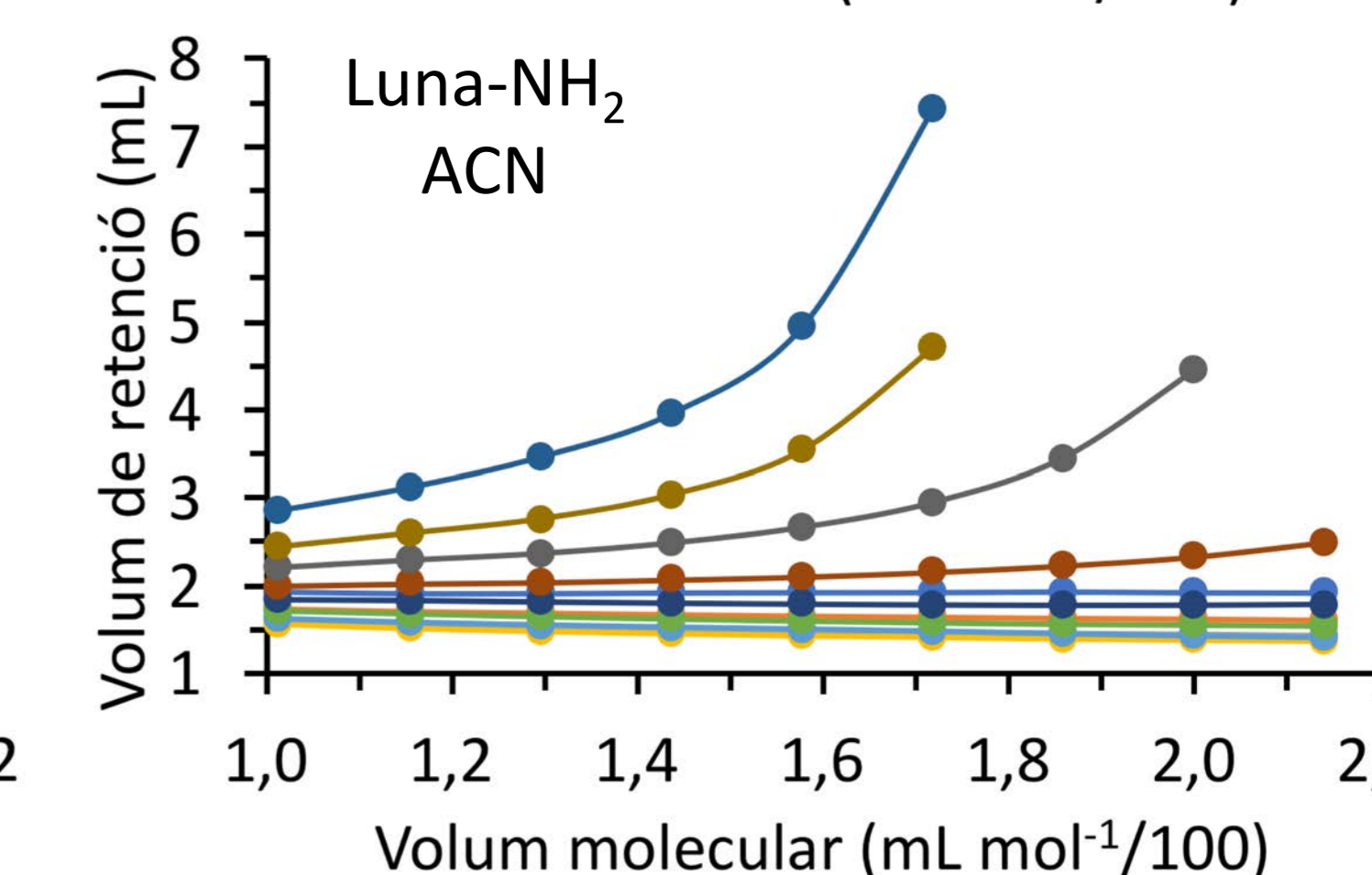
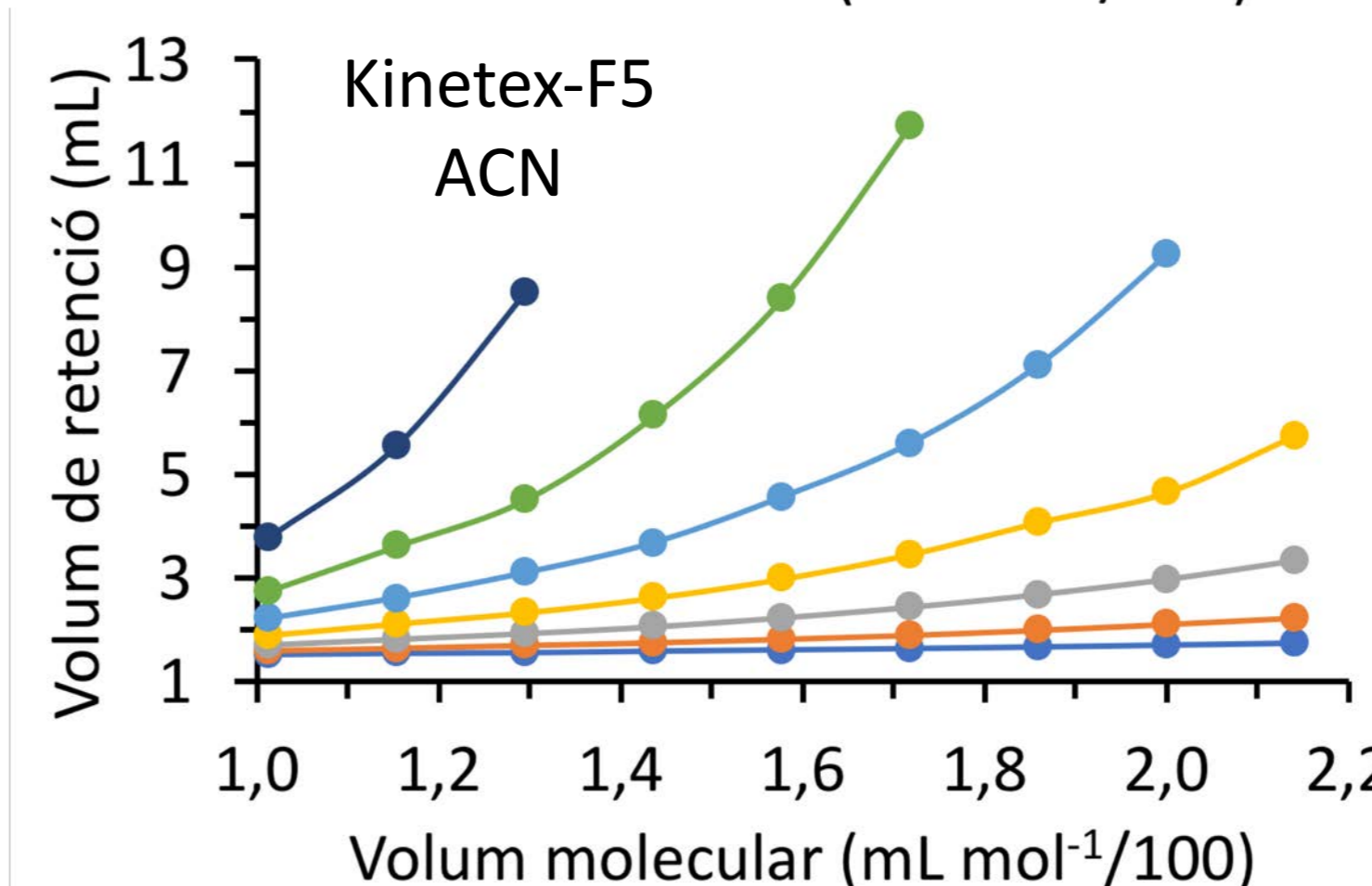
- **ZIC-cHILIC:** Fosforilcolina (Suport de sílice).
- **ZIC-HILIC:** Sulfobetaina (Suport de sílice).
- **ZIC-pHILIC:** Sulfobetaina (Suport polimèric).
- **Kinetex-F5:** Pentafluorofenil (Suport de sílice).
- **Luna-NH<sub>2</sub>:** Amina (Suport de sílice).

En general, a partir del 50% de modificador orgànic el comportament passa d'HILIC a fase invertida.

La Kinetex-F5 manté el comportament de fase invertida per totes les concentracions.



Contingut de modificador orgànic:



## Mètode picnòmetric per a la mesura del volum mort

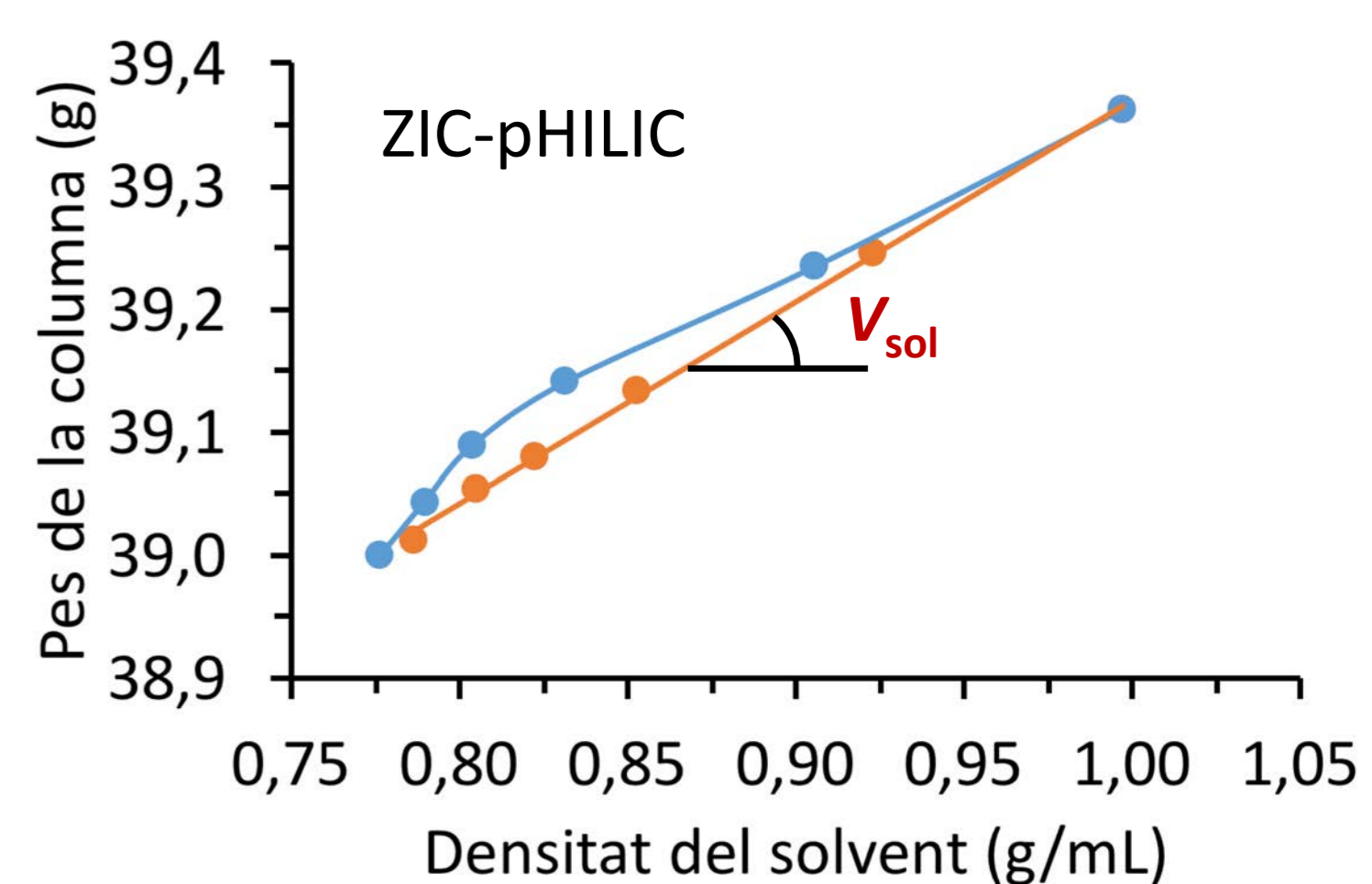
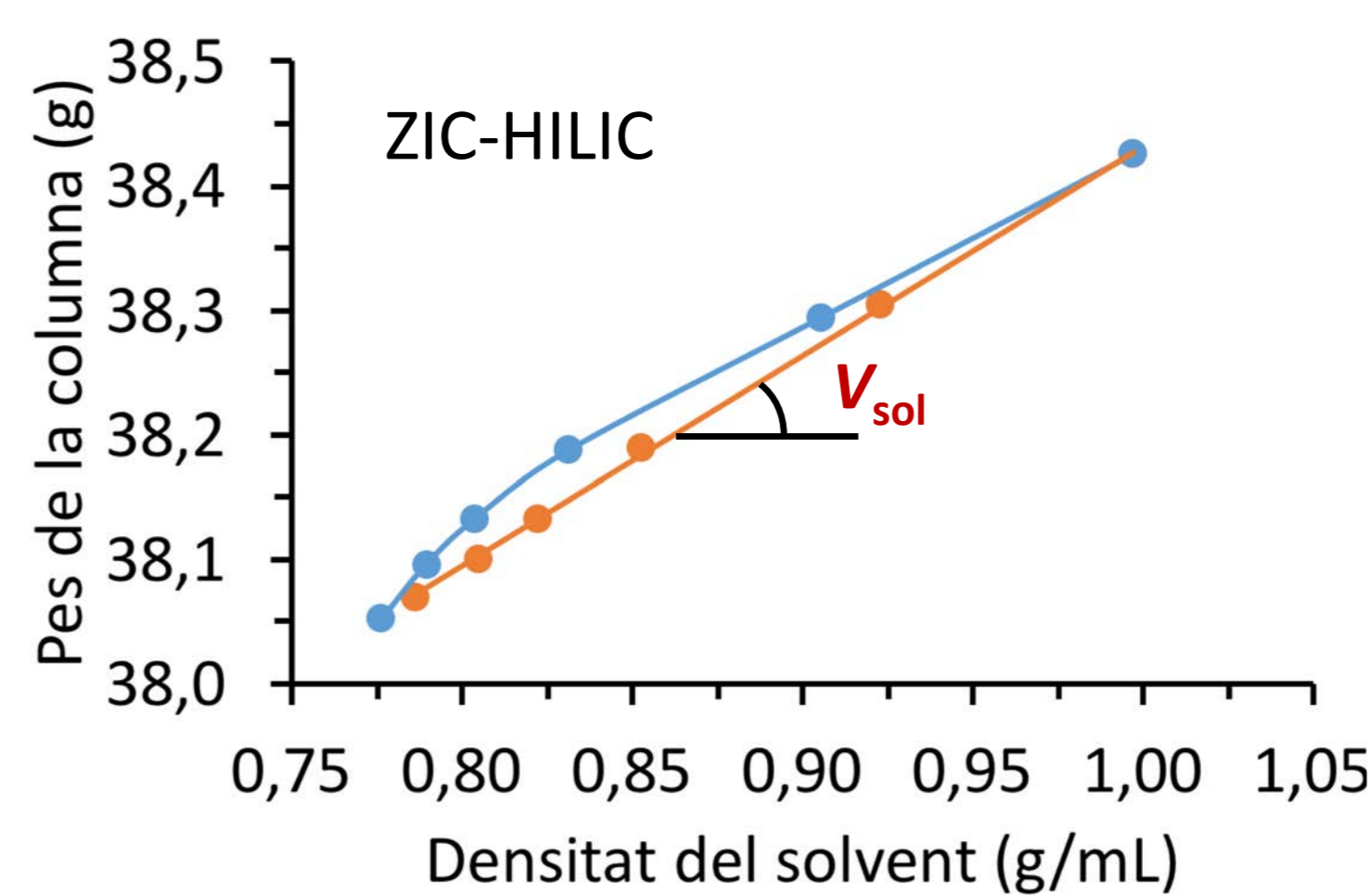
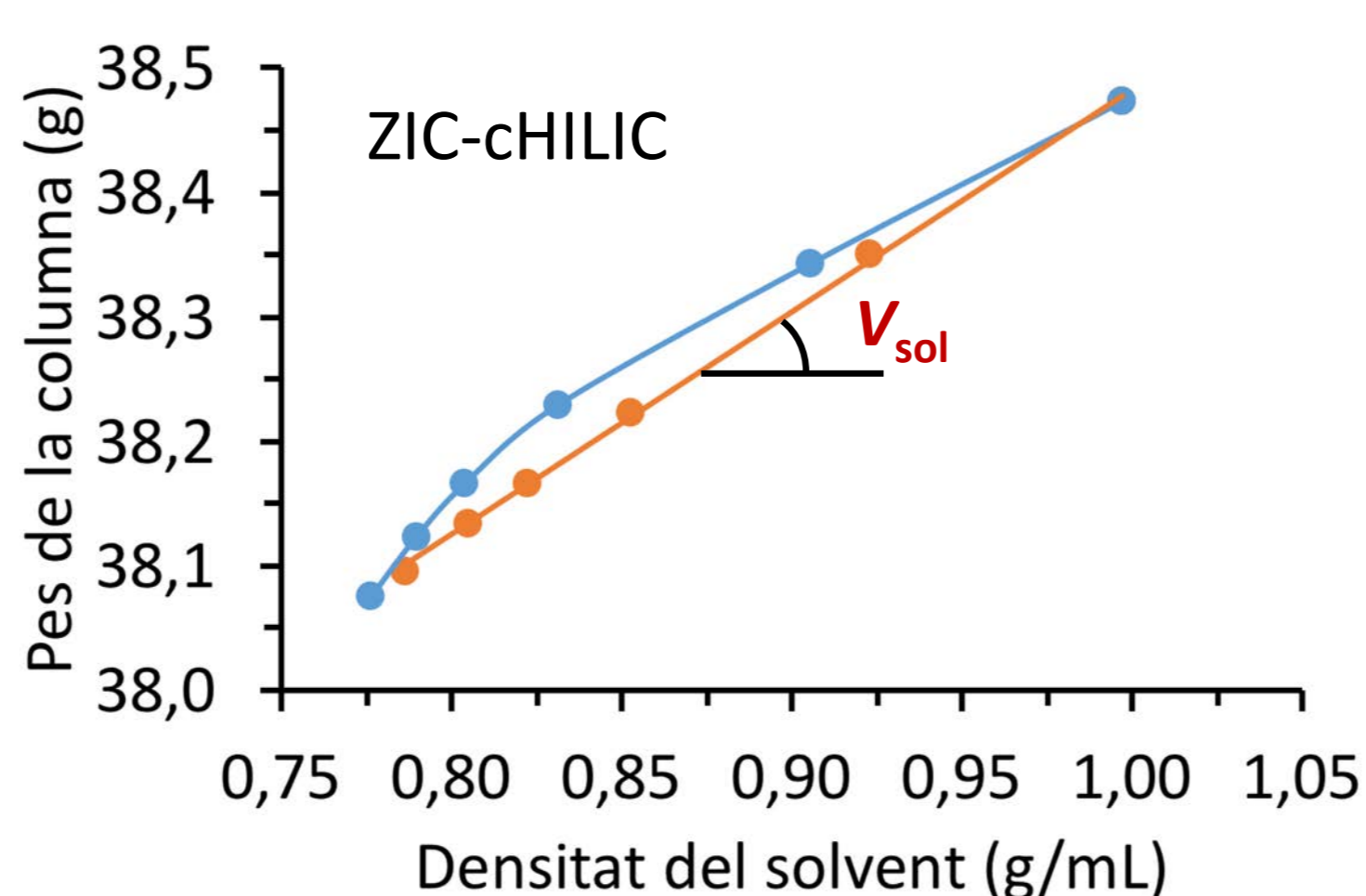
$$w_{col} = w_{ct} + w_{sol}$$

$$w_{col} = w_{ct} + V_{sol} \cdot \rho_{sol}$$

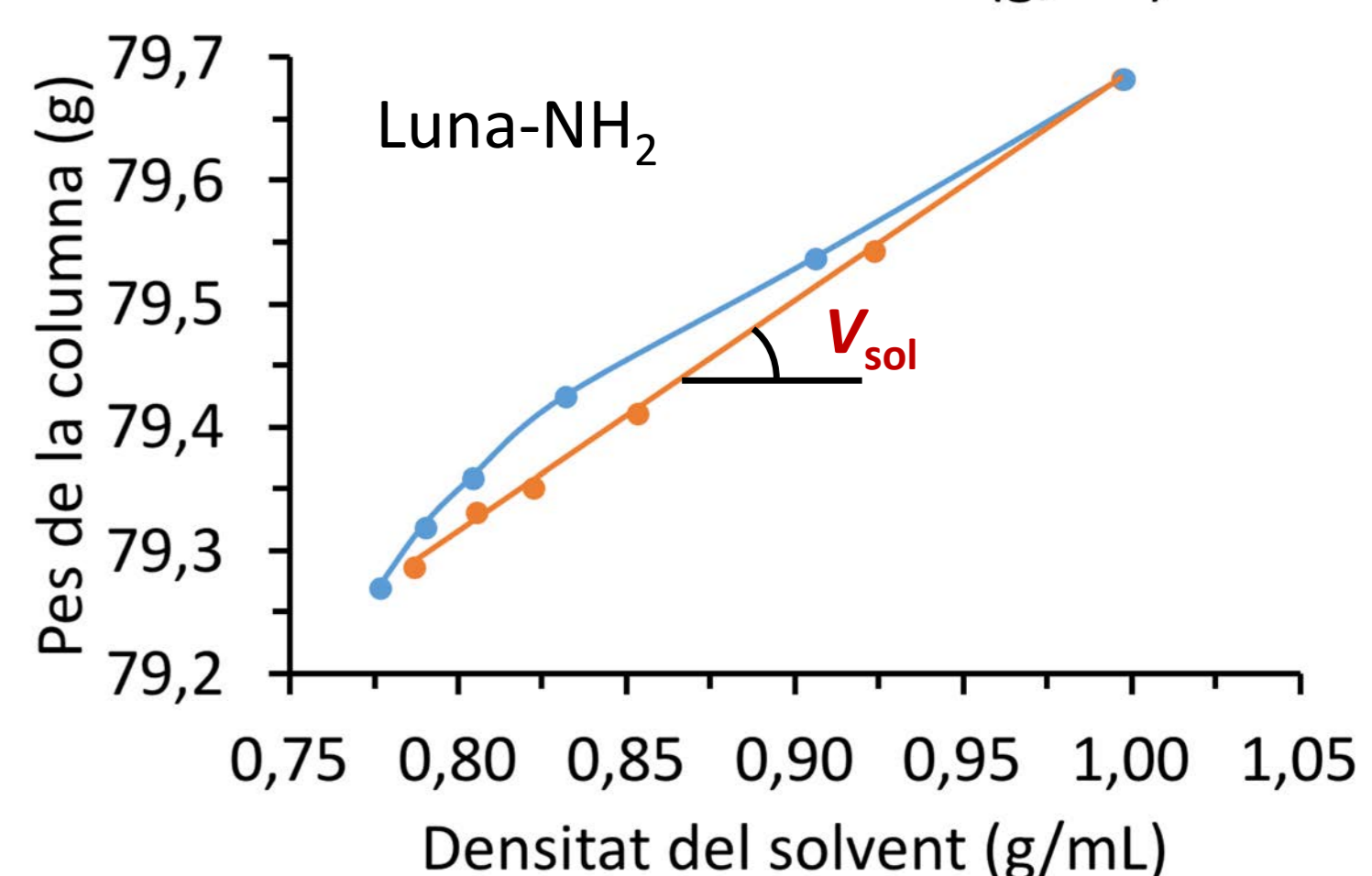
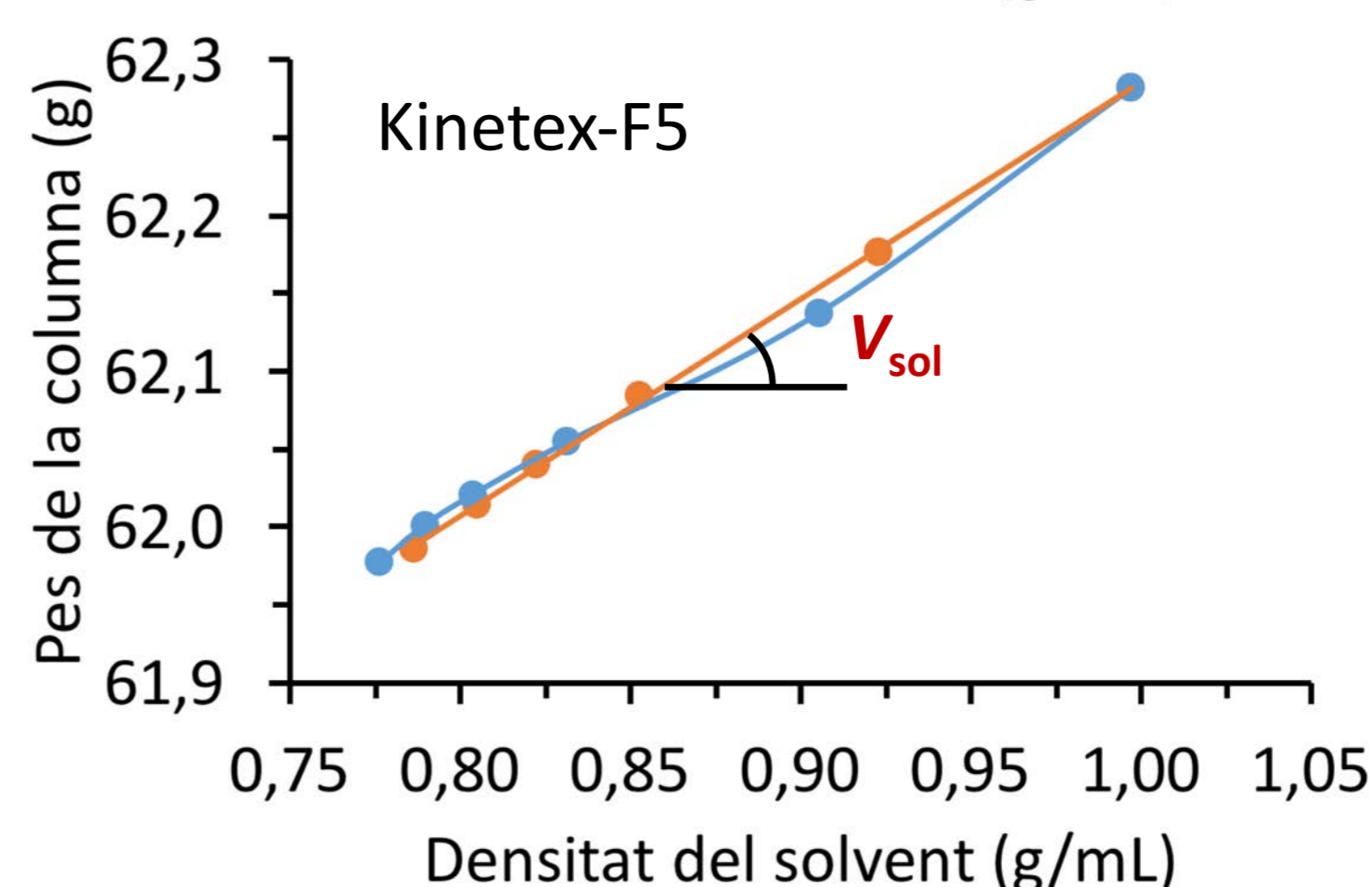
$w_{col}$  pes total de la columna

$w_{ct}$  pes del tub, l'empaquetament i els taps de la columna

$w_{sol}$ ,  $V_{sol}$  i  $\rho_{sol}$  pes, volum i densitat del solvent dins la columna.



Contingut de modificador orgànic:



El pendent de la recta és el volum total de solvent dins la columna.

La relació lineal només es dona quan s'utilitza MeOH com a solvent (Excepte la Kinetex-F5).

En el cas de l'ACN, s'observen dos comportaments lineals ben diferenciats (Del 100% al 90% i del 80% al 0% de solvent orgànic).

## Comparació entre els mètodes picnòmètrics i les sèries homòlogues per a columnes HILIC

Volum de solvent (mL)		ZIC-cHILIC	ZIC-HILIC	ZIC-pHILIC	Kinetex-F5	Luna-NH <sub>2</sub>	
Mètode picnòmetric	aigua/MeOH purs	1,67	1,80	1,69	1,41	1,89	
	aigua/ACN purs	1,69	1,81	1,69	1,38	1,88	
	aigua/MeOH mescla	1,64	1,79	1,69	1,39	1,87	
	aigua/ACN mescla	100-90%	3,26	3,31	2,94	1,34	3,24
		80-0%	1,34	1,47	1,44		
Sèries homòlogues	100% MeOH	1,46	1,59	1,47	1,38	1,62	
	90% MeOH	1,53	1,57	1,47	1,42	1,71	
	80% MeOH	1,99	1,55	1,48	1,65	1,79	
	100% ACN	1,39	1,69	1,52	1,39	1,36	
	90% ACN	1,24	1,42	1,35	1,40	1,20	
80% ACN	1,19	1,26	1,25	1,44	1,16		

El volum ajustat a partir de les sèries homòlogues proporciona informació sobre el volum de solvent mòbil. Les mesures picnòmètriques amb solvents purs permeten determinar el volum total de solvent dins de la columna. La diferència entre el volum total i el volum de solvent mòbil serà la proporció de solvent que es troba solvatant la fase estacionària, i per tant, immòbil.

Pel mètode picnòmetric, hi ha similitud entre els volums obtinguts utilitzant solvents purs (aigua/MeOH i aigua ACN) i també entre les mescles aigua/MeOH. Les diferències s'observen en el cas d'aigua/ACN.

Per a les sèries homòlogues, en augmentar el contingut d'aigua en la fase mòbil que conté ACN, el volum ocupat pel solvent mòbil disminueix. En MeOH s'observa la tendència contrària.