

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA

**Estrategias para mejorar la calidad de las separaciones en
Cromatografía Líquida de Fase Inversa**

***Strategies to improve the separation performance in Reversed-
Phase Liquid Chromatography***

MEMORIA que para alcanzar el GRADO de DOCTOR
por la UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
presenta la MASTER Casandra Ortiz Bolsico
Programa de Doctorado de Química

Directores: María Celia García Álvarez-Coque
José Ramón Torres Lapasió
María José Ruíz Ángel

Valencia, Abril de 2015



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

MARÍA CELIA GARCÍA ÁLVAREZ COQUE, MARÍA JOSÉ RUÍZ ÁNGEL y JOSÉ RAMÓN TORRES LAPASÍO, Catedrática de Universidad y Profesores Titulares de la Universidad de Valencia, respectivamente, adscritos al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN

que la presente Memoria, “*Estrategias para mejorar la calidad de las separaciones en cromatografía líquida de fase inversa*”, constituye la Tesis Doctoral de

CASANDRA ORTIZ BOLSICO

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo, como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Burjassot, a veinte de abril de dos mil quince.

María Celia García Álvarez-Coque

José Ramón Torres Lapasió

María José Ruíz Ángel

Dice Jacques Derrida que es importante diferenciar el tiempo que requiere una Tesis Doctoral y el tiempo que requiere llegar a ser doctor. Una Tesis Doctoral dura un tiempo concreto que se acaba cuando alcanzamos unas conclusiones y se presenta el recorrido que nos ha llevado hasta ellas por escrito. En cambio, llegar a ser doctor implica adoptar una actitud vital diferente que no abandonaremos nunca. Lo único que se abandona es la seguridad de las certezas para aprender a caminar en la incertidumbre.

A mis directores

A mi familia

A Blas

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos aquéllos que me han ayudado a llevar a cabo de una u otra forma el trabajo de investigación que aquí se presenta.

En primer lugar, deseo agradecer a los Ministerios de Educación, Ciencia e Innovación (MEC) y de Economía y Competitividad (MINECO) la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida, así como la financiación concedida a los Proyectos CTQ2010-160107BQU y CTQ2013-42558-P, de la que he sido beneficiaria.

También deseo manifestar mi gratitud al Grupo de Estudios Fundamentales en Cromatografía (FUSCHROM) por haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para realizar mi trabajo. Por supuesto, a mis directores de Tesis Doctoral, la Profesora María Celia García Álvarez-Coque por depositar su confianza en mí para formar parte de su equipo investigador y por darme apoyo de una manera decidida y constante durante todo este período, sin importar horarios. Al Profesor José Ramón Torres Lapasió, por haberse dedicado con una paciencia y una entrega encomiables a mi formación en el ámbito científico, por su confianza en mis capacidades y por la ejecución de todo el trabajo de programación desarrollado en esta Tesis. Sin su ayuda no hubiera sido posible. Y a la Profesora María José Ruiz Ángel por aceptar el reto de formarme y estar siempre pendiente de mí, brindándome su apoyo y sus conocimientos. Gracias por los consejos recibidos y su gran humanidad.

Quiero también nombrar al Profesor Juan José Baeza Baeza, por hacerme partícipe de sus brillantes y genuinas ideas. A él quiero dedicarle los Capítulos 3 y 4 de esta Tesis.

Gracias al Profesor Peter Schoenmakers y a su grupo de investigación de la Universiteit van Amsterdam (UVA), por haberme acogido y apoyado durante los meses de estancia en Amsterdam. A mis compañeros de despacho de ese laboratorio, Michael, Martin, Michelle y Henrick, por su inestimable ayuda y su gran amistad. A todos aquéllos que me hicieron agradable la estancia en Amsterdam: Muzi, Anna, Alina, Katia, Andrei, Bob, Iana, Maria, Chris, Anoka y Aadrian.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Química Analítica: Juanlu, Marina, Miriam, María Jesús, Marías, Aarón, Isa, Enrique, Mery, Sonia, Rodrigo, Xavi, Neus, Anabel, Diego, Lucía, Alba, Merce, Pili, Tamara, Antonio, Ester, Elsa y Maite, gracias por todo y a todos; no podría pedirlos nada más. Especialmente quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Juanjo, Sandra y Juan (¡el moderno!) todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por sus consejos y ayuda prestada durante estos años.

Por último, y no menos importante, a mi familia y amigos que siempre han estado muy próximos a mí y han hecho suyos mis anhelos, ilusiones y contrariedades, brindándome su calor y ayudándome a superar los momentos más difíciles.

A mis grandes amigas, Vero, Sonia, Gloria e Isa, que siempre están ahí y con quienes he vivido unos años plagados de gratisimas experiencias que, por supuesto, siempre quedarán entre nosotras.

A mis primas, Carla y María, quienes me han ofrecido un amor incondicional estos últimos años, me han hecho reír en los peores momentos y siempre han apoyado mi carrera.

Gracias a mi familia, a mi padre y a mi madre (a los que debo todo lo que soy y lo que pueda llegar a ser), a mi hermano (su vitalidad y cariño desbordante), a Dani (con el que siempre puedo contar) y por supuesto a mis abuelos Idelfonsa y Fernando por enseñarme que con trabajo duro todo es posible, y en especial a mis abuelos Pepe y Amparo, pilares fundamentales en mi vida.

Dejo para el final a Blas, la persona que lleva soportándome todo este tiempo, y que sigue a mi lado, haciéndome tan feliz como el primer día, a pesar de todos mis defectos. Gracias a ti sé lo que significa que te quieran como eres, que te den todo sin pedir nada a cambio, que te hagan sentir afortunada. Gracias por tu apoyo, por ser compañero de viaje, porque sé que, suceda lo que suceda, nunca estaré sola.

A todos aquéllos que, de alguna u otra manera, han contribuido a que esta Tesis Doctoral llegara a buen puerto.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE**OBJECTIVES AND DEVELOPMENT OF THE RESEARCH 1****CAPÍTULO 1: Introducción general: Modelización de la retención en
cromatografía líquida de fase inversa y uso de equilibrios
secundarios 17**

- 1.1. Cromatografía líquida de fase inversa 19
- 1.2. Modelización del comportamiento cromatográfico 22
 - 1.2.1. Elución isocrática 23
 - a) Modelos polinómicos para describir la retención utilizando
el contenido de modificador orgánico como factor 23
 - b) Modelos de polaridad 25
 - c) El pH como factor experimental 27
 - 1.2.2. Estimación del tiempo muerto 31
 - a) Métodos estáticos 32
 - b) Métodos dinámicos 33
 - 1.2.3. Efecto de la temperatura 36
 - 1.2.4. Mejorando la predicción de la retención 38
 - a) Consideraciones prácticas 38
 - b) Influencia del proceso de regresión en la calidad de las
predicciones 39
 - 1.2.5. Elución en gradiente 42
 - a) Integración de la ecuación fundamental para la elución en
gradiente 43
 - b) Modelos de retención no integrables 44
 - 1.2.6. Optimización interpretativa asistida por ordenador 46

1.2.7. Medida de la resolución.....	49
a) Criterios clásicos de resolución elemental.....	49
b) Pureza de pico.....	51
1.3. Uso de equilibrios secundarios en RPLC	54
1.3.1. Mecanismo de retención en cromatografía de interacción iónica	56
1.3.2. El efecto silanol y su supresión con aditivos	59
1.3.3. Uso de iones caotrópicos y líquidos iónicos	61
1.3.4. La cromatografía líquida micelar	62
a) Existencia de un equilibrio secundario adicional en la fase móvil	62
b) Cromatografía líquida micelar híbrida	63
1.4. Referencias	65

CAPÍTULO 2: Modelización de la retención y del perfil de los picos en cromatografía líquida de fase inversa utilizando elución en gradiente.....	73
2.1. Summary	75
2.2. Introducción.....	76
2.3. Parte experimental	79
2.3.1. Reactivos y columnas	79
2.3.2. Instrumentación	81
2.4. Base teórica	81
2.4.1. Ecuaciones analíticas basadas en modelos de retención integrables para describir la elución en gradiente	81

a) Modelo de la fuerza eluyente del disolvente.....	81
b) Modelo de Jandera para cromatografía líquida de fase normal	83
2.4.2. Métodos para describir la elución en gradiente basados en modelos de retención más complejos	83
2.5. Resultados y discusión.....	86
2.5.1. Comportamiento de retención y modelos en elución isocrática.....	86
2.5.2. Comportamiento de retención en elución en gradiente	87
2.5.3. Exactitud de los modelos de retención en elución en gradiente	91
2.5.4. Descripción de los perfiles de los picos cromatográficos	96
2.5.5. Modelos del perfil de los picos en elución isocrática y en gradiente	98
2.6. Conclusiones	103
2.7. Referencias.....	105

CAPÍTULO 3: Desarrollo de nuevos algoritmos para describir picos cromatográficos basados en modelos gaussianos modificados	111
3.1. Summary	113
3.2. Introducción.....	114
3.3. Parte experimental	118
3.3.1. Reactivos.....	118
3.3.2. Instrumentación	119

3.4. Base teórica	119
3.4.1. Modelos para predecir perfiles de pico.....	119
a) Método I: Modelo gaussiano puro	120
b) Método II: modelo LMG	121
c) Método III: modelo PVMG	122
d) Método IV: modelo PLMG	124
e) Método V: Métodos simplificados para el modelo PLMG.....	126
3.4.2. Ajuste de los picos experimentales.....	130
3.5. Resultados y discusión.....	132
3.5.1. Evaluación de la capacidad de ajuste y predicción para los métodos propuestos	132
3.5.2. Ajuste de picos experimentales	133
3.5.3. Predicción de perfiles de pico	137
3.6. Conclusiones	142
3.7. Referencias.....	143

CAPÍTULO 4: Implementación de gradientes de disolvente orgánico en cromatografía líquida micelar utilizando Drylab®: Separación de compuestos básicos en muestras de orina	147
4.1. Summary	149
4.2. Introducción.....	150
4.3. Parte experimental	156
4.3.1. Reactivos y columnas	156
4.3.2. Instrumentación	157

4.4. Resultados y discusión	158
4.4.1. Separación isocrática de β -bloqueantes	158
a) Ensayos preliminares	158
b) Uso de fases móviles híbridas de SDS y 1-propanol	160
4.4.2. Ensayos preliminares utilizando gradientes en MLC	162
4.4.3. Re-equilibrado de la columna	167
4.4.4. Uso de DryLab® para optimizar gradientes de disolvente orgánico en MLC/HSLC con inyección directa	173
a) El software DryLab®	173
b) Análisis de muestras de orina	175
c) Optimización del protocolo de gradiente	177
4.5. Conclusiones	182
4.6. Referencias	185

CAPÍTULO 5: Adsorción del surfactante aniónico dodecilsulfato sódico sobre una fase estacionaria C₁₈ bajo condiciones micelares y submicelares en cromatografía líquida de fase inversa.....	191
5.1. Summary	193
5.2. Introducción.....	194
5.3. Parte experimental	197
5.3.1. Reactivos.....	197
5.3.2. Instrumentación y columna.....	198
5.3.3. Metodología empleada en los estudios de adsorción utilizando cromatografía frontal.....	199

5.4. Resultados y discusión.....	201
5.4.1. Desorción del surfactante de la fase estacionaria	201
5.4.2. Medida de la cantidad de SDS adsorbido bajo condiciones micelares y submicelares empleando el método de cromatografía frontal	204
5.4.3. Revelación de la adsorción del SDS bajo condiciones micelares y submicelares a partir de los tiempos de retención y forma de los picos cromatográficos.....	208
5.5. Conclusiones	216
5.6. Referencias.....	217

CAPÍTULO 6: Cromatografía líquida micelar con Brij-35 utilizando elución isocrática y en gradiente	221
6.1. Summary	223
6.2. Introducción.....	224
6.3. Parte experimental	228
6.3.1. Reactivos, columna e instrumentación	228
6.3.2. Procedimiento	231
6.4. Resultados y discusión	232
6.4.1. Comentarios sobre la capacidad del Brij-35 como modificador en MLC.....	232
6.4.2. Comportamiento cromatográfico de las sulfonamidas y flavonoides utilizando MLC con Brij-35.....	236
a) Elución isocrática	236
b) Elución en gradiente.....	240

6.4.3. Descripción de la retención.....	243
a) Elución isocrática	243
b) Elución en gradiente	248
6.4.4. Descripción del perfil de pico	250
a) Elución isocrática	250
b) Elución en gradiente	253
6.5. Conclusiones	258
6.6. Referencias	260

CAPÍTULO 7: Estudio comparativo de diversos líquidos iónicos de imidazolio como aditivos en cromatografía líquida de fase inversa para la determinación de compuestos básicos..... 265

7.1. Summary	267
7.2. Introducción.....	268
7.3. Parte experimental	273
7.3.1. Reactivos	273
7.3.2. Instrumentación y columna	276
7.4. Resultados y discusión	277
7.4.1. Efecto de las aminas sobre la separación de los β -bloqueantes	278
7.4.2. Efecto de los líquidos iónicos de imidazolio sobre la separación de los β -bloqueantes	282
a) Efecto del catión	282
b) Influencia de los aniones de los líquidos iónicos con afinidad por la fase estacionaria	287
7.4.3. Forma de los picos cromatográficos en presencia de aditivos catiónicos	291

7.5. Conclusiones	298
7.6. Referencias	301

CAPÍTULO 8. Comparación de dos sistemas de columnas acopladas en serie y software de optimización en cromatografía líquida isocrática para resolver mezclas complejas	307
8.1. Summary	309
8.2. Introducción	310
8.3. Parte experimental	313
8.3.1. Reactivos.....	313
8.3.2. Instrumentación y sistemas de columnas acopladas.....	314
8.4. Base teórica	318
8.4.1. Predicción de tiempos de retención para columnas acopladas en serie	318
8.4.2. Predicción del perfil de pico para columnas acopladas en serie.....	321
8.5. Resultados y discusión.....	323
8.5.1. Ventajas y limitaciones del acoplamiento de columnas en serie.....	323
8.5.2. Robustez de los sistemas acopladores de columnas	325
a) Uso de carcasas de material PEEK para unir columnas en serie	325
b) Uso de conectores externos ZDV para unir las columnas	330
8.5.3. Directrices para construir un software de optimización	332
8.5.4. Resolución y tiempo de análisis para las columnas individuales.....	334

8.5.5. Predicción de cromatogramas para las columnas combinadas	338
8.5.6. Perfiles de pico	344
8.6. Conclusiones	348
8.7. Referencias	349

**CAPÍTULO 9: Optimización simultánea de la composición de la fase
móvil y de la naturaleza y la longitud de las columnas
para analizar muestras complejas con columnas
acopladas en serie**

9.1. Summary	357
9.2. Introducción	358
9.3. Parte experimental	361
9.4. Base teórica	362
9.4.1. Columnas de referencia	362
9.4.2. Predicción de la retención para las columnas acopladas en serie.....	363
9.4.3. Modelización de la retención en función de la composición de la fase móvil.....	365
9.4.4. Predicción del perfil de pico para columnas acopladas en serie	366
9.4.5. Problemas prácticos en la implementación de métodos de columnas acopladas en serie	369
9.5. Resultados y discusión.....	371
9.5.1. Optimización de la composición de la fase móvil para las columnas utilizadas individualmente	371

9.5.2. Optimización de la naturaleza y la longitud de las columnas a una composición de fase móvil pre-seleccionada	374
9.5.3. Optimización simultánea de la composición de la fase móvil, y de la naturaleza y la longitud de las columnas	379
9.5.4. Exactitud de las predicciones	380
9.5.5. Optimización de columnas acopladas en serie empleando un pequeño número de longitudes de columnas	383
9.6. Conclusiones	385
9.7. Referencias	388

**CAPÍTULO 10: Optimización de la elución en gradiente con columnas
acopladas en serie**

Parte I: Gradientes lineales simples	393
10.1. Summary	395
10.2. Introducción.....	396
10.3. Parte experimental	399
10.4. Predicción de la elución en gradiente para columnas acopladas en serie	400
10.4.1. Descripción de la retención.....	400
a) Ecuación fundamental para la elución en gradiente	400
b) Integración numérica para columnas acopladas en serie	401
10.4.2. Predicción de los perfiles de pico y resolución cromatográfica.....	406
10.5. Resultados y discusión	407
10.5.1. Exactitud de las predicciones	407
10.5.2. Pre-selección del gradiente	412
10.5.3. Pre-selección de la combinación de columnas	417
10.5.4. Tiempo de cálculo para las dos estrategias	422

10.6. Conclusiones	423
10.7. Referencias	426

CAPÍTULO 11: Optimización de la elución en gradiente con columnas acopladas en serie

Parte II: Gradientes multi-lineales	429
11.1. Summary	431
11.2. Introducción	432
11.3. Parte experimental.....	434
11.4. Base teórica.....	434
11.4.1. Integración de la ecuación fundamental	435
11.4.2. Protocolo a seguir para considerar los retrasos del frente de disolvente dentro de una columna.....	437
11.4.3. Diseño de gradientes multi-lineales.....	439
11.4.4. Optimización de gradientes multi-lineales.....	441
11.5. Resultados y discusión	444
11.5.1. Uso de columnas individuales con elución isocrática y en gradiente	444
11.5.2. Selección de la mejor combinación de columnas acopladas.....	446
11.5.3. Elución en gradiente utilizando columnas acopladas en serie	449
a) Orden de las columnas	449
b) Selección de los mejores gradientes multi-lineales	454
c) Fiabilidad de las predicciones	460
11.6. Conclusiones	463
11.7. Referencias	465

GENERAL CONCLUSIONS	467
C.1. Fundamental studies in RPLC	469
C.1.1. Modelling of peak retention and profile in RPLC.....	469
C.1.2. Development of new algorithms to describe chromatographic peaks based on modified Gaussian models	471
C.2. Secondary equilibria in RPLC	473
C.2.1. Implementation of organic solvent gradients in micellar liquid chromatography using Drylab®: Separation of basic compounds in urine samples.....	473
C.2.2. Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate on a C ₁₈ stationary phase under micellar and submicellar conditions in RPLC	475
C.2.3. Micellar liquid chromatography using Brij-35 in isocratic and gradient elution	476
C.2.4. Comparative study of several imidazolium ionic liquids as additives in RPLC for the determination of basic compounds.....	478
C.3. Optimisation of serially-coupled columns in RPLC	481
C.3.1. Comparison of two serially-coupled column systems and optimisation software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures.....	481
C.3.2. Simultaneous optimisation of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially-coupled columns.....	483
C.3.3. Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns Part I: Simple linear gradients	484
C.3.4. Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns Part II: Multi-linear gradients	486
PUBLISHED WORK	489

**OBJECTIVES AND
DEVELOPMENT OF THE RESEARCH**

High performance liquid chromatography (HPLC) is currently the most widely used analytical separation technique, due to its applicability, reliability, robustness and sensitivity. Unfortunately, the efficiency in HPLC is usually smaller than that achieved in gas chromatography, capillary electrophoresis and other electromigration techniques. This constrains the analysis of complex samples. Hence, the high effort dedicated to increase the efficiency and selectivity in HPLC, with significant improvements since the beginning of the technique. Despite the progress in the last decades with the development of increasingly more sophisticated instrumentation (including the introduction of ultra-high pressure pumps), and the advances in the column technology (with the synthesis of new supports and stationary phases), there are still challenges to resolve.

The PhD. work collected in this Project was started according to the following objectives, whose main results are briefly summarised:

Objective 1. Characterisation of the capability of the columns used in HPLC.

Throughout the development of the PhD. work, several fundamental advances of general interest have been carried out, concerning the description of the behaviour observed in isocratic and gradient elution, using single and coupled columns. Several developments should be highlighted: (i) The proposal of plots that provide information on the kinetics of solute-stationary phase interactions, (ii) the simplification of the description of the retention in gradient elution, and (iii) the development of better models to describe chromatographic peaks.

Objective 2. Modification of the stationary phase through the introduction of additives in the mobile phase. The modification of the selectivity of chromatographic columns through the use of additives (surfactants, amines and ionic liquids) has been addressed. The main interest of these reagents lies in the ability to minimise the effect of residual silanols on the separation of basic compounds, which give rise to broad and asymmetrical peaks using conventional mobile phases in reversed-liquid chromatography (in the absence of additives). Several fundamental studies were carried out: (i) The evaluation of the adsorbed amount of sodium dodecyl sulphate (SDS) on the stationary phase, (ii) the measurement of the suppression potency of the silanol effect, and (iii) the development of gradients using eluents that contain a surfactant (SDS or Brij-35).

Objective 3. Combination of separation mechanisms for resolving complex mixtures. The traditional strategy of using a single analytical column in HPLC is often not able to resolve many separation problems. Multi-column strategies have been proposed as a solution. Thus, in 2006, Nyiredy *et al.* revived the interest of using serially-coupled columns exhibiting different separation mechanisms, through a patent with Bischoff Chromatography, marketed under the trade name POPLC. In this system, an isocratic mobile phase or fixed gradient was used, which was flushed through the combined columns. However, the POPLC system revealed significant mechanical and technical deficiencies, to which the dependence on a single manufacturer should be added. For this reason, a much more robust, reliable and universal alternative was developed using zero dead volume column couplers, which allow the connection of columns from different manufacturers. The approach was boosted through the development of a powerful interpretive optimisation strategy. Serial coupling of columns with different retention mechanisms has

proved to be a powerful method that can generate a wide range of selectivity, greatly increasing the chances of resolution in HPLC, while decreasing the analysis time.

The research work leading to the PhD. degree in Chemistry was started in september 2011, once the Master degree on "Experimental techniques in Chemistry" taught by the Departments of Analytical Chemistry and Inorganic Chemistry (University of Valencia) was finished. The experimental work reflected in this Project was developed in the Department of Analytical Chemistry (University of Valencia), under the supervision of Professors María Celia García Álvarez-Coque, José Ramón Torres Lapasió and María José Ruíz Ángel. Acknowledge should be also given to the assistance of Professor Juan José Baeza Baeza in several fundamental studies.

The PhD. period included a four-month stay (May to August 2013) in the van't Hoff Institute for Molecular Sciences (University of Amsterdam, The Netherlands), under the supervision of Prof. Peter Schoenmakers, working in the field of two-dimensional liquid chromatography and hydrophilic liquid chromatography (HILIC), framed in the contract entitled "Rigorous optimisation of LC×LC", funded by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). This work obtained the first award to the best poster in the XIII SECyTA congress held in Tenerife in October 2013. Also, in the "14^{as} Jornadas de Análisis Instrumental" held in Barcelona in October 2014, a poster presenting the optimisation of serially-coupled columns was selected as finalist to the poster awards.

The work here presented has implied a large experimental effort, designed to explore and extract information on the chromatographic behaviour of compounds of different nature (sulphonamides, β -blockers, diuretics and

flavonoids, among others), in diverse columns and experimental conditions (with acetonitrile-water mobile phases in the absence and presence of surfactants, amines and ionic liquids). The work has also involved an extensive data treatment, mainly related with the construction of models to predict the chromatographic retention, peak shape and resolution of mixtures of compounds, with optimisation purposes.

The large effort in several literature surveys on the different topics investigated in this work should be also highlighted. This has implied the search, reading and organisation of a large amount of valuable information that is properly reflected in each part of the PhD. Project.

All developments, along with other fundamental advances, are collected along 10 chapters, and reported in several scientific articles, to which a chapter for the *Analytical Separation Science Series* should be added, which is summarised in the introduction of this work. The published work directly related to the chapters in this PhD. Project (in order of publication) are:

1. J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
New approaches based on modified Gaussian models for the prediction of chromatographic peaks
Analytica Chimica Acta 758 (2013) 36–44.
2. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Comparison of two serially-coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures
Journal of Chromatography A 1281 (2013) 94–105.
Invited article included in the special issue dedicated to Marja-Liisa Riekkola, editor of the journal.

3. J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography
Journal of Chromatography A 1284 (2013) 28–35.
4. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Simultaneous optimization of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially coupled columns
Journal of Chromatography A 1317 (2013) 39-48.
5. J. Rodenas Montano, C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Implementation of gradients of organic solvent in micellar liquid chromatography using DryLab®: Separation of basic compounds in urine samples
Journal of Chromatography A 1344 (2013) 31–41.
6. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns. Part I: Single linear gradients
Journal of Chromatography A 1350 (2014) 51–60.
7. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns. Part II: Multi-linear gradients
Journal of Chromatography A 1373 (2014) 51–60.
8. C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate on a C18 column under micellar and high submicellar conditions
Journal of Separation Science 38 (2015) 550–555.

9. M.T. Úbeda Torres, C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Gaining insight in the behaviour of imidazolium-based ionic liquids as additives in reversed-phase liquid chromatography for the analysis of basic compounds
Journal of Chromatography A 1380 (2015) 96–103.
10. M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico
Modelling the chromatographic behaviour in RPLC
Analytical Separation Science Series (edited by J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez, A.M. Stalcup), Vol. 1, Wiley, New York (in press).
11. E. Peris García, C. Ortiz Bolsico, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque
Isocratic and gradient elution in micellar liquid chromatography with Brij-35
Journal of Separation Science (in press, 2015).

Some aspects in this PhD. Project are included partially in the following articles:

12. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Approaches to find complementary separation conditions for resolving complex mixtures by high-performance liquid chromatography
Journal of Chromatography A 1229 (2012) 180–189.
13. E. Cabo Calvet, C. Ortiz Bolsico, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque
Description of the retention and peak profile for Chromolith columns in isocratic and gradient elution using mobile phase composition and flow rate as factors
Chromatography (Open Access) 1 (2014) 194–210.

14. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Optimisation of chromatographic resolution using objective functions including both time and spectral information
Journal of Chromatography A 1377 (2015) 75–84.
15. T. Álvarez Segura, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Serial versus parallel columns using isocratic elution: A comparison of multi-column approaches in mono-dimensional liquid chromatography
Journal of Chromatography A 1390 (2015) 95–102.
16. J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Prediction of peak shape and characterisation of the column performance in high-performance liquid chromatography as a function of flow rate based on the measurement of peak half-widths
Journal of Chromatography A (sent in April 2015).

The developed research has been also presented in 11 scientific conferences (19 communications in international conferences and 10 communications in national conferences), which the PhD. candidate has attended to in 2012 and 2013:

XIII Chemometrics in Analytical Chemistry, CAC 2012

Budapest (Hungary), June 2012 (international)

1. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Resolution criteria considering time and spectral information
(Poster: P-154)
2. C. Ortiz Bolsico, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque
Parabolic-Lorentzian modified Gaussian models for describing chromatographic peaks (Poster: P-155)

3. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Locally optimized sequential search for resolving complex mixtures by HPLC (Poster: P-156)

29th International Symposium on Chromatography (ISC 2012)

Toruń (Poland), September 2012 (international)

4. M.C. García Álvarez-Coque, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió
Approaches to find complementary separation conditions in high-performance liquid chromatography (Poster: S1-P25)
5. C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza
Semiempirical approaches to model the retention and peak shape in linear gradient RPLC (Poster: S1-P73)
6. J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Resolution criteria considering time and spectral information (Poster: S2-P109)
7. C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruíz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Some considerations on the sequential coupling of stationary phases in liquid chromatography (Poster: S7-P34)

XII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques

Tarragona (Spain), November 2012 (national)

8. C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruíz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Comparison of two approaches for column coupling (Poster: CHE01)

Dutch-Belgian Summit on German Border

Kerkrade (The Netherlands), April 2013 (international)

9. C. Ortiz Bolsico, S. Pous Torres, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, P.J. Schoenmakers
Some considerations on HILIC retention (Poster)

39th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2013

Amsterdam (The Netherlands), June 2013 (international)

10. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque
Elution and peak width triangles: a schematic representation of the chromatographic behavior in linear gradient liquid chromatography
(Poster: CMTR19_MO)
11. S. Pous Torres, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, G. Vivó Truyols, P.J. Schoenmakers.
Single and combined HILIC and RPLC for the determination of flavonoids
(Poster: CMTR12_TU)
12. C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque
Isocratic HPLC optimization for serially coupled columns considering mobile phase composition, column nature and length
(Poster: CMTR14_TU)
13. J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Single injection in coupled columns at varying solvent content versus complementary resolution systems in the separation of complex mixtures
(Poster: CMTR26_TU)

XIII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques

Tenerife (Spain), October, 2013 (national)

14. M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió
Models for predicting the retention and peak shape in gradient elution chromatography (Oral communication: FAC-02)
15. C. Ortiz Bolsico, M.P. Máñez Navarro, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque
Approaches to characterise column performance related to peak shape (Poster: PS1-40)
16. C. Ortiz Bolsico, S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, G. Vivó Truyols, P.J. Schoenmakers.
Modelling of retention and peak shape in comprehensive two-dimensional liquid chromatography
Poster: PS1-41 (best poster IX edition José Antonio García Domínguez awards).
17. J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Optimization of gradient elution with serially-coupled columns (Poster: PS1-43)
18. J.R. Torres Lapasio, C. Ortiz Bolsico, S. Pous Torres, M.C. García Álvarez-Coque
Considerations about the separation of phenols by isocratic RPLC using time and spectral information (Poster: PS1-44)

Study Group Meeting Analytical Chemistry

Lunteren (The Netherlands), November 2013 (international)

19. S. Pous Torres, C. Ortiz Bolsico, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, P. Schoenmakers
Optimization of LC×LC separations using gradient elution (Poster)

41th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC'2014

New Orleans, Louisiana (USA), May 2014 (international)

20. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Combining time and spectral resolution for the RPLC separation of phenols (Poster: P-W-2207, finalist for the poster awards)

30th International Symposium on Chromatography, ISC'2014

Salzburg (Austria), September 2014 (international)

21. M.C. García Álvarez-Coque, E. Peris García, C. Ortiz Bolsico, J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel
Reversed-phase liquid chromatography with water and detergent
(Poster: P073-FF-MO).
22. M.C. García Álvarez-Coque, C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres Lapasió
Serially-coupled columns assisted by rigorous optimisation: A competitive solution for resolving complex samples
(Poster: P047-FF-MO)

14as Jornadas de Análisis Instrumental "JAI"

Barcelona (Spain), October 2014 (national)

23. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, T. Álvarez Segura
Selectivity modulation with serially-coupled columns in RPLC for the analysis of complex samples (Poster: CTQ-P01, finalist for the poster awards).
24. C. Ortiz Bolsico, A. Mejía Ruiz, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Used of mixed micellar systems Brij-35/SDS in the analysis of basic drugs (Poster: API-P01)
25. J.J. Baeza Baeza, E. Peris García, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Reversed-phase liquid chromatography with Brij-35: A chromatographic mode with water and soap (Poster: CTQ-P02)
26. J.J. Baeza Baeza, E. Cabo Calvet, C. Ortiz Bolsico, M.C. García Álvarez-Coque
Study of the performance of a silica-based monolithic column under flow programming (Poster: CTQ-P03)

42th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2015

Geneva (Switzerland), June 2015 (international)

27. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, C. Ortiz Bolsico, T. Álvarez Segura
Optimisation of serially-coupled columns: Isocratic and gradient elution (Oral communication)

28. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, A. Gómez Díaz, C. Ortiz Bolsico, T. Álvarez Segura
Measurement of resolution in fingerprinting analysis of herbal medicines
(Poster)
29. M.C. García Álvarez-Coque, M.T. Úbeda Torres, C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel
Measurement of the silanol suppressing potency of mobile phase additives in alkyl-bonded stationary phases (Poster)

The research along the PhD. Project has been funded by two national Research Projects from the Ministry of Education, Science and Innovation, and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (Refs. CTQ2010–16010/BQU and CTQ2013–42558-P), and a research training grant associated to the Project CTQ2010–16010/BQU (Ref. BES-2011-049904).

CAPÍTULO 1

**INTRODUCCIÓN GENERAL:
MODELIZACIÓN DE LA RETENCIÓN EN
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE FASE INVERSA
Y USO DE EQUILIBRIOS SECUNDARIOS**

1.1. Cromatografía líquida de fase inversa

La cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *reversed phase liquid chromatography*) es un modo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*), que utiliza una fase estacionaria apolar (por lo general, una cadena hidrocarbonada unida químicamente a partículas de sílice porosa), y una fase móvil polar constituida por agua y al menos un disolvente orgánico miscible con agua, que actúa como modificador de la fuerza eluyente [1–4]. La retención viene determinada fundamentalmente por los equilibrios de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria, al transportarse las moléculas del soluto a lo largo de la columna cromatográfica. Uno de los principales factores responsables del desarrollo de la RPLC fue la necesidad de separar mezclas que contienen compuestos que no son suficientemente volátiles, o que carecen de suficiente estabilidad térmica para ser analizados mediante cromatografía de gases, tales como los compuestos iónicos orgánicos e inorgánicos, los fármacos y las biomoléculas.

Históricamente, se desarrolló en primer lugar el modo cromatográfico conocido como cromatografía líquida en fase normal (NPLC, *normal phase liquid chromatography*), que hace uso de micropartículas de sílice y alúmina porosas (materiales de naturaleza polar muy comunes en el nacimiento de la HPLC [2]), y fases móviles apolares. Sin embargo, la sílice no es adecuada para retener muchas moléculas orgánicas de interés (con una naturaleza hidrofóbica), y da lugar a eficacias bajas y picos asimétricos con grandes colas para los compuestos básicos, a causa de la interacción de los analitos catiónicos con los grupos silanol (silanoles) aniónicos que se encuentran sobre la superficie de la sílice. Además, los analitos polares exhiben tiempos de

retención elevados, y se ven afectados en gran medida por la presencia de trazas de agua y otros disolventes polares, y además, no son solubles en las fases móviles hidrofóbicas. Con el fin de superar estas limitaciones, era necesario modificar la superficie de la sílice para obtener materiales menos polares, o incluso apolares (hidrofóbicos), para ser utilizados como fases estacionarias con disolventes polares. Debido a que el nuevo modo cromatográfico utilizaba el enfoque opuesto al en ese momento modo normal de operación (NPLC), es decir, una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar, se le consideró un modo inverso de separación (RPLC) [5,6].

Las primeras publicaciones en HPLC sobre el uso de soportes de sílice covalentemente modificados, estables en los disolventes miscibles en agua más comunes, datan de mediados de la década de los 60, y la primera columna RPLC comercial (Bondapak) se introdujo en 1973. Por lo tanto, la RPLC con fases estacionarias alquil-enlazadas está entrando en su quinta década, siendo una técnica de separación extraordinaria que se ha convertido en el modo de HPLC más popular, abarcando a la gran mayoría de separaciones. Es adecuada para el análisis de compuestos en un amplísimo intervalo de polaridades y estructuras. Aunque la mayoría de las aplicaciones corresponden a pequeñas moléculas orgánicas (con una masa molecular, $M_r < 500$), también es posible el análisis de proteínas y otras biomoléculas grandes.

En RPLC, una vez que se ha seleccionado una columna adecuada, la retención absoluta y la selectividad (retención relativa) se pueden manipular fácilmente modificando varios factores experimentales, tales como la relación entre los componentes orgánico y acuoso de la fase móvil, la concentración de una amplia variedad de aditivos (tales como reactivos formadores de pares iónicos, surfactantes, líquidos iónicos y selectores quirales) [7], el pH [8] y la

temperatura [9]. Otras ventajas son la facilidad en el uso de gradientes de elución, la compatibilidad con muestras acuosas, la posibilidad de separar compuestos apolares, polares, e iónicos en el mismo análisis, la amplia variedad de fases comerciales disponibles, el gran número de aplicaciones publicadas, y su familiaridad para la mayoría de analistas. No hay muchos analitos cuyo análisis requiera otro modo de HPLC.

La RPLC es una técnica madura, empleada en Ciencia y Tecnología por químicos, bioquímicos y farmacéuticos para el análisis y purificación de compuestos. Las aplicaciones abarcan desde el control medioambiental, el análisis de alimentos, clínico, farmacéutico e industrial, la fabricación de fármacos y productos químicos (en ambos ámbitos de control de la calidad analítica y escala preparativa), los estudios biomédicos, y la medida de las propiedades físico-químicas. La gran mayoría de las separaciones para los análisis biomédicos, farmacéuticos y ambientales se realizan mediante RPLC. Esta amplia variedad de aplicaciones, a su vez, ha contribuido al desarrollo de un importante grupo de empresas que fabrican instrumentos y columnas. Hay enormes cantidades de dinero invertidas en el uso de la RPLC. Por lo tanto, no se prevé que esta técnica sea reemplazada hasta que se desarrolle un nuevo modo de HPLC, o una técnica alternativa que funcione significativamente mejor [2].

Esta Memoria incluye varios estudios en el campo de la RPLC, que pretenden mejorar su capacidad para resolver muestras con tiempos de análisis competitivos. Esta Introducción tiene como propósito sentar las bases sobre un par de pilares en los que descansan los diversos estudios presentados: la modelización del comportamiento cromatográfico y el uso de equilibrios secundarios en RPLC.

1.2. Modelización del comportamiento cromatográfico

Las estrategias de optimización interpretativas en HPLC se basan en la descripción exacta (modelización) del comportamiento cromatográfico [10]. La primera etapa en estas estrategias consiste en la recopilación de información acerca de los compuestos que contiene la muestra, por lo general atendiendo sólo a la retención y cubriendo amplias regiones de los factores involucrados. Para este propósito, se pueden utilizar datos de experimentos realizados tanto en el modo isocrático, como en gradiente. Para cada soluto, se obtiene una relación que describe la retención en función de los factores experimentales. Esta función (convencionalmente una expresión algebraica empírica o mecanicista) permitirá la predicción de los tiempos de retención en el modo isocrático o en gradiente, para un soluto determinado y en diferentes condiciones.

La exactitud de las predicciones es decisiva para conseguir una optimización de la separación fiable [11,12]. Para cada soluto, la calidad de la predicción depende de la riqueza de la información proporcionada por el diseño experimental (el número y la distribución de las experiencias dentro del dominio de los factores), de la ecuación seleccionada para ajustar los datos de entrenamiento, y del procedimiento de ajuste. También pueden influir en la exactitud los intervalos de los factores experimentales y el modo de elución (isocrático o gradiente). Un aspecto relevante en dichas predicciones es la existencia de modelos que describan adecuadamente el comportamiento de retención. Se presenta a continuación una visión general de los modelos de retención utilizados en RPLC.

1.2.1. Elución isocrática

a) Modelos polinómicos para describir la retención utilizando el contenido de modificador orgánico como factor

El contenido de disolvente orgánico (modificador), en la fase móvil, es el factor optimizado con mayor frecuencia en RPLC [13]. No sólo ejerce un gran impacto en la fuerza eluyente y la selectividad, sino que también puede ser modificado fácilmente y con exactitud en amplios intervalos. De ahí la importancia de obtener modelos de retención fiables, que impliquen el contenido de modificador orgánico como factor. En RPLC, la retención de un soluto i puede expresarse en términos de los parámetros de solubilidad de la siguiente forma [14]:

$$\ln k_i = \ln \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} = \frac{V_i}{RT} [(\delta_M - \delta_i)^2 - (\delta_S - \delta_i)^2] + \ln \frac{n_S}{n_M} \quad (1.1)$$

donde k_i es el factor de retención (o retención relativa) del soluto, t_{Ri} el correspondiente tiempo de retención isocrático, t_0 el tiempo muerto, R la constante de los gases ($1.9865 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta (K), v_i el volumen molar del soluto ($\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), δ_M , δ_S y δ_i ($\text{cal}^{0.5} \text{ cm}^{-1.5}$) los parámetros de solubilidad de la fase móvil, la fase estacionaria y el soluto, respectivamente, y n_M y n_S el número de moles de la fase móvil y la fase estacionaria en la columna. Para una mezcla binaria de agua (w) y disolvente orgánico (o), la polaridad de la fase móvil se puede calcular como:

$$\delta_M = (1 - \varphi) \delta_w + \varphi \delta_o \quad (1.2)$$

donde φ es la fracción de volumen del modificador. Si la Ecuación (1.2) se sustituye en la Ecuación (1.1), se obtiene una relación cuadrática entre el logaritmo del factor de retención (generalmente expresado como logaritmo

decimal) y la fracción de volumen de modificador en la fase móvil acuo-orgánica [15]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (1.3)$$

Los parámetros de ajuste c_0 – c_2 reúnen todas las constantes y parámetros soluto/fase móvil/fase estacionaria descritos en la Ecuación (1.1), con valores particulares para cada soluto y sistema cromatográfico (columna/modificador). En intervalos estrechos de contenido de modificador, el término cuadrático puede ser eliminado. Ello simplifica el modelo a la relación lineal habitualmente utilizada:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi = \log k_w - S \varphi \quad (1.4)$$

La ordenada en el origen de la línea recta ajustada se refiere al valor extrapolado de $\log k$ si se utiliza el agua como fase móvil ($\log k_w$). La pendiente indica la sensibilidad de la retención a los cambios en el contenido de modificador, y se denomina fuerza eluyente del modificador (S). En amplios intervalos de concentración, se observan desviaciones de la linealidad, que son especialmente significativas cuando se estudian contenidos altos y bajos del modificador. Las Ecuaciones (1.3) y (1.4) también son válidas en presencia de interacciones específicas producidas por la adición de aditivos a la fase móvil, como surfactantes y líquidos iónicos en concentración fija.

La retención en sistemas ternarios constituidos por agua y dos disolventes orgánicos, se ha descrito con ecuaciones similares:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi_1 + c_2 \varphi_2 + c_{12} \varphi_1 \varphi_2 + c_{11} \varphi_1^2 + c_{22} \varphi_2^2 \quad (1.5)$$

donde φ_1 y φ_2 son los contenidos de los dos disolventes orgánicos en la fase móvil [16].

La búsqueda de mejores modelos de retención no ha terminado. Nikitas y Pappa-Louisi realizaron en 2009 una amplia revisión del tema [16]. La mayoría de los modelos publicados son logarítmicos. Sin embargo, hay otras propuestas, como un modelo no logarítmico propuesto por Jandera para NPLC [17], que en el Capítulo 3 se demuestra que ofrece también una excelente exactitud en RPLC:

$$\frac{1}{k} = [a + b\varphi]^n \quad (1.6)$$

b) Modelos de polaridad

Se han encontrado relaciones lineales satisfactorias cuando se relaciona $\log k$ con parámetros de polaridad distintos de los parámetros de solubilidad (δ), que dependen de φ , tal como el parámetro de Dimroth-Reichardt, $E_T(30)$, o su valor normalizado, $E_T^N(30)$. El intervalo de linealidad es, sin embargo, limitado (e.g., 0–80% v/v para acetonitrilo y 20–100% v/v para metanol). Un parámetro normalizado derivado de $E_T^N(30)$ es el parámetro de polaridad P_M^N , propuesto por Bosch y Rosés [18,19] para extender el intervalo de linealidad de las composiciones de fase móvil (0–100%), que para las mezclas de acetonitrilo-agua se define como:

$$P_M^N = 1.00 - \frac{2.068\varphi}{1 + 1.341\varphi} \quad (1.7)$$

y para las mezclas de metanol-agua:

$$P_M^N = 1.00 - \frac{1.33\varphi}{1 + 0.47\varphi} \quad (1.8)$$

Es posible describir la retención con un modelo lineal que aísle las contribuciones de polaridad de los tres agentes implicados en el proceso de separación (i.e., soluto, fase estacionaria y fase móvil):

$$\log k = (\log k)_0 + p_s (P_M^N - P_S^N) \quad (1.9)$$

donde p_s y P_M^N son descriptores de la polaridad para el soluto y la fase móvil, respectivamente, y $(\log k)_0$ y P_S^N representan la polaridad de la fase estacionaria. El término $(\log k)_0$ representa la retención en una fase móvil hipotética con la misma polaridad que la fase estacionaria ($P_M^N = P_S^N$). Sin embargo, debe indicarse que la separación de las polaridades de soluto, fase móvil y fase estacionaria en la Ecuación (1.9) no es perfecta: aunque p_s recoge principalmente las contribuciones del soluto, no se trata de un valor absoluto, sino de una medida relativa que depende del ambiente de la columna (fase móvil y fase estacionaria). Lo mismo se puede decir para $(\log k)_0$ y P_S^N .

Una ventaja interesante de la Ecuación (1.9) es que incluye sólo un descriptor del soluto, p_s , y dos descriptores de la columna, $(\log k)_0$ y P_S^N (P_M^N se obtiene a partir de la composición de la fase móvil). Esto facilita la transferencia de valores de k a otras columnas y modificadores, a través de correlaciones simples entre los valores de p_s , para pequeños grupos de compuestos de referencia seleccionados. Cuando $(\log k)_0$ y P_S^N se ajustan de forma individual para cada soluto, la Ecuación (1.9) se simplifica a:

$$\log k = q + p_s P_m^N = c_0 + c_1 P_m^N \quad (1.10)$$

Las Ecuaciones (1.4) y (1.10) son modelos que contienen tan sólo dos parámetros, pero el modelo de polaridad (Ecuación (1.10)) es válido en intervalos de modificador más amplios. De hecho, la exactitud en las predicciones realizadas con este modelo es comparable a la del modelo cuadrático (Ecuación (1.3)) (Figura 1.1).

c) El pH como factor experimental

Para los compuestos ionizables, el pH es un factor experimental adicional con una gran influencia sobre la retención y la selectividad. Cuando la mezcla analizada contiene uno o más compuestos con comportamiento ácido-base, el ajuste del pH puede ofrecer oportunidades únicas para mejorar la resolución. Sin embargo, la modelización de los cambios en la retención con el pH es particularmente complicada [8,20]. No debe así sorprender que una práctica ampliamente extendida consista en fijar el pH de la fase móvil a un valor conveniente, lo que significa que se pierden los beneficios de este factor experimental sobre la selectividad.

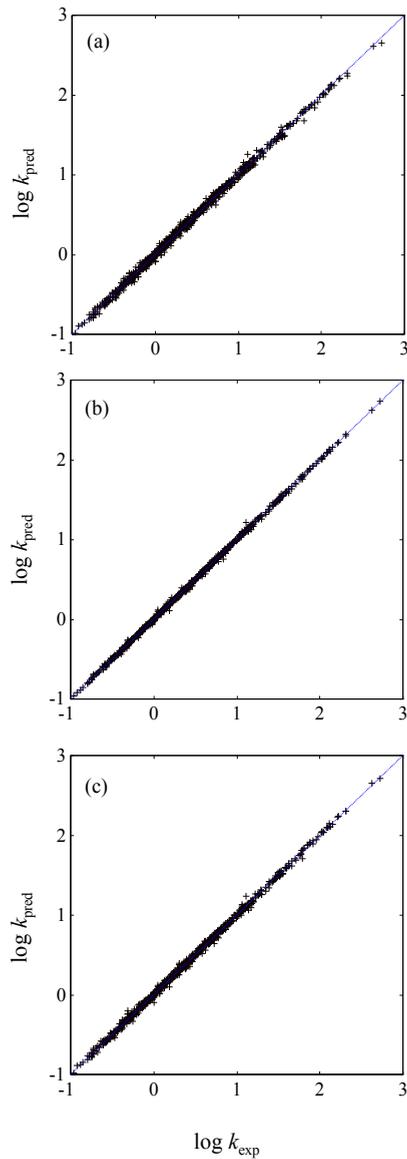


Figura 1.1. Comparación de la exactitud de las predicciones de la retención de 152 compuestos eluidos con mezclas de metanol-agua ($n = 745$), proporcionadas por varios modelos de retención: (a) Ecuación (1.4), (b) Ecuación 1.3), (c) Ecuación (1.10) [19].

Para un contenido de modificador fijo, la retención de los compuestos ionizables en HPLC es una media ponderada del comportamiento de las especies básica y ácida:

$$k = k_A \delta_A + k_{HA} \delta_{HA} = k_A \frac{1}{1 + K h} + k_{HA} \frac{K h}{1 + K h} = \frac{k_A + k_{HA} K h}{1 + K h} \quad (1.11)$$

donde k es el factor de retención medido, k_A y k_{HA} son los factores de retención de las especies básica y ácida del compuesto analizado, respectivamente, δ_A y δ_{HA} sus fracciones molares, y h es la concentración molar de protones. Por conveniencia (se obtienen expresiones más sencillas), el equilibrio ácido-base se caracteriza por la constante de protonación aparente, que es el recíproco de la constante de disociación ácido-base ($K = K_a^{-1}$). Esta constante se ve afectada por todas las interacciones que experimenten las especies ácida y básica con los componentes de las fases móvil y estacionaria.

Puesto que la retención intrínseca de cada especie (k_A y k_{HA}) es diferente, se producirá un cambio repentino en la retención (k) a valores de pH próximos a $\log K$ (Figura 1.2). Dependiendo de la carga y polaridad de las especies ácida y básica, la retención puede disminuir, aumentar, o permanecer constante con el pH (obsérvese que la especie cargada se halla menos retenida). La protonación de un soluto se produce a lo largo de al menos dos unidades de pH (dentro del intervalo $\text{pH} = \log K \pm 1$). Por lo tanto, para las columnas de RPLC convencionales, donde el intervalo de pH de trabajo es relativamente estrecho (3–7, o como máximo, 2.5–7.5), el cambio en la retención sólo se muestreará totalmente para algunos solutos. Debido a la información incompleta, la retención de las especies ácida y básica debe extrapolarse.

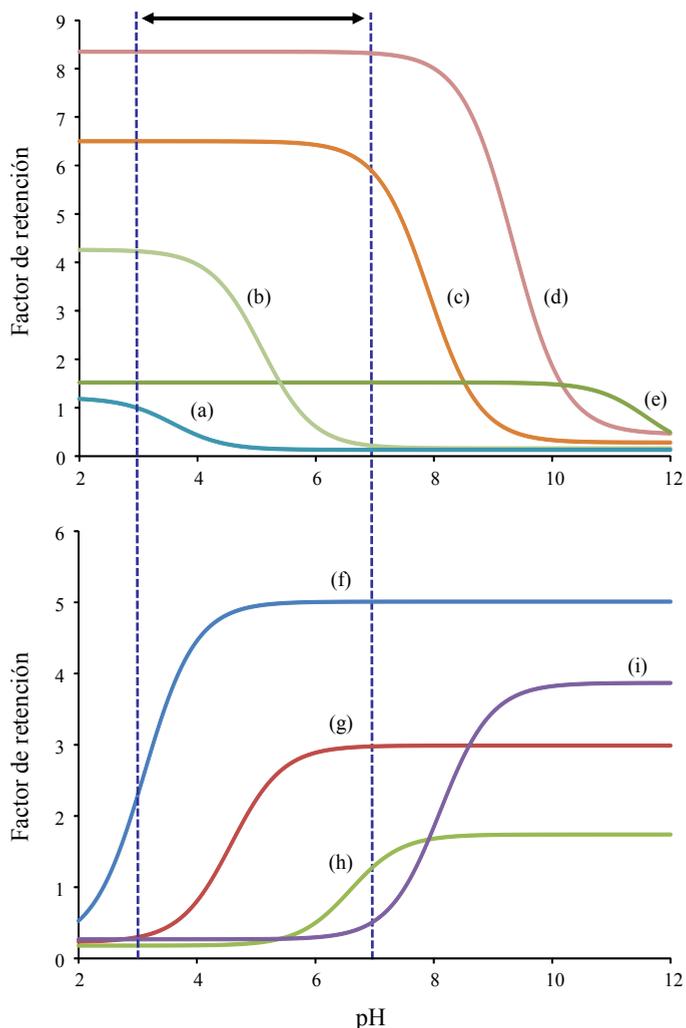


Figura 1.2. Dependencia de la retención con el pH para varios compuestos ácidos (a-e) y básicos (f-i), eluidos con 40% de acetonitrilo. Compuestos (se proporcionan los valores de $\log K$ en 40% de acetonitrilo): (a) ácido 2-nitrobenzoico (3.59), (b) ácido naftoico (5.09), (c) 2-nitrofenol (7.91), (d) 3,5-diclorofenol (9.34), (e) fenol (11.61), (f) 4-cloroanilina (3.11), (g) 4-metilanilina (4.58), (h) 2,4,6-trimetilpiridina (6.59), y (i) *N,N*-dimetilbencilamina (8.11). Se ha marcado el intervalo de pH de trabajo para las columnas convencionales [8].

1.2.2. Estimación del tiempo muerto

El volumen muerto, en sistemas de cromatografía líquida, se ha definido como "el volumen de fase móvil que llena el espacio entre el inyector y la celda del detector, que incluye el volumen accesible intersticial o entre las partículas empacadas en la columna, y el volumen intra-particular (volumen de los poros del relleno de la columna), así como el volumen de los tubos y de cualquier otro componente en el sistema (el volumen extra-columnar) [21,22]. Relacionado con este concepto se define el tiempo muerto, que es el tiempo que necesita un compuesto no retenido ideal (un compuesto que no interacciona con la fase estacionaria) para cruzar la distancia que existe entre el inyector y la celda del detector, cuando la elución se efectúa a un caudal constante.

La estimación del tiempo muerto, en los sistemas cromatográficos, es la base del cálculo de los factores de retención (el término izquierdo de la Ecuación (1.1)). Este cálculo implica trasladar el origen de los tiempos de retención al tiempo de un compuesto no retenido, y la normalización mediante la división del tiempo neto resultante por el tiempo muerto. El factor de retención permite comparaciones entre diferentes longitudes de columna, o diferentes caudales para la misma columna.

Es necesario conocer el valor de los factores de retención con suficiente exactitud, para realizar la predicción de la retención y la resolución en la optimización de las separaciones cromatográficas, en la estimación de los coeficientes de reparto, los factores de selectividad y otros parámetros termodinámicos, así como en el establecimiento de correlaciones con varias propiedades físico-químicas. Sin embargo, la estimación del tiempo muerto implica dos dificultades principales, especialmente en RPLC:

- (i) La fase estacionaria adsorbe una cierta cantidad de modificador, formando una capa y reduciendo con ello el volumen accesible en el interior de la fase empacada.
- (ii) Algunos solutos pueden ser parcial o totalmente excluidos de los poros de las partículas. Puesto que el efecto de exclusión está relacionado con el volumen y tamaño de las moléculas, solutos diferentes pueden experimentar diferentes tiempos muertos asociados. A este efecto de exclusión de tamaño, se debe añadir la exclusión electrostática de los solutos cargados.

Los métodos existentes para la estimación del tiempo muerto se han clasificado en dos grupos: métodos estáticos y dinámicos. En los métodos estáticos, la columna se mantiene a presión atmosférica sin existir un flujo de fase móvil. En los métodos dinámicos, la fase móvil se hace fluir a través de la columna a alta presión, y se produce un gradiente de presión lineal a lo largo de la elución. Los resultados producidos por distintos métodos difieren debido a las diferentes propiedades medidas, a lo que se debe añadir las incertidumbres experimentales. El debate y la controversia sobre la estimación del tiempo muerto se han mantenido vivos a lo largo de décadas. Se puede decir que no existe todavía un método universalmente reconocido para su estimación exacta.

a) Métodos estáticos

Los métodos estáticos no se utilizan rutinariamente debido a varios problemas que se detallan a continuación. El método estático más habitual es la picnometría o método de la diferencia de pesos. Consiste en rellenar la columna empacada sucesivamente con dos disolventes que posean una

densidad suficientemente distinta, tales como tetracloruro de carbono y metanol. El volumen muerto se obtiene a partir de las diferencias entre sus densidades y pesos. En otro método, se hace pasar agua por la columna, y a continuación, ésta se seca con una corriente de nitrógeno, pesándola tras cada una de estas operaciones. Ambos métodos ignoran la solvatación de la fase estacionaria por los componentes de la fase móvil. Por lo tanto, a menos que se realice una corrección que tenga en cuenta la capa de solvatación, se produce un error en la medida del volumen muerto de la columna. Además, la pequeña diferencia entre las dos medidas (el peso de la columna rellena con dos disolventes distintos, o el llenado con agua y secado) da lugar a una gran incertidumbre. El método que hace uso de un único disolvente (agua) es también poco práctico, puesto que una vez seca la columna, a menudo ésta queda dañada irreversiblemente.

b) Métodos dinámicos

Los métodos dinámicos se dividen en directos e indirectos. Los métodos directos incluyen la inyección de compuestos no retenidos, tales como los componentes de la fase móvil o marcadores del tiempo muerto [22]. Se produce una perturbación de la línea base al inyectar agua, un disolvente orgánico o una disolución con una composición ligeramente distinta a la de la fase móvil. No es necesario el uso de un detector de índice de refracción para medir la perturbación, ya que con frecuencia los detectores UV evidencian los cambios en el índice de refracción a longitudes de onda bajas.

La inyección de marcadores, ya sean orgánicos (e.g., acetona, *N,N*-dimetilformamida, nitrobeneno, ácido pícrico o uracilo), o inorgánicos (e.g., KI, KNO₃, NaCl, NaNO₃ y NaNO₂) es el método más extendido debido a

su simplicidad práctica. Por lo general se ignora la posible retención del marcador. El marcador ideal debe poseer un volumen lo suficientemente pequeño como para penetrar en todo el volumen accesible en la fase estacionaria, y ser lo suficientemente hidrofílico para no retenerse. En la práctica, sin embargo, todos los marcadores son, o bien excluidos parcialmente de los poros de las partículas del soporte, o se retienen ligeramente. El uracilo y el KBr parecen ser los mejores marcadores.

Los métodos indirectos también se han llamado "métodos matemáticos". Estos métodos obvian las dificultades asociadas a la selección de compuestos realmente no retenidos. El método indirecto más conocido se basa en la elución de una serie homóloga [21,22]. El enfoque se basa en una relación lineal supuesta entre el logaritmo del factor de retención y el número de carbonos de los homólogos, n_C :

$$\log k = c_0 + c_1 n_C \quad (1.12)$$

que se combina con el término izquierdo de la Ecuación (1.1):

$$t_R = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k_0 e^{c_1 n_C}) \quad (1.13)$$

donde k_0 es el factor de retención residual para $n_C = 0$, y c_1 la pendiente de la Ecuación (1.12). Los parámetros t_0 , k_0 y c_1 en la Ecuación (1.13) se obtienen a partir de la regresión no lineal de los datos.

La aplicación del método de la serie homóloga requiere más tiempo que los métodos dinámicos, que se basan en la medida de los compuestos no retenidos. Además, la supuesta relación lineal no siempre es válida a lo largo de toda la serie: se han observado desviaciones de la linealidad tanto para los homólogos más bajos como para los que exceden la longitud de la cadena alquílica enlazada a la fase estacionaria. La elección de la serie homóloga se basa en su

disponibilidad, solubilidad en la fase móvil, retención y detección. El tiempo muerto estimado depende en gran medida del número y elección de los homólogos. Además, puesto que el tiempo muerto es un valor extrapolado, se ve fuertemente influido por pequeños errores en los tiempos de retención de los homólogos (se requieren datos con una elevada precisión y exactitud), y por el método matemático aplicado.

También se pueden utilizar para estimar el tiempo muerto, los tiempos de retención de compuestos eluidos con fases móviles de diversa composición [23]. Los compuestos utilizados para dicha estimación pueden ser aquéllos para los que interesa calcular el factor de retención. El modelo lineal que relaciona $\log k$ y φ (Ecuación (1.4)) es el más conveniente para realizar la estimación. El tiempo muerto se obtiene a partir de:

$$t_R = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k_0 e^{c_1 \varphi}) \quad (1.14)$$

Los parámetros del modelo se pueden obtener aplicando regresión no lineal, mediante el ajuste de los tiempos de retención a varias composiciones de la fase móvil, dentro de un estrecho intervalo de contenido de modificador, donde el modelo de retención lineal se ajusta adecuadamente y el tiempo muerto de la columna apenas se ve influido por el cambio en el contenido de modificador. Sin embargo, como ocurre para las series homólogas, el método se ve seriamente afectado por la magnitud de los tiempos de retención procesados. Con el fin de obtener estimaciones fiables, deben tratarse conjuntamente los datos de retención de varios compuestos que eluyan en las mismas condiciones (en lugar de los datos de un único compuesto). Con ello se acepta implícitamente que el volumen muerto medido es el espacio accesible a los solutos durante la elución, que la accesibilidad a los poros de la fase estacionaria para distintos solutos es similar, y que el volumen muerto no se ve

afectado por cambios en el contenido de modificador. El enfoque incluye un algoritmo iterativo para compensar la falta de exactitud o la presencia de algunos datos inadecuados [23].

1.2.3. Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre la retención en HPLC se describe mediante la ecuación de Vant' Hoff [24]:

$$\ln k = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} + \ln \phi \quad (1.15)$$

donde ϕ es la relación de fases del sistema, ΔH y ΔS son los cambios en la entalpía y entropía estándar del sistema, respectivamente, R es la constante universal de los gases, y T la temperatura absoluta. Para intervalos de temperatura suficientemente estrechos (de aproximadamente 90°C), en los que ΔH y ΔS son constantes, la Ecuación (1.15) se puede transformar en una ecuación sencilla de dos parámetros (c_0 y c_1):

$$\ln k = c_0 + \frac{c_1}{T} \quad (1.16)$$

Para intervalos más amplios de temperatura, debido a la dependencia de ΔH y ΔS con la temperatura, las representaciones son curvilíneas y se requiere un tercer término:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} + \frac{c_2}{T^2} \quad (1.17)$$

La utilidad de la temperatura como factor para mejorar las separaciones es controvertida [25]. Al incrementarse la temperatura, la retención disminuye,

pero la difusión longitudinal también disminuye (lo que deteriora la eficacia a caudales de la fase móvil bajos), aunque la cinética de transferencia de masa se estimula (lo que mejora la eficacia a caudales suficientemente elevados) [24,26]. La pendiente de la ecuación de van't Hoff para varios analitos también puede diferir, afectando significativamente a la selectividad al variar la temperatura, lo que origina en ocasiones cambios en el orden de elución de los picos cromatográficos a diferentes temperaturas. Por lo general, estos cambios en la selectividad son mayores para los compuestos ionizables o polares. Los cambios son particularmente intensos para las moléculas de gran tamaño, tales como las proteínas y los polímeros solubles, que pueden exhibir diversas conformaciones dependiendo de la temperatura.

El efecto de la temperatura y de la fuerza eluyente (contenido de modificador) sobre la selectividad son aproximadamente ortogonales entre sí. Por lo tanto, solutos difíciles de resolver mediante la optimización de la fuerza eluyente podrían separarse al optimizar la temperatura. Aunque generalmente no proporciona tanta influencia sobre la selectividad como la naturaleza y el contenido del modificador, la pendiente del gradiente o el pH, la temperatura puede ser muy útil en el desarrollo de métodos para mejorar la selectividad, produciendo además disminuciones en el tiempo de análisis.

1.2.4. Mejorando la predicción de la retención

a) Consideraciones prácticas

En la práctica, las medidas replicadas de los tiempos de retención, a una cierta composición de la fase móvil, siempre fluctúan dentro de un cierto intervalo. Las posibles razones de estas fluctuaciones son la incertidumbre asociada a la válvula de inyección, las variaciones en el caudal debido a un bombeo defectuoso, cambios en la temperatura, insuficiente estabilización de la energía suministrada, deficiencias en el equilibrado de la fase estacionaria, degradación de la fase estacionaria (efecto a largo plazo), y desviaciones de la composición nominal de la fase móvil (e.g., debido a errores en la preparación de la fase móvil, o a la evaporación del disolvente orgánico), entre otras razones. Estas fuentes de error pueden deteriorar la exactitud de las predicciones [27].

Un segundo punto a considerar en la medida de los tiempos de retención es la asignación correcta de los picos cuando se inyectan mezclas de compuestos. Para ello, se pueden utilizar disoluciones que contienen dos o más patrones, con la condición de que las diferencias en su retención los haga fácilmente distinguibles. Si es necesario, el seguimiento de los picos se puede realizar mediante la variación de la concentración de los patrones inyectados, o con la ayuda de una técnica de detección selectiva.

Es importante reducir al máximo el esfuerzo experimental, sin deteriorar la calidad del modelo de predicción. Por lo general, cuando sólo se utilizan el contenido de modificador orgánico o la temperatura como factores, se construyen modelos que pueden proporcionar predicciones de gran exactitud (tales como las Ecuaciones (1.3), (1.4) y (1.17)), incluso utilizando diseños experimentales mínimos con un solo grado de libertad. Puesto que la fiabilidad

de estos modelos se ha demostrado ampliamente, en muchos casos prácticos, se utilizan diseños experimentales sin ningún grado de libertad. Solamente cuando se encuentran desviaciones significativas en las predicciones, se incluyen en el diseño más experimentos que los estrictamente necesarios para la construcción del modelo, a fin de reducir la incertidumbre de las predicciones.

Los diseños que implican el pH y uno o más factores experimentales, por lo general, deben considerar los datos de 12–15 o más fases móviles (e.g., tres composiciones de la fase móvil, cada una a cuatro o cinco niveles de pH) [28]. Con frecuencia, la retención de algunos solutos en una mezcla se mantendrá sin cambios para todo el intervalo de pH considerado, mientras que para otros solutos se observarán caídas bruscas (Figura 1.2). Esto puede originar múltiples cruces de los picos a lo largo del intervalo de pH estudiado, y separaciones no robustas para valores de pH cercanos a los valores de $\log K$ de los compuestos ionizables. Por lo tanto, la reproducción experimental de una separación predicha probablemente requerirá pequeñas correcciones del pH de la fase móvil.

b) Influencia del proceso de regresión en la calidad de las predicciones

El proceso de regresión construye la mejor relación posible entre la respuesta y los predictores, lo que se realiza minimizando la suma de los cuadrados de los residuos (el cuadrado de la diferencia entre las respuestas reales y predichas, extendidas a todo el conjunto de experiencias) [10,27].

Bajo el punto de vista de su resolución matemática, los modelos de retención se pueden clasificar como lineales y no lineales, para los cuales se requieren procedimientos de regresión lineal y no lineal, respectivamente.

Algunos modelos no lineales pueden transformarse en modelos lineales generales, modificando la variable respuesta. Una vez que se realiza esta transformación, se pueden aplicar procedimientos de regresión lineal, que son universales, y más seguros y sencillos. Cabe aclarar que en este contexto, "lineal" significa "combinaciones lineales de las variables predictoras", donde cada término de la suma puede ser lineal, cuadrático, etc., o un producto de factores (véase como ejemplo la Ecuación (1.5)).

Debe indicarse que todas las ecuaciones que describen la retención en RPLC, con k como variable respuesta, son no lineales. Cuando se transforma la variable respuesta (e.g., $\log k$) para obtener un modelo lineal más sencillo, la distribución de las incertidumbres asociadas a la solución se ve afectada: el conjunto de parámetros óptimos (obtenidos por regresión) minimizarán los residuales para la respuesta transformada (e.g., $\log k$), pero no para la respuesta original (k), que es la que realmente interesa. Naturalmente, este problema no existe si la regresión se lleva a cabo de forma no lineal con la variable respuesta original. No obstante, existe una práctica generalizada de ignorar estos efectos sobre la regresión.

El sesgo en el ajuste se puede compensar totalmente a través de la introducción de pesos (Figura 1.3), que se pueden obtener aplicando la teoría del error:

$$w = \left(\frac{\partial F}{\partial f} \right)^2 = \frac{1}{\left(\frac{\partial \log k}{\partial k} \right)^2} = (2.303 k)^2 \quad (1.18)$$

donde F y f son la función no linealizada y linealizada, respectivamente.

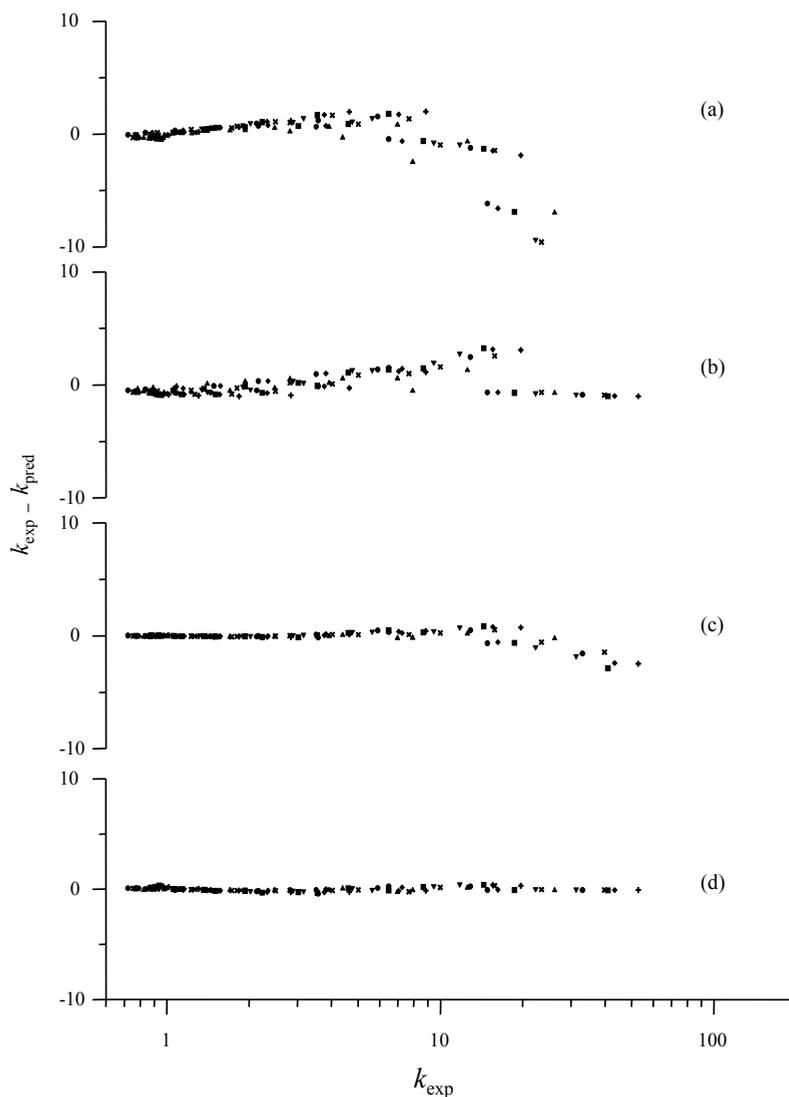


Figura 1.3. Incertidumbre en la predicción de los factores de retención para un conjunto de 13 fenoles, eluidos con nueve fases móviles en el intervalo de 20 a 100% de acetonitrilo, de acuerdo a la Ecuación (1.4) (a, c) y a la Ecuación (1.3) (b, d), ajustadas por regresión lineal no ponderada (a, b), y ponderada (c, d) [11].

Para reducir la incertidumbre de las predicciones, se recomienda el uso de pesos como regla general. La regresión ponderada, sin embargo, deteriora la exactitud cuando se emplean fases móviles con mayor fuerza eluyente.

1.2.5. Elución en gradiente

La elución isocrática presenta como ventajas su simplicidad, la accesibilidad a la instrumentación necesaria, y la falta de necesidad de re-equilibrar la columna entre inyecciones consecutivas. Además, generalmente, permite la máxima capacidad de resolución del sistema, ya que la separación entre picos se expande tanto como sea posible. Sin embargo, si el intervalo de polaridad de los solutos es demasiado amplio, será difícil encontrar un conjunto de condiciones cromatográficas capaces de equilibrar una separación satisfactoria para los solutos menos retenidos, y un tiempo de retención razonable para los más retenidos. Además, los compuestos retenidos en exceso se diluyen en gran medida, lo que deteriora los límites de detección. Como consecuencia, la utilidad práctica de la elución isocrática se ve seriamente restringida a conjuntos de compuestos dentro de un intervalo relativamente estrecho de polaridades. Una solución lógica para superar estos inconvenientes es la elución en gradiente, donde la fuerza eluyente se incrementa gradualmente mediante la alteración de al menos un factor experimental (contenido de modificador, pH, temperatura, o caudal) mientras progresa el análisis, de manera que la elución de los compuestos más retenidos se acelera gradualmente [29].

a) Integración de la ecuación fundamental para la elución en gradiente

El efecto de un gradiente de modificador orgánico sobre la retención se describe generalmente a través de una ecuación integral, que se ha llamado "ecuación fundamental de elución en gradiente" [29,30].

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \tag{1.19}$$

donde φ es la composición de la fase móvil en la posición en la que se halla el soluto a lo largo de su migración dentro de la columna, y t_g la variable objetivo (el tiempo que el soluto tarda en alcanzar la salida de la columna), que puede calcularse para cualquier gradiente, siempre y cuando la función compuesta $k(\varphi(t))$ sea conocida. Ésta implica dos ecuaciones anidadas: la dependencia del factor de retención con el contenido de modificador (el modelo de retención), y el cambio en el contenido de modificador con el tiempo (el programa de gradiente).

La Ecuación (1.19) se puede resolver analíticamente sólo en unos pocos casos. El caso más sencillo se presenta cuando ambas funciones $\log k(\varphi)$ y $\varphi(t)$ son lineales. Ésta es la base de la teoría de la fuerza eluyente lineal [30], que ha sido ampliamente utilizada para modelizar la elución en gradiente. Esta teoría se puede extender fácilmente a la construcción de varios segmentos lineales consecutivos (gradientes lineales múltiples).

Considerando la Ecuación (1.4), y un gradiente lineal:

$$\varphi = \varphi_0 + m t \tag{1.20}$$

se obtiene lo siguiente:

$$k = k_w e^{-S\varphi} = k_w e^{-S(\varphi_0 + mt)} = k_w e^{-S\varphi_0} e^{-Smt} = k_0 e^{-Smt} \tag{1.21}$$

donde k_0 es el factor de retención al inicio del gradiente. La Ecuación (1.19) supone que el gradiente alcanza instantáneamente la entrada de la columna. Sin embargo, el soluto eluye isocráticamente hasta que el gradiente llega a él (durante el llamado tiempo de retardo, t_d). Teniendo en cuenta las Ecuaciones (1.19) y (1.21), se obtiene:

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt_c}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g - t_0} \frac{dt_c}{k_0 e^{-Sm(t-t_d)}} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{1}{Smk_0} [e^{Sm(t_g - t_0 - t_d)} - 1] \quad (1.22)$$

De la Ecuación (1.22), se puede despejar el tiempo de retención en elución en gradiente:

$$t_g = \frac{\ln[1 + Sm(k_0 t_0 - t_d)]}{Sm} + t_0 + t_d \quad (1.23)$$

El correspondiente factor de retención viene dado por:

$$k_g = \frac{\ln[1 + Sm(k_0 t_0 - t_d)]}{Sm t_0} + \frac{t_d}{t_0} \quad (1.24)$$

b) Modelos de retención no integrables

Como se ha comentado, el modelo de retención lineal (Ecuación (1.4)) es válido únicamente dentro de intervalos estrechos del contenido de modificador. Para intervalos más amplios, debe añadirse un término cuadrático (Ecuación (1.3)), a fin de conseguir una descripción adecuada de la retención. Un inconveniente de la ecuación de segundo grado, cuando se utiliza en elución en gradiente, es que la integración analítica de la Ecuación (1.19) no es posible, o al menos, no es sencilla. Además, independientemente del modelo de retención, la integración analítica no se puede realizar con los programas de gradiente no lineales. Sin embargo, estos gradientes pueden ser emulados

satisfactoriamente mediante la aproximación a sumas de varios gradientes lineales consecutivos (i.e., mediante integración numérica).

En cualquier caso, la integración numérica constituye siempre una solución adecuada. Éste es un enfoque universal totalmente flexible, y por lo tanto, preferido por algunos analistas. En este método, t_g se calcula dividiendo la integral en múltiples pequeñas etapas isocráticas:

$$t_0 = \int_0^{t_g-t_0} \frac{dt}{k(t)} = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k(t)} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k(t)} \quad (1.25)$$

Suponiendo que $k(t)$ es constante dentro de cada integral, t_0 se puede aproximar a:

$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} \quad (1.26)$$

con:

$$k_{i,i+1} = \frac{k(t_i) + k(t_{i+1})}{2} \quad (1.27)$$

La precisión en t_g se puede incrementar hasta el nivel deseado, sólo reduciendo los intervalos de tiempo ($t_{i+1} - t_i$). Sin embargo, cuanto mayor es la precisión requerida, mayor es el tiempo de cálculo. Además, existe una limitación asociada con el sistema de bombeo, ya que los gradientes se generan por el instrumento aproximando los cambios a pequeñas etapas de composición. Por lo tanto, puede ser inútil invertir esfuerzo en la obtención de un nivel de precisión en t_g más allá de la capacidad del instrumento.

1.2.6. Optimización interpretativa asistida por ordenador

Cuando el analista se enfrenta a un nuevo problema, se deben tomar algunas decisiones en relación a los factores no ajustables (e.g., la naturaleza de la columna y su longitud, y la naturaleza del disolvente y del tampón), que a menudo se seleccionan mediante prueba y error, en base a conocimientos previos. A continuación, se examinan las propiedades fácilmente ajustables, tales como el contenido de modificador, el pH, la temperatura, o el programa de gradiente, donde uno o más de los factores experimentales pueden variarse. Cuando los resultados no son satisfactorios, es necesario realizar un cambio importante en el sistema cromatográfico. Este panorama sugiere que la búsqueda de las mejores condiciones de separación cromatográfica no es una tarea fácil.

Se han propuesto varias estrategias de optimización de las condiciones experimentales, para ayudar a la resolución de problemas complejos de elución [10–12,31]. A pesar de ser particularmente lentas e ineficaces, las estrategias de prueba y error son todavía frecuentes. Sin embargo, muchas muestras son tan complejas que el protocolo puede ser excesivamente largo, y a menudo, no se obtienen las mejores condiciones experimentales (o al menos, condiciones aceptables). Afortunadamente, el desarrollo de un método se puede acelerar notablemente, con resultados más fiables, mediante la aplicación de estrategias de optimización interpretativas asistidas por ordenador.

Este tipo de optimización incluye dos etapas: la modelización del sistema utilizando datos de entrenamiento, y la predicción de la resolución a través de la simulación por ordenador [12]. Con el fin de llevar a cabo una optimización rigurosa, es conveniente que se modelice no sólo la retención, sino también el perfil de los picos cromatográficos, definido por las semi-anchuras izquierda y

derecha (y, eventualmente, la altura de los picos) [32,33]. En la primera etapa, el cromatografista desarrolla una serie de experimentos tan reducidos e informativos como sea posible, con el fin de ajustar ecuaciones que permitirán la predicción de cromatogramas bajo cualquier nueva condición, dentro del espacio experimental modelizado. En la segunda etapa, se investiga la calidad de la separación para un gran número de condiciones de separación, a fin de conocer el conjunto de condiciones que garantice la máxima (o por lo menos una apropiada) resolución. En la práctica, esto se lleva a cabo mediante la simulación de los cromatogramas para una distribución prefijada de los factores experimentales que se están optimizando. Con este propósito, se construyen cromatogramas sintéticos constituidos por las señales individuales predichas de los compuestos en la mezcla analizada.

La búsqueda de las mejores condiciones de separación implica la reducción de la información contenida en los cromatogramas simulados a un valor numérico, que representa el nivel de separación global alcanzado, el cual es monitorizado a lo largo de todo el espacio de los factores. Idealmente, para que tenga sentido, este valor se debe correlacionar con la valoración de la resolución que proporcione un analista. La expresión matemática que permite la evaluación de la calidad de la separación se ha denominado "función objetivo cromatográfica" (COF, *chromatographic objective function*), que se maximiza a lo largo de todo el proceso de optimización. Por lo general, la función objetivo sólo tiene en cuenta la resolución, pero puede recoger otros objetivos, como tiempos de análisis cortos, un bajo coste, o perfiles de picos deseables (altas eficacias y picos simétricos) [10,34].

Muy a menudo, un solo factor (e.g., el contenido de modificador en elución isocrática) es suficiente para tener éxito en la separación. La optimización de

dos o más factores (e.g., el contenido de modificador, el pH y o la temperatura, o la concentración de dos modificadores y el pH) es menos frecuente, debido al incremento del esfuerzo experimental necesario para lograr predicciones exactas. La elución en gradiente implica encontrar el programa de gradiente adecuado, que numéricamente hablando, es por lo general más complejo. En este caso, los factores a optimizar son el tiempo de gradiente, su perfil, el valor inicial del factor experimental o factores experimentales, y el número de nodos y sus coordenadas en un gradiente lineal múltiple.

La resolución de una mezcla se aborda, por lo general, en primer lugar, buscando una única condición experimental, capaz de resolver todos los compuestos en la muestra. Si esto no es posible, el problema puede enfocarse con objetivos menos ambiciosos, centrándose sólo en algunos compuestos. En el caso extremo, un solo analito puede ser optimizado individualmente [12]. La optimización orientada a la deconvolución es también útil cuando la coelución es parcial.

Se han comercializado varios paquetes de software para facilitar la implementación de las metodologías interpretativas, especialmente para RPLC. El desarrollo de métodos de análisis se puede beneficiar en gran medida de estos programas informáticos, que además pueden ayudar a los usuarios que no posean capacidad de programación, a poner a punto sus separaciones. Algunos ejemplos de estos programas son Drylab [35], ChromDream [36], PREOPT-W [37], Osiris [38] y MICHROM [39]. El usuario también puede desarrollar su propio software con la ayuda de una hoja de cálculo, o empleando lenguajes de programación o empleando herramientas de cálculo de alto rendimiento, tales como MATLAB o R. Este tipo de herramientas le da libertad al analista para implementar nuevos desarrollos y estrategias.

1.2.7. Medida de la resolución

a) Criterios clásicos de resolución elemental

Los criterios de resolución elemental (COFs) califican la separación particular de cada soluto del resto en un cromatograma, o entre cada par de picos consecutivos [40–45]. Con este propósito, se han propuesto diferentes medidas de complejidad diversa. La más simple, que sólo considera la posición de los picos, es la denominada "selectividad", que constituye la base de los denominados "diagramas de ventana", a partir de los cuales se pueden pronosticar las condiciones óptimas de separación:

$$\alpha_{i, i+1} = \frac{k_{i+1}}{k_i} \quad (1.28)$$

donde k_i y k_{i+1} (siendo $k_{i+1} > k_i$) son los factores de retención asociados a dos picos consecutivos. En consecuencia, este criterio proporciona un valor para cada par de picos. Sin embargo, debido a que la anchura de los picos no se considera, la selectividad es sólo adecuada para comparar cromatogramas donde los picos son relativamente estrechos respecto a la distancia entre los picos.

Otras COFs consideran la anchura de los picos individuales o su perfil, e incluso el tamaño de los picos. La inclusión de estas características no sólo posee interés cuando los picos involucrados son asimétricos o anchos, sino también en situaciones en las que el espacio de separación es reducido. A este respecto, la llamada resolución cromatográfica, R_s , propuesta por Snyder, es sin duda el criterio más popular, debido a su sencillez:

$$R_S = \frac{t_{R,i+1} - t_{R,i}}{B_i + A_{i+1}} \quad (1.29)$$

donde $t_{R,i+1}$ y $t_{R,i}$ son los tiempos de retención de dos picos consecutivos, y B_i y A_{i+1} , las semi-anchura derecha e izquierda de los picos. Con este criterio, se adopta por lo general, un umbral de separación de 2.5, aunque este valor sólo es apropiado para los picos gaussianos. Se han propuesto modificaciones del parámetro R_S que consideran además de la anchura de los picos, su asimetría y las relaciones de altura.

Se pueden aplicar también diferentes tipos de relaciones valle-pico, que requieren localizar un punto en el cromatograma, relacionado con el valle existente entre dos picos consecutivos [45]. Este punto no es necesariamente el mínimo en el valle. A continuación, se aplica la siguiente ecuación:

$$v_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad (1.30)$$

donde h_1 representa la altura de la señal en el tiempo del punto del valle y h_2 es la altura medida en el mismo tiempo, desde la línea base hasta la línea recta que se obtiene al unir los máximos de los dos picos próximos. Estos máximos no siempre coinciden con los tiempos de retención de los solutos (un máximo se hallará desplazado en mayor o menor medida, dependiendo de su superposición con el resto de los picos).

b) Pureza de pico

Una COF distinta es la pureza de pico (o complemento de la fracción solapada) [10,12,42,44]. Esta medida cuantifica el porcentaje de área de pico libre de interferencias, de la siguiente forma:

$$p_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (1.31)$$

donde o_i' es el área bajo el pico solapado por un cromatograma hipotético construido con los picos de los compuestos acompañantes en la muestra, y o_i es el área total del pico de interés (Figura 1.4). Esta medida de resolución cae a cero cuando el solapamiento es total y alcanza el valor unidad para la resolución completa. Además, depende de las áreas de pico relativas.

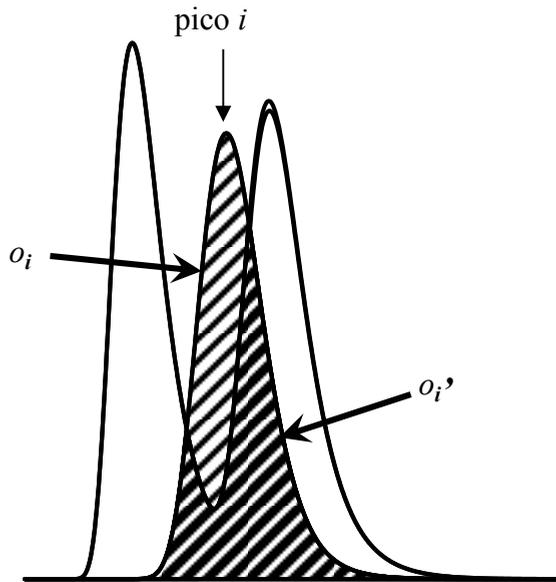


Figura 1.4. Cromatograma ilustrativo de los parámetros utilizados en el criterio de pureza de pico.

El denominado "solapamiento fraccional de pico" (*fractional peak overlap*), es una medida similar propuesta en 1982 por Schoenmakers [46], con poco éxito, ya que requiere el conocimiento de la posición y el perfil para cada pico en el cromatograma, cuyo cálculo era excesivamente complicado con las herramientas informáticas disponibles en aquella época. Sin embargo, el criterio de la "pureza de pico" ofrece ventajas únicas, que se detallan más abajo. Afortunadamente, el desarrollo de los ordenadores y herramientas informáticas, así como la propuesta de modelos de pico más prácticos han reavivado su interés, lo que llevó al grupo de investigación a proponerlo de nuevo [10,12,44].

Debe llamarse la atención sobre el hecho de que los cromatogramas seleccionados como óptimos por diferentes COFs pueden diferir significativamente, y el analista puede encontrar algunos de ellos más aceptables que otros. Este hecho indica la capacidad diversa de las funciones para hacer frente a la búsqueda de las mejores condiciones, incluso cuando el espacio de los factores explorado es el mismo. Esto se puede explicar debido a la simplicidad de muchas COFs, que no tienen en cuenta todas las características que el juicio del analista considera en la evaluación de la calidad de los cromatogramas.

Entre las funciones descritas, la pureza de pico parece correlacionarse más satisfactoriamente con la valoración de la resolución por parte de analistas expertos, incluso cuando los cromatogramas poseen picos notablemente sesgados y ampliamente superpuestos. Además, posee una serie de características que en general hacen que sea el criterio más idóneo.

- (i) Su significado es muy intuitivo: un valor de pureza de pico de 0.95 significa simplemente que el 95% del pico se halla libre de interferencias (o el 5% presenta interferencia o solapamiento). En consecuencia, se relaciona con lo que el analista desea conocer: el área de un pico libre de interferencia.
- (ii) Además, considera no sólo la posición de los picos, sino también su perfil y tamaño, utilizando para ello modelos que describen los picos con gran exactitud. Por lo tanto, proporciona una imagen más realista de la capacidad de separación del sistema.
- (iii) Se trata de una medida intrínsecamente normalizada, que facilita la combinación de resoluciones elementales en un solo valor global y la combinación con otros criterios de calidad.
- (iv) Sin embargo, la característica que posee quizás más consecuencias, al menos a nivel de cálculo, es que proporciona la calidad de la separación para cada pico individual, en lugar de para cada par de picos. De ahí que el conocimiento de la identidad de los picos vecinos no sea tan importante como para los criterios basados en medidas sobre pares de pico (como el criterio clásico R_S). Además, ciertas operaciones, tales como la ponderación o la exclusión de los picos son más sencillas, y se evitan los problemas relacionados con el cruce de picos, puesto que cualquier otro pico en el cromatograma se considera como una interferencia.

El concepto de pureza de pico ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de optimización. Por un lado, el hecho de que sea capaz de anticipar la capacidad de resolución máxima del sistema de separación resulta particularmente útil para hacer frente a situaciones de baja resolución, donde los criterios de resolución convencionales fallan [8,47,48]. Por otro lado,

permite la optimización simultánea de dos o más fases móviles, eluyentes y/o columnas, o incluso estrategias de separación (búsqueda de situaciones complementarias) [48–51], aunque para estas aplicaciones otras evaluaciones de resolución podrían ser igualmente válidas, siempre que sean capaces de asociar un valor particular a cada soluto.

1.3. Uso de equilibrios secundarios en RPLC

En RPLC, los solutos se separan en base al establecimiento de interacciones hidrofóbicas con la capa alquil-enlazada de la fase estacionaria, en combinación con la fuerza solubilizadora del disolvente orgánico en la fase móvil. Por consiguiente, los compuestos orgánicos ionizados y los aniones inorgánicos o los iones metálicos, que son polares, muestran poca o ninguna retención. Este comportamiento ha supuesto un gran reto a lo largo del desarrollo de las aplicaciones de la RPLC a la química ambiental, química clínica y química de los alimentos.

La situación se complica todavía más al no existir un soporte ideal para la construcción de fases estacionarias. La gran mayoría de fases estacionarias se preparan a partir de sílice, debido a sus atractivas propiedades: su fácil derivatización, porosidad, estabilidad mecánica e incompresibilidad, así como la posibilidad de controlar el tamaño de las partículas. Sin embargo, debido a problemas estéricos en el proceso de derivatización, una cierta cantidad de silanoles permanecen en la fase estacionaria sin derivatizar, y cuando éstos están ionizados, pueden interactuar con los analitos catiónicos mediante un proceso de intercambio iónico que incrementa su retención (en algunos casos excesivamente). Además, desafortunadamente, la cinética del proceso de

adsorción-desorción sobre los silanoles es lenta, lo que da lugar a picos anchos con colas pronunciadas [52–54].

El diseño de estrategias orientadas a eliminar o minimizar en la medida de lo posible el efecto de los silanoles residuales sobre los compuestos catiónicos, en RPLC, es un tema de gran interés para los cromatografistas, al que se ha dedicado mucho esfuerzo en las últimas décadas [55]. Una práctica muy eficaz para enmascarar el efecto de los silanoles es la adición de compuestos a la fase móvil que son adsorbidos sobre la fase estacionaria, modificando sus propiedades [7]. Experimentalmente, esta estrategia es sencilla de aplicar, ya que basta con añadir a la fase móvil acuo-orgánica tamponada una pequeña cantidad del enmascarante seleccionado. Esto origina diversos equilibrios secundarios, tanto en el seno de la fase estacionaria como en la fase móvil, entre los que destacan: el intercambio de protones para los compuestos ionizables, el intercambio iónico con reactivos iónicos lipofílicos adsorbidos sobre la fase estacionaria capaces de atraer a los analitos con carga opuesta o de suprimir la actividad silanofílica, la formación de pares iónicos analito-reactivo en la fase móvil, o la complejación de los iones metálicos.

Todos estos equilibrios se pueden expresar de acuerdo a la reacción general:



donde A es el analito o el grupo silanol en el soporte de sílice, y X es el H⁺, un ion lipofílico, un ligando u otra especie añadida a la fase móvil. El factor de retención observado (*k*) es una media ponderada de la retención de las dos especies implicadas en el equilibrio (compárese con la Ecuación (1.11)):

$$k = k_A \delta_A + k_{AX} \delta_{AX} = \frac{k_A + k_{AX} K[X]}{1 + K[X]} \quad (1.33)$$

donde δ_A y δ_{AX} son las fracciones molares de A y AX, respectivamente, $[X]$ es la concentración molar del reactivo X en la fase móvil, y K la constante de formación.

La situación puede ser aún más compleja, puesto que pueden establecerse dos o más equilibrios secundarios, simultáneamente, dentro de la columna. El objetivo de incorporar equilibrios secundarios es mejorar el resultado cromatográfico (las retenciones absoluta y relativa, y la forma de los picos cromatográficos). Esta metodología ha dado lugar a nuevos modos cromatográficos que han ampliado de forma considerable el número de compuestos que pueden ser analizados mediante RPLC.

1.3.1. Mecanismo de retención en cromatografía de interacción iónica

Se consiguen nuevos modos cromatográficos que permiten una gran amplitud de aplicaciones, añadiendo aniones o cationes en baja concentración a las mezclas acuo-orgánicas utilizadas como fases móviles en la RPLC convencional [56–60]. Dichos reactivos se adsorben sobre la fase estacionaria. Al grupo de métodos se le ha denominado "cromatografía de interacción iónica" (CII), o más comúnmente (y de forma incorrecta) "cromatografía de pares iónicos". Generalmente, el reactivo está formado por un ion orgánico voluminoso que posee una región lipofílica que interacciona con las cadenas alquílicas enlazadas a la fase estacionaria, y una región cargada que interacciona con el analito. La modificación de la fase estacionaria permite la separación de mezclas de especies iónicas y neutras. La retención viene determinada también por la naturaleza y la concentración del contraión del reactivo y por el disolvente orgánico utilizado, así como por iones con la

misma carga que el analito disueltos en la fase móvil, que compiten con él por los puntos de interacción en el sistema cromatográfico.

En principio, cualquier sal que contenga un ion lipofílico puede ser utilizada como reactivo en CII. Para separar aniones, la fase estacionaria debe contener cationes inmovilizados. Por el contrario, para separar cationes, debe contener aniones inmovilizados. En la mayoría de aplicaciones, se utilizan sales de alquil-amonio o tetra-alquilamonio para aniones y alquil-sulfatos o alquil-sulfonatos para cationes (con cadenas alquílicas de diferentes longitudes). Cuanto más larga es la cadena, más hidrofóbico es el reactivo y más fuerte su adsorción sobre las cadenas enlazadas a la fase estacionaria. El contraión en las sales de alquil-amonio puede ser inorgánico (cloruro, hidróxido o fosfato) u orgánico (salicilato o tartrato). El catión para las sales de alquil-sulfato y alquil-sulfonato es generalmente el sodio o el potasio. Reactivos más recientes son los líquidos iónicos y diversos iones caotrópicos.

La misma columna se puede convertir en un intercambiador aniónico o catiónico. La capa adsorbida de ion lipofílico puede eliminarse mediante el lavado de la columna con un disolvente orgánico, tal como metanol. Al aumentar la concentración del reactivo de CII, aumenta la retención, siempre que la superficie de la fase estacionaria no alcance la saturación. Por su parte, al incrementarse la concentración del disolvente orgánico, la retención disminuye debido a la desorción del reactivo y a la competencia de los equilibrios establecidos en la fase móvil. Por lo tanto, tanto el reactivo de CII, como el disolvente orgánico, deben mantenerse constantes en la fase móvil a las concentraciones especificadas, a fin de obtener una capacidad de intercambio iónico reproducible.

No es esencial que el contraión sirva como ion competidor de intercambio iónico. Se puede utilizar otro ion, tal como fosfato, citrato, oxalato o ftalato, que a menudo se añaden para ayudar a la elución de aniones fuertemente retenidos. Los analitos deben hallarse ionizados para portar carga y así poder interactuar con el contraión del reactivo de CII. Por lo tanto, la retención de los compuestos ionizables depende del pH y de su pK_a (que se ve modificado por la interacción de las especies iónicas con el contraión del reactivo). La adsorción del contraión en la columna, la interacción entre los solutos iónicos y el contraión, y especialmente, la ionización de los solutos y los componentes del tampón, dependen de la temperatura. Por ello, la reproducibilidad del sistema requiere un control muy estricto de la temperatura. Otras consideraciones son:

- (i) La necesidad de un tiempo de equilibrado más largo, a fin de conseguir un recubrimiento del contraión constante, especialmente en elución en gradiente.
- (ii) El hecho de que algunos contraiones tienden a asociarse muy fuertemente a la fase estacionaria cambiando sus propiedades iniciales, de forma irreversible.
- (iii) La necesidad de saturar la fase móvil con sílice para algunos reactivos mediante la inserción de una pre-columna entre la bomba y el sistema de inyección.
- (iv) La aparición de picos del sistema en los cromatogramas, debido a la presencia del reactivo en la fase móvl.

Desgraciadamente, los reactivos lipofílicos tradicionales no suelen ser compatibles con los detectores evaporativos de dispersión de luz (ELS, *evaporative light scattering*) y espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), lo que puede representar una importante limitación.

1.3.2. El efecto silanol y su supresión con aditivos

Los compuestos que poseen un nitrógeno básico constituyen una fracción significativa de los fármacos utilizados en la terapia moderna. Un gran número de compuestos de importancia biomédica y biológica son también bases o zwitteriones. Tal como se ha comentado, el análisis mediante RPLC de estos compuestos con columnas de base sílice es muy problemático. La ionización de los silanoles, que permite su interacción con los analitos no se puede suprimir totalmente utilizando fases móviles ácidas en el intervalo de pH 2.5–7.5. Por este motivo, se ha invertido mucho esfuerzo en mejorar la química de las fases estacionarias alquil-enlazadas.

Las diferencias en el comportamiento de los materiales utilizados en fases estacionarias consideradas como del mismo tipo (como las C₁₈), hacia los compuestos básicos, se debe a diferencias en el material de sílice del soporte, el tipo de enlace silano y la calidad del recubrimiento, lo que da lugar a distintas concentraciones de los silanoles superficiales. Sin embargo, no dejan de ser atractivas las variaciones en la selectividad entre los materiales de diversas marcas de columnas. La RPLC nunca habría conseguido una aplicabilidad tan amplia si sólo existieran fases estacionarias conteniendo exclusivamente cadenas alquílicas. Con la nueva generación de columnas de RPLC (fabricadas con mejores tecnologías de enlazado y sílice ultrapura), la influencia de los silanoles superficiales sobre la retención de los analitos básicos es menos importante. No obstante, los picos cromatográficos siguen siendo asimétricos, incluso utilizando las columnas más modernas.

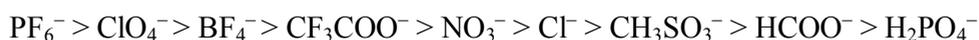
Existen al menos tres soluciones para evitar el efecto de los silanoles libres:

- (i) La reducción del valor del pH por debajo de 3 (ya comentado) para protonar los silanoles residuales (sin embargo, el uso de un pH extremo puede dañar el empacado de sílice).
- (ii) El incremento del pH para obtener analitos neutros (pero simultáneamente se disocian más silanoles).
- (iii) El enmascaramiento de la interacción electrostática con reactivos de CII (pero aparece un fondo adicional para la detección MS, y las propiedades de la columna pueden quedar permanentemente alteradas si el reactivo no se puede eliminar de la fase estacionaria).

La forma de los picos cromatográficos se puede mejorar mediante el uso de fases móviles ácidas que contienen aniones hidrofóbicos, tales como alquil-sulfatos o alquil-sulfonatos, pero esta estrategia no siempre tiene éxito, y la retención de los compuestos básicos puede aumentar excesivamente. El uso de aminas como bloqueantes de los silanoles libres (también llamados agentes supresores) se halla muy extendida [61,62]. Se consigue una mejor acción supresora con los sustituyentes voluminosos. Las aminas cuaternarias o aminas con cadenas alquilo largas parecen ser las mejores. Junto con la mejora en la forma de los picos, disminuye la retención. Otra opción es el uso de una combinación adecuada de dos contraiones de carga opuesta en la fase móvil, tal como un alquil-sulfonato y una amina protonada. Mientras que el alquil-sulfonato actúa como reactivo de CII, las aminas orgánicas enmascaran los silanoles residuales, produciendo una separación satisfactoria en tiempos de análisis razonables.

1.3.3. Uso de iones caotrópicos y líquidos iónicos

Se utilizan también diversos aniones (en su mayoría inorgánicos) para separar zwitteriones y compuestos básicos, a valores de pH bajos. Se obtiene una mayor retención y simetría de pico utilizando aniones que poseen una carga menos localizada, mayor polarizabilidad y menor grado de hidratación, de acuerdo a la siguiente tendencia (llamada serie de Hofmeister):



Los aniones más lipofílicos pueden proporcionar un rendimiento similar a los aniones utilizados tradicionalmente en RPLC, pero con menos inconvenientes. Por otro lado, no se conoce bien el mecanismo de retención para los aniones más hidrofílicos, ya que su capacidad de adsorción es pequeña. Ésta se ha explicado teniendo en cuenta que los analitos básicos catiónicos quedan generalmente bien solvatados por la fase móvil acuosa y poseen poca afinidad por la fase lipofílica. Sin embargo, pueden interactuar en la fase móvil con los aditivos aniónicos formando un par iónico, que produce la destrucción de la capa de solvatación. Dado que el par iónico es más lipofílico que el analito libre, es más fuertemente retenido por la fase estacionaria.

Por su parte, reactivos, tales como el salicilato de hexilamina, el fosfato de butilamonio o los líquidos iónicos, tienen un carácter dual (se adsorben ambos catión y anión). En RPLC, los líquidos iónicos se comportan de forma similar a las sales disociadas [63–65].

1.3.4. La cromatografía líquida micelar

a) Existencia de un equilibrio secundario adicional en la fase móvil

Por encima de una cierta concentración de un reactivo de CII, en la fase móvil, la fase estacionaria se satura. Más allá de este umbral, la retención, en lugar de aumentar aún más, disminuye progresivamente debido a una serie de efectos secundarios, tales como el desplazamiento del analito adsorbido por el contraíón del reactivo de CII, la formación en la fase móvil de pares iónicos entre el analito y el contraíón del reactivo de CII, o en el caso de los surfactantes, la interacción con agregados dinámicos denominados micelas, que se forman por encima de la denominada concentración micelar crítica (CMC). Las micelas se comportan como una nueva fase (o pseudofase) dentro de la fase móvil, lo que da lugar a otro modo de RPLC, al que se ha denominado cromatografía líquida micelar (MLC, *micellar liquid chromatography*) [66–69].

Por lo tanto, la MLC es un tipo de "cromatografía líquida de pseudofase", en la que la fase móvil contiene entidades que interactúan con los analitos, tales como micelas, ciclodextrinas, vesículas o gotitas de aceite de tamaño nanométrico en las microemulsiones de aceite en agua. La MLC ha tenido más impacto que otros modos cromatográficos de pseudofase. Su selectividad única se atribuye a la capacidad de las micelas de organizar solutos a nivel molecular. Sin embargo, la asociación entre los monómeros de surfactante y la fase enlazada (que forma una superficie similar al exterior de las micelas) tiene implicaciones profundas con respecto a la retención, la selectividad y la eficacia.

La cantidad de surfactante adsorbido permanece constante o se encuentra cerca de la saturación cuando se alcanza la CMC, lo que es una característica importante respecto a la robustez de los métodos. Los analitos se separan sobre

la base de su reparto diferencial entre la fase acuosa y los agregados micelares o la fase estacionaria modificada por el surfactante. Así, se añade un equilibrio secundario a la fase móvil, que puede ser alterado para los compuestos ionizables variando el pH de la fase móvil.

Las especies insolubles se transfieren de forma directa entre las micelas y la fase estacionaria modificada por el surfactante. Se pueden utilizar surfactantes con grupos iónicos, zwitteriónicos y no iónicos para separar analitos iónicos y analitos capaces de interactuar con el surfactante de forma distinta a la interacción electrostática. El factor estérico también puede ser importante. El surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulphate*) es el más común en MLC [67], utilizándose en dos tercios de las aplicaciones publicadas, seguido por el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, *cetyltrimethylammonium bromide*), de carácter catiónico, y el polioxietileno(23)dodeciléter (comúnmente conocido como Brij-35), de carácter no iónico. El Brij-35 también se aplica para emular procesos de reparto *in vitro* en biomembranas, en un modo cromatográfico al que se ha denominado "cromatografía líquida micelar de bioreparto".

b) Cromatografía líquida micelar híbrida

La idea de utilizar disoluciones micelares acuosas como fases móviles es atractiva, pero adolece de dos problemas principales cuando se compara con la RPLC convencional: la excesiva retención de los compuestos apolares y las pobres eficacias, ambas características debidas al aumento del contenido de carbono en la fase estacionaria. Para mejorar las prestaciones, se añade, por lo general, una cantidad relativamente baja de propanol, butanol, pentanol o acetonitrilo (especialmente propanol) a la fase móvil, lo que disminuye la

retención a valores prácticos, dando lugar a la denominada MLC híbrida. El acetonitrilo, que es un disolvente muy común en RPLC, se ha utilizado en menor medida. El butanol y el pentanol son adecuados para eluir compuestos fuertemente retenidos. No menos importante es que los disolventes orgánicos reducen la cantidad de surfactante adsorbido sobre la fase estacionaria, mejorando con ello la forma de los picos cromatográficos, que puede ser similar o incluso mejor que la obtenida en RPLC convencional.

A pesar de que el modo de separación en MLC híbrida todavía es predominantemente micelar en su naturaleza, la micela es perturbada por el disolvente orgánico, dando lugar a cambios en la CMC y en el número de agregación del surfactante. En principio, se evita un alto porcentaje de disolvente orgánico, que destruiría las micelas. Para preservar su integridad, la concentración de disolvente orgánico no debe superar el 15% para propanol y acetonitrilo, 10% para butanol, y 6% para pentanol (la solubilidad de los dos últimos alcoholes es significativamente mayor en presencia del surfactante). Por otro lado, las fases móviles ricas en disolvente orgánico pueden eliminar por completo los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la superficie de la fase enlazada.

Las características más interesantes ofrecidas por la MLC son:

- (i) La variedad de interacciones que pueden establecerse entre los solutos, la fase estacionaria, la fase acuosa, y las micelas.
- (ii) La posibilidad de separar solutos cargados y neutros en un solo análisis, o analitos de distinta polaridad en ventanas de tiempo de retención más estrechos que en RPLC convencional, haciendo menos necesaria la elución en gradiente.

- (iii) La alta capacidad de solubilización de las micelas, que facilita la disolución de la mayoría de matrices. Se consigue un gran ahorro de tiempo en el análisis de muestras de fluidos fisiológicos, debido a la posibilidad de inyectarlas directamente en la columna, sin realizar tratamientos previos.
- (iv) La baja concentración de disolvente orgánico, lo que se traduce en un menor coste, menor toxicidad, y menor impacto medioambiental de los residuos con respecto a la RPLC convencional.
- (v) La menor evaporación de los disolventes orgánicos (solubilizados por el surfactante), lo que permite mantener fases móviles estables durante un tiempo mayor, y el reciclado de la fase móvil.
- (vi) La mejora en la detección luminiscente, entre otras características.

1.4. Referencias

- [1] W.R. Melander, C. Horváth, *Reversed-phase chromatography*, en *High Performance Liquid Chromatography*, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, 1980, págs. 113–319.
- [2] W.J. Lough, *Reversed phase liquid chromatography*, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (editada por R.A Meyers), Wiley, Nueva York, 2006.
- [3] J.J. Pesek, M.T. Matyska, *Reversed-phase chromatography: Description and applications*, en *Encyclopedia of Chromatography* (editada por J. Cazes), Taylor and Francis, Nueva York, 2006, págs. 719–722.
- [4] A. Soliven, S. Kayillo, R.A. Shalliker, *Reversed phase liquid chromatography*, en *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (editado por J. Reedijk), Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [5] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª edición, Wiley, Nueva York, 1979.

- [6] J.L. Rafferty, J.I. Siepmann, M.R. Schure, *Understanding the retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: insights from molecular simulation*, *Adv. Chromatogr.* 48 (2010) 1–55.
- [7] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, *Secondary chemical equilibria in reversed-phase liquid chromatography*, en *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation* (editado por S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd), Elsevier, Amsterdam, 2013, págs. 87–104.
- [8] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, E. Bosch, M. Rosés, *Considerations on the modelling and optimisation of resolution of ionisable compounds in extended pH-range columns*, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 170–186.
- [9] R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, S.R. Bakalyar, M.A. Arnold, J.A. Nichols, *Control of column temperature in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 211–230.
- [10] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography*, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125–145.
- [11] J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M.C. García Álvarez-Coque, *Interpretive optimisation strategy applied to the isocratic separation of phenols by reversed-phase liquid chromatography with acetonitrile-water and methanol-water mobile phases*, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 31–46.
- [12] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Levels in the interpretive optimisation of selectivity in high-performance liquid chromatography: A magical mystery tour*, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 308–321.
- [13] G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, *Solvent selection in liquid chromatography*, en *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation* (editado por S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd), Elsevier, Amsterdam, 2013, págs. 223–249.

-
- [14] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *The solubility parameter as a tool in understanding liquid chromatography*, *Chromatographia* 15 (1982) 205–214.
- [15] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *Description of solute retention over the full range of mobile phase compositions in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 107–121.
- [16] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr.* 1216 (2009) 1737–1755.
- [17] P. Jandera, *Optimisation of gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 11–22.
- [18] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter*, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219–229.
- [19] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute-mobile phase-stationary phase polarity parameters*, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19–34.
- [20] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, *Modelling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes*, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 577–590.
- [21] C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, *The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219–232.
- [22] S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 1065–1083.

- [23] S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Alternating iterative regression method for dead time estimation from experimental designs*, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 625–636.
- [24] J.W. Dolan, *Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 965 (2002) 195–205.
- [25] S. Heinisch, J.L. Rocca, *Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 642–658.
- [26] J.J. Baeza Baeza, Y. Dávila, J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, *Measurement of the elution strength and peak shape enhancement at increasing modifier concentration and temperature in RPLC*, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 2973–2984.
- [27] V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Enhancement of retention predictions in reversed-phase liquid chromatography using reference compounds*, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 191–197.
- [28] S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds*, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 49–62.
- [29] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ. 2007.
- [30] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *The linear solvent strength model of gradient elution*, Adv. Chromatogr. 38 (1998) 115–185.
- [31] R. Cela, E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, *Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1287 (2013) 2–22.
- [32] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks*, Anal. Chem. 69 (1997) 3822–3831.

-
- [33] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Half-width plots, a simple tool to predict peak shape, reveal column kinetics and characterize chromatographic columns in liquid chromatography: state of the art and new results*, J. Chromatogr. A 1314 (2013) 142–153.
- [34] A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, *Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 892 (2000) 75–106.
- [35] I. Molnár, *Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software*, J. Chromatogr. A 965 (2002) 175–194.
- [36] S.V. Galushko, A.A. Kamenchuk, G.L. Pit, *Calculation of retention in reversed-phase liquid chromatography. IV. ChromDream software for the selection of initial conditions and for simulating chromatographic behavior*, J. Chromatogr. A 660 (1994) 47–59.
- [37] R. Cela, M. Lores, *PREOPT-W: A simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC. I. Fundamentals and overview*, Comput. Chem. 20 (1996) 175–191.
- [38] S. Heinisch, C. Lesellier, C. Podevin, J.L. Rocca, A. Tchaplá, *Computerized optimization of RP-HPLC separation with nonaqueous or partially aqueous mobile phases*, Chromatographia 44 (1997) 529–537.
- [39] J.R. Torres Lapasió, *MICHRON software*, comercializado con el libro *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [40] P.J. Schoenmakers, J.K. Strasters, A. Bartha, *Correction of the resolution function for non-ideal peaks*, J. Chromatogr. A 458 (1988) 355–370.
- [41] R. Cela, C.G. Barroso, J.A. Pérez-Bustamante, *Objective functions in experimental and simulated chromatographic optimization. Comparative study and alternative proposal*, J. Chromatogr. 485 (1989) 477–500.
- [42] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Evaluation of several global resolution functions for liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 61–74.
-

- [43] E.J. Klein, S.L. Rivera, *A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 23 (2000) 2097–2121.
- [44] S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187–198.
- [45] R.D. Caballero, S.J. López Grío, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Single-peak resolution criteria for optimization of mobile phase composition in liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 24 (2001) 1895–1919.
- [46] P.J. Schoenmakers, *Optimisation of Chromatographic Selectivity: A Guide to Method Development*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [47] A. Ortín, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Finding the best separation in situations of extremely low chromatographic resolution*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2240–2251.
- [48] A. Ortín Sebastián, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *A complementary mobile phase approach based on the peak count concept oriented to the full resolution of complex mixtures*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5829–5836.
- [49] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Complementary mobile-phase optimisation for resolution enhancement in high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 876 (2000) 17–35.
- [50] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *A hybrid genetic algorithm with local search: I. Discrete variables: Optimisation of complementary mobile phases*, Chemom. Intell. Lab. Syst. 59 (2001) 89–106.
- [51] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Towards the optimization of complementary systems in reversed-phase liquid chromatography*, Chromatographia 56 (2002) 699–707.

- [52] U.D. Neue, *Silica gel and its derivatization for liquid chromatography*, en Encyclopedia of Analytical Chemistry (editada por R.A. Meyers), Wiley, Nueva York, 2006.
- [53] J. Nawrocki, *The silanol group and its role in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29–71.
- [54] S. Bocian, B. Buszewski, *Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC: A contribution for a better understanding*, J. Sep. Sci. 35 (2012) 1191–1200.
- [55] D.V. McCalley, *The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 858–880.
- [56] A. Bartha, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, *Basis of the rational selection of the hydrophobicity and concentration of the ion-pairing reagent in reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr 499 (1990) 423–434.
- [57] J.G. Chen, S.G. Weber, L.L. Glavina, F.F. Cantwell, *Electrical double-layer models of ionmodified (ion-pair) reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr A 656 (1993) 549–576.
- [58] A. Makarov, R. LoBrutto, Y. Kazakevich, *Lipophilic mobile phase additives in reversed phase HPLC*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 31 (2008) 1533–1567.
- [59] T. Cecchi, *Ion pairing chromatography*, Crit. Rev. Anal. Chem. 3 (2008) 161–213.
- [60] T. Cecchi, P. Passamonti, *Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1789–1797.
- [61] J.S. Kiel, S.L. Morgan, R.K. Abramson, *Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr A 320 (1985) 313–323.

- [62] M. Reta, P.W. Carr, *Comparative study of divalent metals and amines as silanol-blocking agents in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 855 (1999) 121–127.
- [63] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, *Ionic liquids in separation techniques*, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 6–18.
- [64] Y. Wang, M. Tian, W. Bi, K.H. Row, *Application of ionic liquids in high performance reversed-phase chromatography*, Int. J. Mol. Sci. 10 (2009) 2591–2610.
- [65] D.J. Manishkumar, J.L. Anderson, *Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry*, RSC Advances 2 (2012) 5470–5484.
- [66] A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Separation Science Series (editada por J. Cazes), Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [67] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *New insights and recent developments in micellar liquid chromatography*, Sep. Purif. Rev. 38 (2000) 45–96.
- [68] S. Carda Broch, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography. Fundamentals*, Analytical Separation Science Series, Volumen 2 (editado por J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez, A.M. Stalcup), Wiley, Nueva York, 2015.
- [69] S. Carda Broch, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography. Method development and applications*, Analytical Separation Science Series, Volumen 2 (editado por J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez, A.M. Stalcup), Wiley, Nueva York, 2015.

CAPÍTULO 2

**MODELIZACIÓN DE LA RETENCIÓN Y DEL PERFIL DE
LOS PICOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FASE
INVERSA UTILIZANDO ELUCIÓN EN GRADIENTE**

2.1. Summary

The optimisation of the experimental conditions in gradient reversed-phase liquid chromatography requires reliable algorithms for the description of the retention and peak profile. As in isocratic elution, the linear relationship between the logarithm of the retention factor and the solvent contents is only acceptable in relatively small concentration ranges of modifier. However, more complex models may not allow an analytical integration of the general equation for gradient elution. Alternative approaches for modelling the retention in linear gradient elution are here proposed. Those based on the quadratic logarithmic model and a model proposed for normal liquid chromatography yielded accurate predictions of the retention time for a wide range of initial concentrations of organic modifier and gradient slopes, with errors usually below 1–2%. Based on the half-width changes of chromatographic peaks along one or more gradients, an approach is also reported to predict the peak profile with low errors (usually below 2–3%). The proposed approaches were applied to two sets of probe compounds (diuretics and flavonoids), eluted with acetonitrile-water gradients. The changes in retention and peak shape in isocratic and gradient elution are illustrated through diagrams that define triangular regions including all possible values of retention factors or peak half-widths (or widths) inside the selected working ranges.

2.2. Introducción

Tal como se ha comentado en el Capítulo 1, en cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), la separación de mezclas de compuestos que cubren un amplio intervalo de polaridades no puede realizarse en tiempos de análisis prácticos, mediante elución isocrática. La obtención de tiempos de análisis razonables requiere elución en gradiente [1–3]. En la última década, varios autores han propuesto métodos para predecir la retención en este modo de elución [4–14], que complementan y mejoran trabajos anteriores en este campo [2,15]. Las fuentes de incertidumbre en las predicciones en elución en gradiente [16–21], o la transferencia de datos entre la elución isocrática y en gradiente [20,22,23] han sido ampliamente discutidas.

La ecuación general para la elución en gradiente, que se deriva de investigaciones realizadas por Freiling [24,25] y Drake [26], y más tarde recuperadas por Snyder [22], requiere la resolución de la siguiente ecuación integral:

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt_c}{k(\varphi(t_c))} \quad (2.1)$$

donde t_c es un tiempo corregido que considera los cambios en la concentración del modificador orgánico (φ) en el punto en el que se encuentra el soluto dentro de la columna en un momento dado, t_0 es el tiempo de retención para un soluto no retenido, y t_g el tiempo de retención bajo condiciones de gradiente (la variable que interesa predecir). La función $k(\varphi(t_c))$ describe la variación del factor de retención (k) en función de la composición de la fase móvil, a lo largo de la migración del soluto dentro de la columna. Debe observarse que la Ecuación (2.1) considera que el gradiente alcanza instantáneamente la entrada

de la columna (no se ha incluido el retardo asociado al tiempo que tarda el frente del gradiente en alcanzar la entrada de la columna, denominado "tiempo de retardo"; en inglés, "*dwell time*"). Más tarde, este efecto se tendrá en cuenta en el tratamiento.

La Ecuación (2.1) puede resolverse analíticamente sólo en algunos casos, por ejemplo, cuando ambas funciones $\ln k(\varphi)$ y $\varphi(t_c)$ son lineales:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (2.2)$$

$$\varphi = \varphi_0 + mt_c \quad (2.3)$$

donde k_w es el factor de retención en agua, S la denominada "fuerza eluyente", φ_0 la concentración inicial del modificador a la entrada de la columna, y m la pendiente del gradiente:

$$m = \frac{\Delta\varphi}{t_G} \quad (2.4)$$

donde $\Delta\varphi$ es la diferencia entre las concentraciones final e inicial de modificador orgánico en el gradiente, y t_G el tiempo total del gradiente. La combinación de las Ecuaciones (2.2) y (2.3) es la base de la teoría de la fuerza eluyente lineal (*solvent strength model*) [1–3,27], que puede extenderse a la construcción de varios segmentos lineales consecutivos (gradientes lineales múltiples) [5,12,28].

La Ecuación (2.2) describe la retención con exactitud sólo en intervalos de concentración del modificador orgánico relativamente estrechos [16,18,21,29]. Para intervalos más amplios, se debe añadir un término cuadrático para obtener una descripción adecuada:

$$\ln k = \ln k_w - a\varphi + b\varphi^2 \quad (2.5)$$

donde a y b son los parámetros del modelo (un parámetro más que para la Ecuación (2.2)). Una limitación de esta ecuación, cuando se utiliza elución en gradiente, es que la integración analítica de la Ecuación (2.1) depende de la función de error [30]. Otros modelos presentan limitaciones similares. Un ejemplo es un modelo que ha llamado la atención recientemente, que considera la diferencia entre la polaridad de la fase móvil y la fase estacionaria [31]. Para mezclas de acetonitrilo-agua adquiere la forma:

$$\ln k = \ln a - b \frac{2.068\varphi}{1 + 1.341\varphi} \quad (2.6)$$

donde a y b son los parámetros del modelo.

Independientemente del modelo de retención, la integración analítica no puede realizarse cuando el cambio en la concentración del modificador orgánico con el tiempo no es lineal (gradientes no lineales). Cabe señalar, sin embargo, que los gradientes no lineales pueden ser resueltos satisfactoriamente mediante su aproximación a sumas de varios segmentos lineales [5,12,17,28]. En un enfoque propuesto por Cela *et al.*, los gradientes no lineales se asimilan a gradientes multi-escalonados [32–34].

En cualquier caso, cuando la integración analítica de la Ecuación (2.1) no es posible, se puede acudir a la integración numérica [35,36]. Sin embargo, su cálculo es algo más lento y requiere conocimientos de programación. Por el contrario, la integración analítica (cuando es posible) es rápida, y las expresiones son relativamente simples. En este trabajo, se presenta un método alternativo para predecir la retención en RPLC con gradientes lineales, utilizando los modelos cuadrático (Ecuación (2.5)) y de polaridad (Ecuación (2.6)). También se propone un algoritmo que predice con gran exactitud las

semi-anchuras de los pico en elución en gradiente, a fin de mejorar la fiabilidad de los cromatogramas predichos.

2.3. Parte experimental

2.3.1. Reactivos y columnas

Se estudió la elución isocrática y en gradiente para dos conjuntos de compuestos de prueba: los diuréticos furosemida (FURO), altiazida (ALT) y tricloremetiazida (MLTC), adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), ácido etacrínico (ETHA), cedido por Merck, Sharp & Dohme (Madrid), y xipamida (XIPA), cedida por Lacer (Barcelona), y los flavonoides baicaleína (BAI), flavona (FLA), 3-hidroxi-flavona (3OH), 5-hidroxi-flavona (5OH), y quercetina (QUE), adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Los diuréticos y los flavonoides se disolvieron en unos pocos mililitros de metanol y acetonitrilo, respectivamente, ambos de Scharlau (Barcelona) de grado HPLC. Las disoluciones iniciales de los compuestos de prueba se diluyeron con agua hasta alcanzar la concentración de las disoluciones madre y de inyección (100 y 10 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, y se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

En todos los casos, las fases móviles se prepararon con acetonitrilo de grado HPLC. Para los diuréticos, la concentración de acetonitrilo en elución isocrática osciló en el intervalo 28–56% v/v. En elución en gradiente, la concentración inicial de acetonitrilo osciló entre el 22 y el 52% v/v, y las pendientes del gradiente entre 0.2 y 1.33% de acetonitrilo/min. Para los flavonoides, tanto la concentración de acetonitrilo en elución isocrática, como la concentración inicial de acetonitrilo en elución en gradiente oscilaron en el

intervalo 28–58%, y las pendientes del gradiente entre 0.4 y 1.6% de acetonitrilo/min. Las fases móviles se tamponaron a pH 3 con ácido cítrico de Panreac (Barcelona) de concentración 0.01 M y NaOH de Scharlau.

A lo largo de las experiencias se utilizó agua nanopura, obtenida con un sistema de purificación Barnstead de Sybron (Boston, MA, EE.UU.). Las fases móviles y las disoluciones de los compuestos de prueba se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45 μm , con un diámetro de 47 mm (Magna) y 17 mm (Cameo), respectivamente, de Osmonics (Herentals, Bélgica).

Para los diuréticos, la separación se llevó a cabo con una columna Spherisorb ODS-2 (125 mm \times 4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula) de Scharlau. Para los flavonoides, se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 \times 4.6 mm y 5 μm) de Agilent (Waldbronn, Alemania). Ambas columnas se protegieron con una pre-columna de características similares (30 mm \times 4.0 mm y 5 μm). El tiempo muerto se midió a partir de la primera perturbación en el cromatograma, arrojando valores medios de 0.84 y 1.18 min para las columnas Spherisorb y Zorbax, respectivamente.

2.3.2. Instrumentación

El sistema de HPLC (de Agilent) estaba equipado con los siguientes módulos: bomba cuaternaria, muestreador automático, compartimento de columnas termostático y detector UV-visible de onda variable (Series 1100, 1200 y 1260). Las señales se monitorizaron a 254 nm y la temperatura se mantuvo a 25°C. El caudal de fase móvil fue, en todos los casos, 1 ml/min. Se realizaron inyecciones por triplicado (10 μL) a lo largo de todas las experiencias.

El volumen de retardo (volumen total que existe desde el punto en el que se genera el gradiente y la entrada de la columna) se determinó sustituyendo la columna cromatográfica por un conector de volumen muerto cero, unido directamente a la celda del detector. El punto medio de la señal obtenida con un gradiente lineal de 0–100%, formado con agua y un 0.1% de acetona, indicó el tiempo de retardo ($t_d = 0.89$ min).

El pH se midió con una precisión de ± 0.002 unidades de pH, utilizando un potenciómetro de Crison (modelo Microph 2002, Barcelona), y un electrodo de vidrio combinado de Orion (modelo 8102, Barcelona), que contiene electrodos de referencia de Ag/AgCl con una disolución acuosa de KCl 3.0 M actuando como puente salino. El electrodo se calibró con tampones acuosos, y el pH de las fases móviles se midió siempre tras la adición del disolvente orgánico.

La adquisición de datos se llevó a cabo con una estación de datos HPChemStation de Agilent. Los algoritmos fueron implementados en Basic, utilizando el compilador QB64 (software libre) y la herramienta Solver de la hoja de cálculo Excel.

2.4. Base teórica

2.4.1. Ecuaciones analíticas basadas en modelos de retención integrables para describir la elución en gradiente

a) Modelo de la fuerza eluyente del disolvente

Revisaremos, en primer lugar, la integración de la Ecuación (2.1) cuando se describe la elución en gradiente mediante el modelo lineal de la fuerza eluyente del disolvente (modelo de retención lineal y programa de gradiente también lineal). A partir de las Ecuaciones (2.2) y (2.3), se obtiene:

$$k = k_w e^{-S\varphi} = k_w e^{-S(\varphi_0 + mt_c)} = k_w e^{-S\varphi_0} e^{-Smt_c} = k_0 e^{-Smt_c} \quad (2.7)$$

En la Ecuación (2.1), se ha supuesto que el frente del gradiente alcanza instantáneamente la entrada de la columna. Sin embargo, en realidad, el soluto eluye isocráticamente hasta que el gradiente alcanza la columna. Por lo tanto, la elución consistirá en al menos dos etapas: una etapa inicial isocrática y la etapa de gradiente. A partir de las Ecuaciones (2.1) y (2.7):

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt_c}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g - t_0} \frac{dt_c}{k_0 e^{-Smt_c}} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{1}{Smk_0} [e^{Sm(t_g - t_0 - t_d)} - 1] \quad (2.8)$$

donde t_d es el tiempo de retardo, y k_0 el factor de retención para las condiciones iniciales del gradiente:

$$k_0 = e^{\ln k_w - S\varphi_0} \quad (2.9)$$

De la Ecuación (2.8), se obtiene el tiempo de retención en elución en gradiente:

$$t_g = \frac{\ln [1 + Sm(k_0 t_0 - t_d)]}{Sm} + t_0 + t_d \quad (2.10)$$

Una forma práctica de calcular la retención en elución en gradiente es considerando un factor de retención análogo al de elución en el modo isocrático:

$$k_g = \frac{t_g - t_0}{t_0} = \frac{\ln [1 + Sm(k_0 t_0 - t_d)]}{Sm t_0} + \frac{t_d}{t_0} = \frac{\ln [1 + Sm t_0 (k_0 - f)]}{Sm t_0} + f \quad (2.11)$$

b) Modelo de Jandera para cromatografía líquida de fase normal

Es interesante comentar la capacidad de un modelo propuesto por Jandera para cromatografía líquida de fase normal [37,38], que también permite la integración analítica de la Ecuación (2.1):

$$\frac{1}{k} = [a + b\varphi]^n \tag{2.12}$$

donde a , b y n son parámetros del modelo. Mostraremos en este trabajo la aplicación de la Ecuación (2.12) a RPLC. A partir de la Ecuación (2.1):

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt_c}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g-t_0} \frac{dt_c}{[a + b(\varphi_0 + m(t_c - t_d))]^n} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{[a_0 + bm(t_g - t_0 - t_d)]^{n+1}}{(n+1)bm} - \frac{a_0^{n+1}}{(n+1)bm} \tag{2.13}$$

donde

$$a_0 = a + b\varphi_0 \tag{2.14}$$

El factor de retención en las condiciones de gradiente se calcula como:

$$k_g = \frac{\left[\left(t_0 - \frac{t_d}{k_0} \right) (n+1)bm + a_0^{n+1} \right]^{1/(n+1)} - a_0}{bm t_0} + \frac{t_d}{t_0} \tag{2.15}$$

2.4.2. Métodos para describir la elución en gradiente basados en modelos de retención más complejos

Cuando la retención en RPLC se extiende a intervalos amplios de concentración de modificador orgánico, el comportamiento ya no es lineal. No obstante, su complejidad no es mucho mayor que el comportamiento lineal (véase la Figura 2.1).

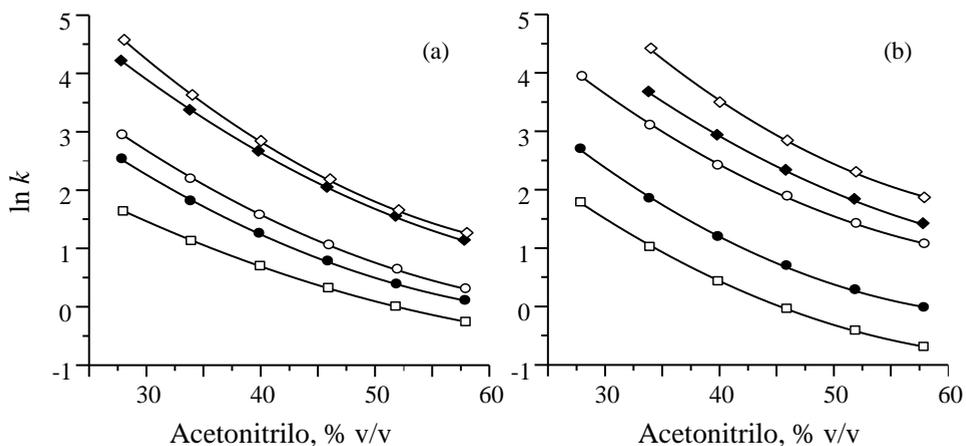


Figura 2.1. Comportamiento de retención en elución isocrática para el conjunto de: (a) diuréticos, y (b) flavonoides. Diuréticos: Triclorometiazida (\square), altiazida (\bullet), furosemida (\circ), xipamida (\blacklozenge) y ácido etacrínico (\diamond). Flavonoides: quercetina (\square), baicaleína (\bullet), flavona (\circ), 3-hidroxi flavona (\blacklozenge), and 5-hidroxi flavona (\diamond). Los puntos son datos experimentales y las líneas corresponden a los ajustes de acuerdo a la Ecuación (2.5).

Bajo esta consideración, se pensó en la posibilidad de desarrollar un nuevo método para describir la retención bajo condiciones de gradiente, inspirado en la ecuación integral obtenida para el modelo lineal (Ecuación (2.11)). En este método, se supone que:

- (i) El comportamiento de retención en elución en gradiente es formalmente similar al que se describe mediante la Ecuación (2.11).
- (ii) Un parámetro similar a S (la pendiente con signo opuesto del modelo lineal logarítmico, Ecuación (2.2)) es la derivada de $\ln k(\varphi)$ (S') para los modelos no lineales (Ecuaciones (2.5) y (2.6)), en la condición inicial del gradiente. Para la Ecuación (2.5), adquiere el valor:

$$S' = - \left(\frac{d \ln k}{d \varphi} \right)_0 = (a - 2b\varphi_0) \quad (2.16)$$

Se encontró que la siguiente relación hiperbólica entre f (véase la Ecuación (2.11)) y φ_0 mejoraba la capacidad descriptora del modelo:

$$f = \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \quad (2.17)$$

donde c es un parámetro del modelo. Esta relación se halló ajustando medidas experimentales en gradiente a la Ecuación (2.11), con pendientes variables del gradiente y la misma concentración inicial del modificador orgánico.

De acuerdo a los supuestos (i) y (ii), y a la Ecuación (2.17), se propone la siguiente ecuación para describir el factor de retención en gradiente en base a la Ecuación (2.5):

$$k_g = \frac{\ln \left[1 - \left(\frac{d \ln k}{d \varphi} \right)_0 m t_0 (k_0 - f) \right]}{- \left(\frac{d \ln k}{d \varphi} \right)_0 m t_0} + f = \frac{\ln \left[1 + (a - 2b\varphi_0) m t_0 \left(k_0 - \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \right) \right]}{(a - 2b\varphi_0) m t_0} + \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \quad (2.18)$$

donde $k_0 = e^{\ln k_w - a\varphi_0 + b\varphi_0^2}$ (2.19)

Del mismo modo, para el modelo de polaridad (Ecuación (2.6)), se obtiene:

$$k_g = \frac{\ln \left[1 + \frac{2.068b}{(1 + 1.341\varphi_0)^2} m t_0 \left(k_0 - \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \right) \right]}{\frac{2.068b}{(1 + 1.341\varphi_0)^2} m t_0} + \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \quad (2.20)$$

donde $k_0 = e^{\frac{\ln a - b}{1 + 1.341\varphi_0}}$ (2.21)

2.5. Resultados y discusión

Los intervalos de tiempo de retención para los compuestos de prueba estudiados, eluidos en los modos isocrático y de gradiente, eran bastante amplios: entre 1.5 y 83 min para los diuréticos, y entre 1.7 y 94 min para los flavonoides. Los factores de asimetría medidos al 10% de la altura de los picos (relación entre la semi-anchura derecha e izquierda, B/A) por lo general fueron inferiores a 1.5 (véase la Tabla 2.1). En primer lugar, se indicará la calidad de los ajustes de los datos experimentales a los modelos descritos en la Sección 2.4, para los diuréticos y los flavonoides. A continuación, se discutirá la descripción de los perfiles de pico en elución isocrática y en gradiente.

2.5.1. Comportamiento de retención y modelos en elución isocrática

La Figura 2.1 representa, para los dos conjuntos de compuestos de prueba, la variación del logaritmo del factor de retención en función de la concentración de acetonitrilo en elución isocrática. Los errores de ajuste para los cuatro modelos de retención considerados en este trabajo (Ecuaciones (2.2), (2.5), (2.6) y (2.12)) se comparan en la Tabla 2.2. Los errores se evaluaron de acuerdo a:

$$\varepsilon_r(\%) = \frac{\sum_i^n |k_i - \hat{k}_i|}{\sum_i^n k_i} \times 100 \quad (2.22)$$

donde k_i y \hat{k}_i se refieren a los factores de retención experimentales y predichos de los solutos, respectivamente, en ambas elución isocrática y en gradiente. Los errores medios de ajuste obtenidos con las Ecuaciones (2.2), (2.5), (2.6) y (2.12) fueron 6.5, 0.7, 2.9 y 0.4%, para los diuréticos, y 7.5, 1.1,

4.3 y 0.4% para los flavonoides, respectivamente. Los ajustes parabólicos a la Ecuación (2.5) fueron muy satisfactorios, como se puede comprobar en la Figura 2.1. Sin embargo, la mayor exactitud se obtuvo con la Ecuación (2.12). Cabe señalar que para conseguir estos resultados, el parámetro a en la Ecuación (2.12) debe poder adquirir valores negativos.

2.5.2. Comportamiento de retención en elución en gradiente

Las Figuras 2.2a y b ilustran, para xipamida y 3-hidroxiavona, la variación del logaritmo del factor de retención para diferentes gradientes, en función de la concentración inicial de acetonitrilo. Las líneas describen la retención al utilizar diferentes pendientes de gradiente (indicadas sobre cada línea). Las líneas superior e inferior corresponden a la elución en el modo isocrático y al gradiente más rápido, respectivamente. Estas líneas definen una región triangular ("triángulo de elución"), que delimita todos los posibles valores del factor de retención para un soluto dado, en las condiciones de trabajo. Las Figuras 2.2c y d muestran los "triángulos de elución" para compuestos de prueba de diversa polaridad (sólo se muestran los datos correspondientes a las condiciones extremas).

Tabla 2.1. Intervalos de tiempo de retención y parámetros de perfil de pico para los compuestos de prueba, en las condiciones experimentales estudiadas (elución isocrática y en gradiente).^a

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Semi-anchura izquierda, A (min)	Semi-anchura derecha, B (min)	B/A
Diuréticos				
TCLM	1.49–8.00	0.0487–0.138	0.0630–0.145	1.05–1.29
ALT	1.76–14.1	0.0503–0.250	0.0598–0.263	1.01–1.23
FURO	1.96–17.2	0.0554–0.371	0.0676–0.380	1.01–1.22
XIPA	3.40–56.5	0.0805–1.328	0.0894–1.380	1.00–1.11
ETHA	3.77–82.9	0.0833–1.799	0.1603–2.621	1.46–2.11
Flavonoides				
QUE	1.75–8.13	0.0547–0.216	0.111–0.239	1.08–2.17
BAI	2.29–18.38	0.0661–0.434	0.107–0.468	1.00–1.66
FLA	4.38–61.97	0.0883–1.172	0.115–1.243	1.03–1.30
3OH ^a	5.41–46.44	0.0986–0.771	0.126–1.019	1.00–1.41
5OH ^a	7.36–94.32	0.1139–1.846	0.133–2.074	1.03–1.17

^a No se han considerado los datos isocráticos obtenidos con 22% de acetonitrilo, para los que $t_R > 100$ min.

Tabla 2.2. Errores de ajuste relativos (%) en la predicción de la retención isocrática utilizando diferentes modelos de retención.^a

Compuesto	Ecuación (2.2)	Ecuación (2.12)	Ecuación (2.5)	Ecuación (2.6)
Diuréticos				
TCLM	5.70	0.42	0.64	2.08
ALT	7.91	0.32	1.11	4.05
FURO	6.94	0.37	0.81	3.17
XIPA	5.64	0.42	0.43	2.09
ETHA	6.51	0.55	0.55	3.15
Flavonoides				
QUE	9.03	0.37	1.36	5.25
BAI	8.75	0.58	1.19	5.26
FLA	7.27	0.48	0.81	3.81
3OH	5.28	0.17	0.53	2.53
5OH	7.40	0.48	1.59	4.68

^a Se ajustaron seis puntos. El número de parámetros del modelo fue dos para las Ecuaciones (2.2) y (2.6), y tres para las Ecuaciones (2.5) y (2.12).

El "triángulo de elución" constituye una sencilla descripción global del efecto de las condiciones de gradiente sobre la retención (la disminución progresiva de la retención que tiene lugar durante el gradiente). Como se sabe, el efecto del gradiente es mayor para los solutos más retenidos, y prácticamente nula para aquéllos débilmente retenidos. En consecuencia, el triángulo es más ancho para los compuestos más apolares.

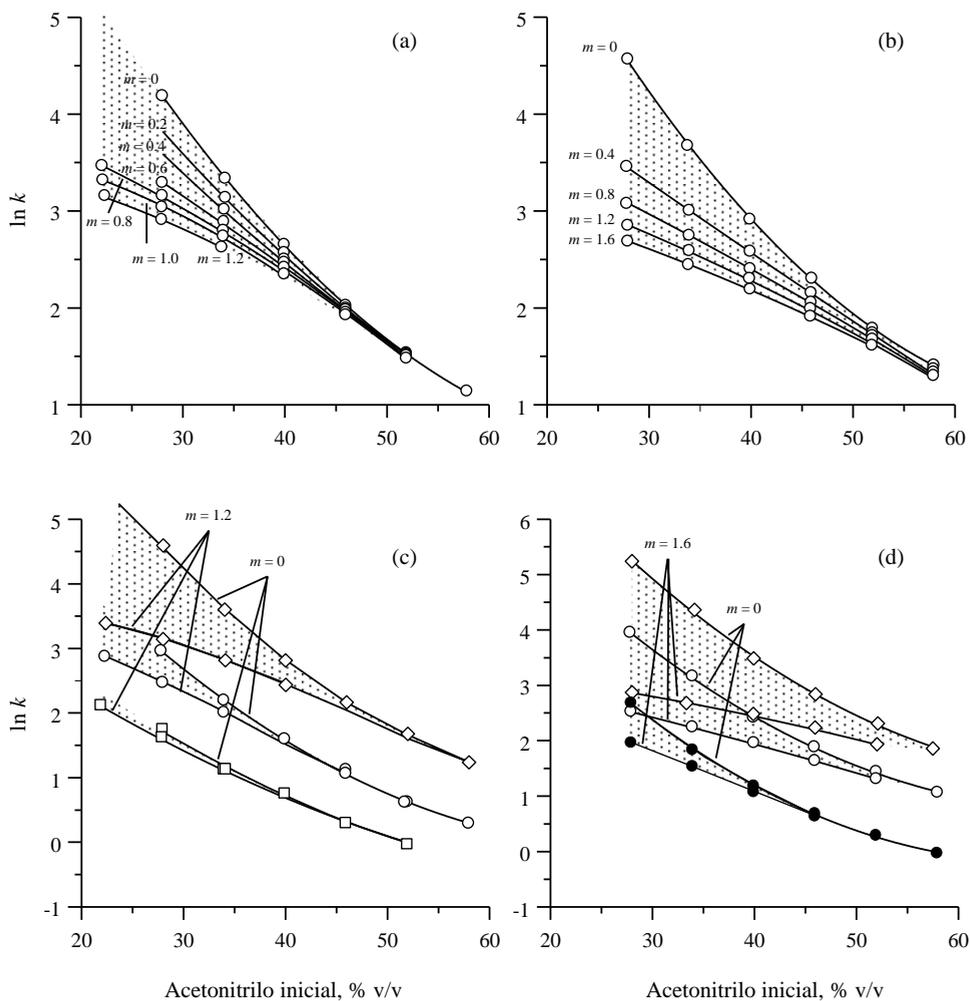


Figura 2.2. Comportamiento de retención en elución en gradiente utilizando distintas concentraciones iniciales de acetonitrilo (φ_0) y diferentes pendientes en el programa de gradiente (m , % acetonitrilo/min), para: (a) Xipamida, (b) 3-hidroxi flavona, (c) los diuréticos triclormetiazida, furosemida y ácido etacrínico, y (d) los flavonoides baicaleína, flavona y 5-hidroxi flavona. Véase la Figura 2.1 para conocer el significado de los símbolos en (c) y (d). Las líneas se ajustaron de acuerdo a la Ecuación (2.18).

Por otro lado, los diagramas de la Figura 2.2 ilustran que el gradiente es más efectivo (la reducción relativa de la retención es mayor) cuando el porcentaje inicial del modificador orgánico, φ_0 , es más bajo. De ahí, la forma triangular del diagrama. Así, para la xipamida, el efecto de diferentes gradientes es similar para $\varphi_0 > 40\%$, mientras que para un soluto más fuertemente retenido (como el ácido etacrínico) y un soluto menos retenido (como la furosemida), el valor de φ_0 por debajo del cual el gradiente es eficaz será mayor o menor, respectivamente (Figura 2.2c). Por ejemplo, en el caso del ácido etacrínico, para $\varphi_0 = 28\%$, el factor de retención se reducirá desde $k = 97.6$ en elución isocrática ($m = 0$) a 25.9 para $m = 0.8\%/min$ ($\Delta k_g = 72.7$), mientras que si $\varphi_0 = 52\%$, disminuirá tan sólo $\Delta k_g = 5.27 - 4.99 = 0.28$. Para la xipamida, el factor de retención disminuirá $\Delta k_g = 66.2 - 23.6 = 42.6$, y $4.62 - 4.41 = 0.21$, y para la furosemida, $19.1 - 12.6 = 6.5$ y $1.89 - 1.86 = 0.03$, para $\varphi_0 = 28$ y 52% , respectivamente, y el mismo intervalo de valores de pendientes de gradiente ($m = 0$ a $0.8\%/min$).

2.5.3. Exactitud de los modelos de retención en elución en gradiente

La implementación de los cuatro modelos estudiados en este capítulo (los modelos logarítmicos lineal y cuadrático, el modelo propuesto por Jandera, y el modelo de polaridad) es similar (las dificultades son similares), con la diferencia de que el número mínimo de experiencias necesarias para ajustar los modelos es tres para las Ecuaciones (2.11) y (2.20), y cuatro para las Ecuaciones (2.15) y (2.18) (el mismo número que parámetros en el modelo).

Tabla 2.3. Errores de ajuste relativos (%) en la predicción de la retención en elución en gradiente, utilizando distintas ecuaciones integradas.^a

Compuesto	Ecuación (2.11)	Ecuación (2.15)	Ecuación (2.18)	Ecuación (2.20)
Diuréticos ^b				
TCLM	6.56 (6.86)	0.42 (0.49)	0.75 (0.83)	1.74 (1.79)
ALT	5.51 (5.84)	0.50 (0.53)	0.82 (0.84)	1.89 (2.36)
FURO	3.89 (4.53)	0.53 (0.56)	0.78 (0.78)	1.19 (1.83)
XIPA	1.70 (4.02)	0.45 (0.49)	0.47 (0.47)	0.79 (1.67)
ETHA	1.89 (5.27)	0.39 (0.45)	0.46 (0.55)	1.19 (2.69)
Flavonoides ^c				
QUE	7.45 (7.79)	1.38 (1.66)	1.11 (1.65)	4.82 (4.29)
BAI	6.05 (7.57)	0.86 (1.13)	0.88 (1.71)	3.09 (4.66)
FLA	3.81 (8.12)	0.49 (0.74)	0.67 (1.20)	2.22 (4.38)
3OH	2.89 (4.33)	0.33 (0.67)	0.71 (1.00)	1.93 (2.50)
5OH	2.01 (6.43)	0.27 (0.81)	0.77 (1.29)	1.74 (3.83)

^a Los datos en paréntesis corresponden al ajuste del conjunto completo de datos isocráticos y de gradiente. El número de parámetros de los modelos fue tres para las Ecuaciones (2.11) y (2.20), y cuatro para las Ecuaciones (2.15) y (2.18).

^b Se ajustó 26 puntos (o 32 puntos incluyendo los datos isocráticos).

^c Se ajustó 20 puntos (o 29 puntos incluyendo los datos isocráticos).

Debe indicarse que para todos los modelos, en elución en gradiente, t_d se consideró como un parámetro ajustable, lo que incrementó la exactitud de las predicciones. Como para cualquier ajuste no lineal, los valores iniciales de los parámetros deben seleccionarse cuidadosamente. A tal efecto, los parámetros isocráticos (si están disponibles) pueden ofrecer buenos valores iniciales. El proceso completo puede llevarse a cabo con la herramienta de Solver de la hoja de cálculo de Excel.

En la Tabla 2.3, se comparan los errores de ajuste para los cuatro modelos de retención indicados para la elución en gradiente (Ecuaciones (2.11), (2.15), (2.18) y (2.20)). Se ajustaron ya bien datos de gradiente, o ambos datos isocráticos y de gradiente conjuntamente (debe observarse que la elución isocrática es un caso particular de la elución en gradiente, para la que $m = 0$). Para evitar las indeterminaciones, el ajuste de los datos isocráticos a las ecuaciones de gradiente se efectuó asignando un pequeño valor a la pendiente del gradiente, tal como $m = 10^{-6}$, en lugar de $m = 0$.

Los errores medios de ajuste obtenidos con las Ecuaciones (2.11), (2.15), (2.18) y (2.20) fueron 3.9, 0.5, 0.7 y 1.4% para los diuréticos, y 4.4, 0.7, 0.8 y 2.8% para los flavonoides, respectivamente. Cuando se incluyeron también en los ajustes datos obtenidos en el modo isocrático, los errores medios de ajuste fueron algo mayores: 5.3, 0.5, 0.7 y 2.1% para los diuréticos, y 6.8, 1.0, 1.4 y 3.9% para los flavonoides, respectivamente. Como se observa, los resultados del ajuste de los datos experimentales a las Ecuaciones (2.15) y (2.18), que se obtienen de las Ecuaciones (2.12) y (2.5), respectivamente, fueron excelentes, con errores por lo general por debajo del 1%. En la Figura 2.2, se puede también apreciar la exactitud de los ajustes a la Ecuación (2.18). Por otro lado, si la concentración inicial del acetonitrilo se mantiene constante (k_0 y φ_0 en la

Ecuación (2.18)) se mantienen fijos), a partir de las Ecuaciones (2.11), (2.18) y (2.20) se puede obtener un modelo de gradiente más sencillo, con sólo tres parámetros (q , p y f). Así, por ejemplo, a partir de la Ecuación (2.11):

$$k_g = \frac{\ln[1 + S t_0 (k_0 - f) m]}{S t_0 m} + f = \frac{\ln(1 + q p m)}{q m} + f \quad (2.23)$$

La capacidad predictora de esta ecuación para la xipamida (eluida utilizando programas de gradiente con diferentes pendientes y concentraciones iniciales de acetonitrilo, φ_0) fue altamente satisfactoria, con errores de 0.18, 0.05, 0.34, 0.25 y 0.28% para $\varphi_0 = 28, 34, 40, 46$ y 52% de acetonitrilo, respectivamente. En la práctica, una forma recomendable de desarrollar un protocolo de gradiente consiste en encontrar un valor φ_0 apropiado para retener razonablemente el soluto más polar, y en una etapa posterior, optimizar la pendiente del gradiente. Este cálculo se puede llevar a cabo fácilmente con la Ecuación (2.23).

Debe resaltarse que los modelos propuestos para la elución en gradiente describen los dos modos de elución (isocrático y gradiente), con errores bajos. Esta característica sugiere la posibilidad de obtener los parámetros del modelo utilizando exclusivamente los datos de retención de experiencias isocráticas, para predecir a continuación la retención en el modo gradiente. La Tabla 2.4 muestra la capacidad predictiva de las Ecuaciones (2.15) y (2.18) (se muestran los errores medios de predicción para todos los datos de gradiente obtenidos para este trabajo), cuando los factores de retención en gradiente fueron predichos a partir de los datos isocráticos para ajustar el modelo. Como se observa, las predicciones fueron muy satisfactorias.

Tabla 2.4. Errores de ajuste relativos (%) en la predicción de la retención en elución en gradiente a partir de datos isocráticos.

Compuesto	Ecuación (2.15) ^a	Ecuación (2.18) ^b
Diuréticos		
TCLM	1.79	1.58
ALT	1.33	2.34
FURO	1.31	2.23
XIPA	0.89	0.78
ETHA	0.64	1.78
Flavonoides		
QUE	2.42	3.88
BAI	1.80	4.22
FLA	2.17	1.59
3OH	2.30	2.21
5OH	3.35	6.19

^a $t_d = 1.5$ (obtenido mediante ajuste)

^b $c = 0.12 \ln k_w$

2.5.4. Descripción de los perfiles de los picos cromatográficos

La elución en gradiente puede dar lugar a una reducción significativa de la anchura de los picos cromatográficos, debido al efecto de compresibilidad [39–41]. Las Figuras 2.3a y b muestran el cambio en la semi-anchura izquierda, medida al 10% de la altura de los picos, frente al tiempo de retención, para xipamida y 3-hidroxi flavona, respectivamente, eluidas utilizando diferentes concentraciones iniciales de acetonitrilo y pendientes de gradiente. Se obtienen diagramas similares para la semi-anchura derecha y la anchura total. Como se observa, los diagramas son casi lineales para la elución en el modo isocrático ($m = 0$), correspondiendo la intersección de las líneas principalmente al ensanchamiento extra-columnar. Las semi-anchuras de pico disminuyen notablemente cuando se incrementa la pendiente del gradiente, pero por encima de un cierto valor de pendiente, los cambios con el tiempo de retención son poco significativos.

Los diagramas de la Figura 2.3 representan "triángulos de perfil de pico", que delimitan todos los valores de semi-anchura o anchura obtenidos en el intervalo de condiciones de trabajo. El triángulo describe de una manera sencilla y global el conocido comportamiento en elución en gradiente: para los solutos altamente retenidos, un aumento de la pendiente del gradiente es muy eficaz para disminuir la anchura de los picos, mientras que para los solutos débilmente retenidos, no se obtienen cambios. Por lo tanto, el comportamiento es similar al observado con la retención.

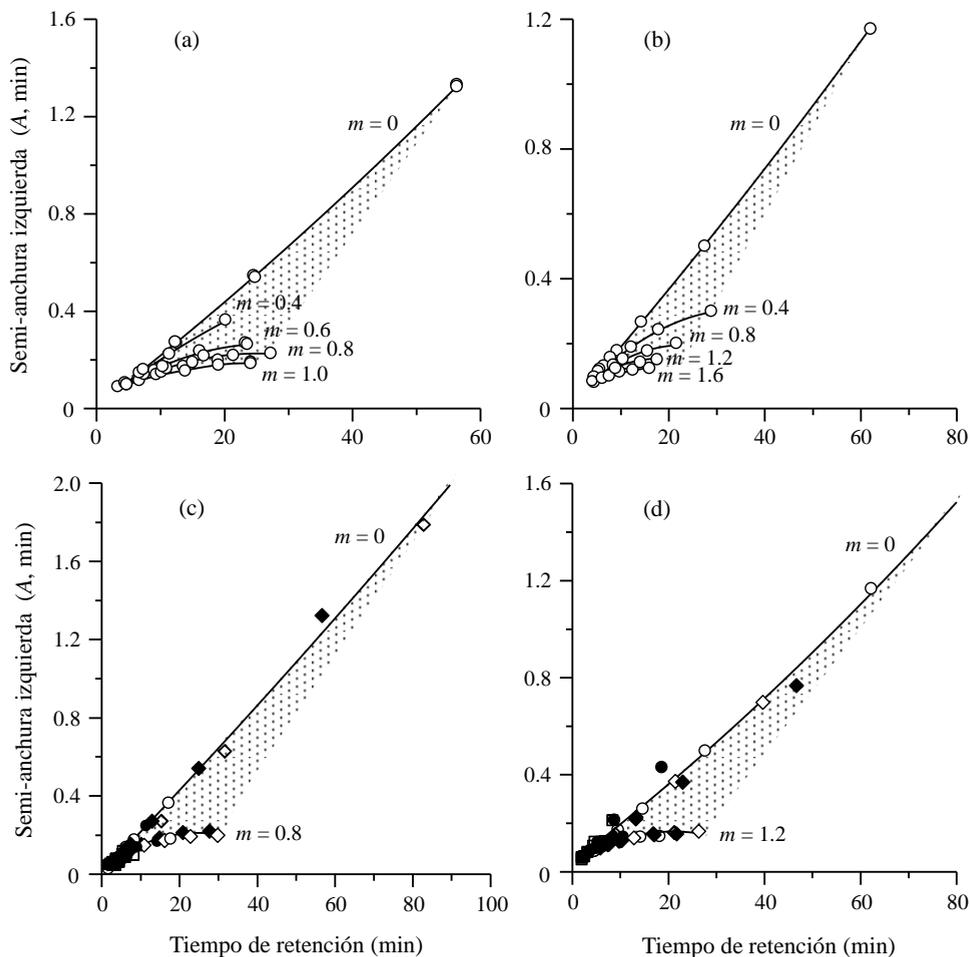


Figura 2.3. Semi-anchura izquierda (medida al 10% de la altura de los picos) a diferentes concentraciones iniciales de acetonitrilo (los puntos a lo largo de las líneas) y pendientes del gradiente (las diferentes líneas) para: (a) Xipamida, (b) 3-hidroxi flavona, (c) el conjunto completo de diuréticos, y (d) el conjunto completo de flavonoides. Véase la Figura 2.1 para la identificación de los símbolos en (c) and (d). Se indica sobre cada línea la pendiente del gradiente (% acetonitrilo/min). Para la elución isocrática, $m = 0$.

Las semi-anchuras de pico para el conjunto completo de diuréticos y de flavonoides se representan en las Figuras 2.3c y d, respectivamente. Como se observa, los puntos experimentales se pudieron ajustar a la misma línea, como en el caso de eluir un solo compuesto con diferentes concentraciones de acetonitrilo (Figuras 2.3a y b), aunque se observa algo de dispersión, especialmente para los flavonoides, lo que puede interpretarse como debido a la diferente cinética de reparto de los solutos. Para los solutos que presentan una cinética particular, las semi-anchuras de los picos deben ser descritas mediante modelos específicos para cada soluto [42]. Con compuestos que exhiben una cinética similar, es más práctico realizar el ajuste de todos los datos a la misma tendencia.

2.5.5. Modelos del perfil de los picos en elución isocrática y en gradiente

Para evaluar la resolución de muestras complejas y lograr condiciones experimentales óptimas fiables en elución en gradiente, no sólo debe predecirse la retención con exactitud, sino también es conveniente realizar la predicción adecuada de la anchura (o semi-anchuras) de los picos cromatográficos, a pesar de que éstas disminuyen debido al efecto de compresibilidad de los picos. En trabajos anteriores, el grupo de investigación con el que se ha desarrollado este trabajo propuso una dependencia empírica para predecir con buena exactitud las semi-anchuras de los picos en función del tiempo de retención, en condiciones isocráticas [43,44]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_{11} t_R^2 \quad (2.24)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_{11} t_R^2 \quad (2.25)$$

donde t_R es el tiempo de retención, y a_0 , a_1 , a_{11} , b_0 , b_1 y b_{11} son los parámetros de los modelos. Puede escribirse una ecuación similar para la anchura de pico:

$$W = w_0 + w_1 t_R + w_{11} t_R^2 \quad (2.26)$$

Las parábolas descritas por las Ecuaciones (2.24–2.26) pueden a menudo aproximarse a líneas rectas (véanse las líneas superiores en la Figura 2.3). Por el contrario, en elución en gradiente, las semi-anchuras (o anchuras) se describen siempre mediante parábolas, que tienden a valores constantes para pendientes de gradiente elevadas y tiempos de retención suficientemente altos (véanse todas las demás líneas de la Figura 2.3). Debe indicarse que cada una de las líneas de los diagramas mostrados se obtuvo manteniendo constante la pendiente del gradiente y variando la concentración inicial de acetonitrilo. Se observó también un comportamiento parabólico al mantener constante la concentración inicial de acetonitrilo y variar la pendiente del gradiente (Figuras 2.4a y b). A partir de esta observación, se ha obtenido el siguiente modelo para describir el perfil de los picos en elución en gradiente (un modelo similar puede escribirse para la semi-anchura derecha y para la anchura):

$$\frac{A_0 - A}{A} = b \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right) + c \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right)^2 \quad (2.27)$$

Aquí, A_0 y t_R , y A y t_g son la semi-anchura izquierda y el tiempo de retención en condiciones isocráticas y de gradiente, respectivamente. En la ecuación, se supone que el porcentaje del modificador orgánico en condiciones isocráticas es el mismo que al principio del gradiente.

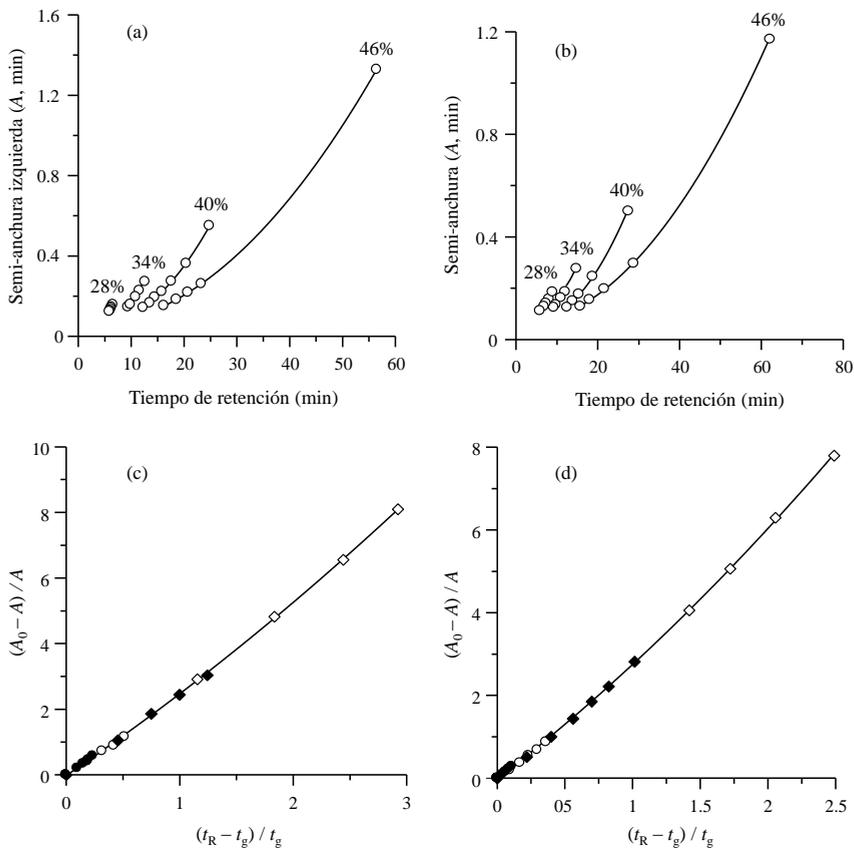


Figura 2.4. Representación de la semianchura izquierda (al 10% de la altura de los picos) para diferentes pendientes de gradiente (los puntos a lo largo de las líneas) y concentraciones iniciales de acetonitrilo (las distintas líneas) para: (a) Xipamida, y (b) 3-hidroxi flavona. En (c) y (d), se ha representado todo el conjunto de datos (isocráticos y en gradiente) para los diuréticos y los flavonoides, respectivamente. Véase la Figura 2.1 para identificar los símbolos en (c) y (d). En (a) y (b), se indica sobre cada línea la concentración inicial de acetonitrilo (% v/v). Las curvas en (c) y (d) se ajustaron de acuerdo a la Ecuación (2.27). En (c) y (d), A_0 y t_R , y A y t_g son la semi-anchura izquierda y el tiempo de retención en condiciones isocráticas y en gradiente, respectivamente.

Los datos reprocesados de las Figuras 2.4a y b se han dibujado en la Figuras 2.4c y d, para mostrar cómo $(A_0 - A)/A$ se modifica con la relación $(t_R - t_g)/t_g$. Obsérvese que se obtiene una única curva (casi lineal para los diuréticos) para el conjunto total de compuestos de prueba, eluidos utilizando diferentes concentraciones iniciales de modificador orgánico y pendientes de gradiente, e incluyendo los datos isocráticos. Este comportamiento concuerda con el comentario de Jandera en la Ref. [45], que indica que "la anchura de las bandas de un soluto eluido bajo condiciones de gradiente puede considerarse aproximadamente igual a la obtenida en elución isocrática haciendo uso de una fase móvil de la misma composición que la composición instantánea en el gradiente, al tiempo al que eluye el máximo de la banda del soluto".

La Ecuación (2.27) se puede reordenar de la siguiente forma:

$$A = \frac{A_0}{1 + a \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right) + b \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right)^2} \quad (2.28)$$

Esta ecuación posee el inconveniente de requerir los valores isocráticos A_0 y t_R . Sin embargo, es posible que todos los datos disponibles correspondan sólo a elución en gradiente. En dicho caso, puede utilizarse la siguiente ecuación:

$$A = \frac{a_0 + a_1 t_R + a_{11} t_R^2}{1 + a \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right) + b \left(\frac{t_R - t_g}{t_g} \right)^2} \quad (2.29)$$

que combina las Ecuaciones (2.24) y (2.28), siendo a_0 , a_1 , a_{11} , a y b los parámetros del modelo.

Tabla 2.5. Errores de ajuste relativos (%) en la predicción de las semi-anchuras y anchura, utilizando la Ecuación (2.29).^a

Compuesto	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>W</i>
Diuréticos ^b			
TCLM	1.08	1.23	1.11
ALT	0.89	1.97	1.39
FURO	1.11	1.43	1.27
XIPA	1.59	4.04	1.89
ETHA	1.50	2.51	2.11
Flavonoides ^c			
QUE	2.44	3.13	2.62
BAI	2.30	1.84	1.84
FLA	1.96	4.55	2.81
3OH	0.87	2.37	1.56
5OH	2.61	2.28	1.70

^a Cuando no estaban disponibles, los tiempos de retención isocráticos se predijeron a partir de la Ecuación (2.12).

^b Se ajustaron 32 puntos.

^c Se ajustaron 29 puntos.

En la Ecuación (2.29), los valores de t_R y t_g , a diferentes concentraciones iniciales de acetonitrilo y pendientes del gradiente, se pueden obtener a partir de las ecuaciones que describen los gradientes (Ecuaciones (2.11), (2.15) y (2.18) o (2.20)). Alternativamente, si se dispone de varios datos isocráticos, t_R puede obtenerse a partir de los modelos de retención ajustados para la elución en isocrático. Los errores de ajuste para la Ecuación (2.29), utilizando todos los datos disponibles para los diuréticos y los flavonoides, se proporcionan en la Tabla 2.5. Los errores medios de ajuste para las semi-anchuras izquierda y derecha, y para la anchura, fueron 1.2, 2.2, y 1.5% para los diuréticos, y 2.0, 2.8, y 2.1%, para los flavonoides, respectivamente.

2.6. Conclusiones

Aunque debido a su simplicidad, el modelo logarítmico lineal (Ecuación (2.2)) es ampliamente utilizado para predecir la retención en cromatografía líquida utilizando gradientes lineales, al menos otros tres modelos ofrecen una exactitud más elevada, especialmente cuando se consideran amplios intervalos de contenido del modificador orgánico (Ecuaciones (2.5) y (2.6), y (2.12)). Entre éstos, el modelo más familiar es el logarítmico cuadrático (Ecuación (2.5)), que es ampliamente utilizado en elución isocrática. Sin embargo, su integración analítica para describir gradientes no es sencilla. En este capítulo, se ha propuesto un algoritmo de integración semi-empírico (Ecuación (2.18)), basado en las similitudes de las tendencias lineales y cuadráticas, que proporciona errores de predicción similares a los obtenidos en la elución isocrática. El algoritmo también puede aplicarse a otros modelos, como el denominado modelo de polaridad (Ecuaciones (2.6) y (2.20)). Otro modelo que

permite la integración analítica, propuesto inicialmente por Jandera para cromatografía líquida de fase normal (Ecuación (2.12)), ofrece excelentes predicciones en RPLC con elución en gradiente, utilizando el algoritmo propuesto (Ecuación (2.15)).

Este trabajo también demuestra que una única ecuación (Ecuación (2.29)) permite la predicción de los perfiles de los picos cromatográficos en los dos modos de elución (isocrático y gradiente), con errores bajos. El mismo modelo ajustado se puede utilizar para predecir el perfil de los picos de un conjunto de compuestos que muestren una cinética de reparto similar con una cierta columna.

Asimismo, se muestra que el intervalo de tiempos de retención y anchuras de los picos esperados en elución isocrática y en gradiente puede ilustrarse convenientemente, haciendo uso de representaciones del logaritmo del factor de retención frente a la concentración de modificador orgánico al inicio del gradiente (similar a los conocidos diagramas del logaritmo del factor de retención frente a una concentración fija del modificador orgánico en elución isocrática), y representaciones de las semi-anchuras y anchuras frente al tiempo de gradiente (el tiempo de retención en elución isocrática), respectivamente. Los diagramas muestran todos los comportamientos posibles que pueden encontrarse para un soluto o grupos de solutos separados con una determinada columna, y dibujan triángulos irregulares.

Se puede obtener para cada soluto un "triángulo de elución", cuya región más amplia corresponde a las concentraciones más bajas del modificador orgánico (los tiempos más largos). Cuanto más retenido esté el compuesto, más ancho es el triángulo. Por el contrario, cuando los solutos en una mezcla presentan una cinética de reparto similar, un único triángulo ("triángulo de

anchuras de pico") describe el comportamiento de los picos para todos los compuestos, correspondiendo la región más amplia a situaciones de mayor retención (a los compuestos más retenidos o a los contenidos más bajos de modificador).

2.7. Referencias

- [1] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems*, J. Chromatogr. 165 (1979) 3–30.
- [2] J.W. Dolan, L.R. Snyder, *Gradient elution chromatography*, Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications (editada por R.A. Meyers), Wiley, Nueva York, 2000.
- [3] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*. Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [4] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, *Optimisation technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 283–289.
- [5] V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1063 (2005) 79–88.
- [6] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *New approach to linear gradient elution used for optimisation in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 279–287.
- [7] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papageorgiou, *Simple algorithms for fitting and optimisation for multilinear gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 178–186.
- [8] A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, *Modeling the retention of neutral compounds in gradient elution RP-HPLC by means of polarity parameter models*, Anal. Chem. 81 (2009) 9135–9145.

- [9] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. 1216 (2009) 1737–1755.
- [10] J. Stahlberg, *The thermodynamic limit of linear gradient chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3172–3179.
- [11] U.D. Neue, H.J. Kuss, *Improved reversed-phase gradient retention modeling*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3794–3803.
- [12] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, A. Mansour, *Multilinear gradient elution optimization in reversed-phase liquid chromatography based on logarithmic retention models: application to separation of a set of purines, pyrimidines and nucleosides*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5658–5663.
- [13] A. Andrés, A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, *Chromatographic models to predict the elution of ionizable analytes by organic modifier gradient in reversed phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1247 (2012) 71–80.
- [14] H. Gika, G. Theodoridis, F. Mattivi, U. Vrhovsek, A. Pappa-Louisi, *Hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography retention prediction under gradient elution*, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 701–709.
- [15] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *New approaches to linear gradient elution used for optimization in reversed-phase liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 32 (2009) 1527–1576.
- [16] L.R. Snyder, M.A. Quarry, *Computer simulation in HPLC method development. reducing the error of predicted retention times*, J. Liq. Chromatogr. 10 (1987) 1789–1820.
- [17] D.D. Lisi, J.D. Stuart, L.R. Snyder, *Computer simulation of gradient elution separation: Accuracy of predictions for non-linear gradients*, J. Chromatogr. 555 (1991) 1–19.

-
- [18] J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Walcott, P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L.C. Sander, *Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time. III. Improving the accuracy of computer simulation*, J. Chromatogr. A. 857 (1999) 41–68.
- [19] J.W. Dolan, L.R. Snyder, T.H. Jupille, N.S.J. Wilson, *Variability of column selectivity for reversed-phase high-performance liquid chromatography: Compensation by adjustment of separation conditions*, J. Chromatogr. A 960 (2002) 51–67.
- [20] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Error analysis and performance of different retention models in the transference of data from/to isocratic/gradient elution*, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 169–181.
- [21] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Estimation of significant solvent concentration ranges and its application to the enhancement of the accuracy of gradient predictions*, J. Chromatogr. A 1057 (2004) 31–39.
- [22] L.R. Snyder, *Linear elution adsorption chromatography. VII. Gradient elution theory*, J. Chromatogr. 13 (1964) 415–434.
- [23] M. Wang, J. Mallette, J.F. Parcher, *Interconversion of gradient and isocratic retention data in reversed-phase liquid chromatography: Effect of the uptake of eluent modifier on the retention of analytes*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8630–8635.
- [24] E.C. Freiling, *Ion exchange as a separations method. IX. Gradient elution theory*, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 2067–2071.
- [25] E.C. Freiling, *Gradient elution theory*, J. Phys. Chem. 61 (1957) 543–548.
- [26] B. Drake, *Contributions to the theory of gradient elution analysis*, Arkiv Kemi 8 (1955) 1–21.
- [27] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *The linear-solvent-strength model of gradient elution*, Adv. Chromatogr. 38 (1998) 115–185.
-

- [28] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, *Multilinear gradient elution optimisation in reversed-phase liquid chromatography using genetic algorithms*, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 299–397.
- [29] M.A. Quarry, R.L. Grob, L.R. Snyder, *Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors*, Anal. Chem. 58 (1986) 907–917.
- [30] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. de Galan, *Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 149 (1978) 519–537.
- [31] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute-mobile phase-stationary phase polarity parameters*, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19–34.
- [32] R. Cela, M. Lores, *PREOPT-W: A simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC. I. Fundamentals and overview*, Comput. Chem. 20 (1996) 175–191.
- [33] R. Cela, M. Lores, *PREOPT-W: A simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC. II. Data management and miscellaneous aspects of use*, Computers Chem. 20 (1996) 193–202.
- [34] R. Cela, E. Leira, O. Cabaleiro, M. Lores, *PREOPT-W: Off-line optimization of binary gradient separations in HPLC by simulation. IV. Phase 3*, Computers Chem. 20 (1996) 315–330.
- [35] S.A. Tomellini, R.A. Hartwick, H.B. Woodruff, *Computer-based numerical integration for the calculation of retention times in gradient high-performance liquid chromatography*, Anal. Chem. 57 (1985) 811–816.
- [36] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *Expressions of the fundamental equation of gradient elution and a numerical solution of these equations under any gradient profile*, Anal. Chem. 77 (2005) 5670–5677.

-
- [37] P. Jandera, M. Janderová, J. Churáček, *Gradient elution in liquid chromatography: VIII. Selection of the optimal composition of the mobile phase in liquid chromatography under isocratic conditions*, J. Chromatogr. 148 (1978) 79–97.
- [38] P. Jandera, *Optimisation of gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 797 (1998) 11–22.
- [39] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder, *Peak compression in reversed-phase gradient elution*, J. Chromatogr. A 1111 (2006) 32–39.
- [40] F. Gritti, G. Guiochon, *The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography*, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 79–91.
- [41] P. Jandera, Z. Kučerová, J. Urban, *Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8874–8889.
- [42] J.J. Baeza-Baeza, Y. Dávila, J.J. Fernández-Navarro, M.C. García-Álvarez-Coque, *Measurement of the elution strength and peak shape enhancement at increasing modifier concentration and temperature in RPLC*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012), 2973–2984
- [43] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17–24.
- [44] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape in hydro-organic and micellar-organic liquid chromatography as a function of mobile phase composition*, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 119–127.
- [45] P. Jandera, *Predictive calculation methods for optimization of gradient elution using binary and ternary solvent gradients*, J. Chromatogr. 485 (1989) 113–141.

CAPÍTULO 3

**DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS PARA
DESCRIBIR PICOS CROMATOGRÁFICOS
BASADOS EN MODELOS GAUSSIANOS MODIFICADOS**

3.1. Summary

The description of skewed chromatographic peaks has been discussed extensively in the literature and many functions have been proposed. Among these, the Polynomially Modified Gaussian (PMG) models interpret the deviations from ideality as a change in the standard deviation with time. This approach has shown a high accuracy in the fitting to tailing and fronting peaks. However, it has the drawback of the uncontrolled growth of the predicted signal outside the elution region, which departs from the experimental baseline. To solve this problem, the Parabolic-Lorentzian Modified Gaussian (PLMG) model was developed. This combines a parabola that describes the variance change in the peak region, and a Lorentzian function that decreases the variance growth out of the peak region. The PLMG model has, however, the drawback of its high flexibility that makes the optimization process difficult when the initial values of the model parameters are far from the optimal ones. Based on the fitting of experimental peaks of diverse origin and asymmetry degree, several semiempirical approaches that make use of the halfwidths at 60.65% and 10% peak height are here reported, which allow the use of the PLMG model for prediction purposes with small errors (below 2–3%). The incorporation of several restrictions in the algorithm avoids the indeterminations that arise frequently with this model, when applied to highly skewed peaks.

3.2. Introducción

En 2002, Cavazzini *et al.* indicaron que "no es posible la obtención de una función analítica que describa el perfil de los picos a la salida de la columna cromatográfica, debido a los complejos y numerosos procesos físico-químicos que intervienen" [1]. En 2012, de acuerdo a Gao *et al.*, "la comprensión detallada de las diferentes etapas del proceso de transferencia de masa en las columnas cromatográficas es un problema difícil e importante, ... nuestro conocimiento de estos procesos es todavía limitado" [2]. A pesar de estas dificultades, existe un impresionante trabajo teórico y experimental destinado a esclarecer el perfil de los picos cromatográficos, en base a distintas teorías [1,3–11]. A partir de estos estudios y otros trabajos publicados por diferentes autores (de tipo teórico, semi-empíricos y empíricos), se han propuesto en la bibliografía numerosas funciones matemáticas para ajustar picos cromatográficos, que lo consiguen con distinto éxito [12–26]. Resulta particularmente interesante la gran recopilación de modelos de pico publicados por Di Marco y Bombi [18]. La aplicación más frecuente de las funciones de los picos en HPLC son la deconvolución de picos parcialmente resueltos [15,19–21], la evaluación del solapamiento entre picos [13,14,19], y la predicción del perfil de los picos a distintos tiempos de retención [12,22,23,26]. El estudio mostrado en este capítulo se ocupa de los modelos gaussianos modificados empíricamente, que muestran un comportamiento particularmente satisfactorio en la descripción de los perfiles de picos cromatográficos con diversa asimetría.

Se considera, generalmente, que una gaussiana es adecuada para describir los picos cromatográficos simétricos:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{\sigma_0^2}\right) \quad (3.1)$$

donde H_0 es la altura del pico en el máximo, σ_0 la desviación estándar (la semi-anchura medida al 60.65% de la altura del pico), y $t_c = t - t_m$, siendo t_m el tiempo medido en el máximo del pico (para picos simétricos, el tiempo de retención). Este sencillo modelo se utiliza como referencia, teniendo en cuenta las mejoras que se han producido en la fabricación de las columnas en cromatografía líquida, especialmente en la reducción de las colas de los picos. Sin embargo, aún se obtienen picos deformados a tiempos de retención cortos, debido principalmente a las contribuciones extra-columnares, y para los compuestos que experimentan interacciones complejas con la fase estacionaria. Para estos casos, se necesitan modelos capaces de hacer frente a la deformación de los picos. Se han propuesto varias funciones gaussianas modificadas para modelizar picos cromatográficos con diferente grado de asimetría [15,17,19,21,22]. Entre ellas, las que modifican la desviación estándar del pico [15], o la varianza [21,22] de una función gaussiana han demostrado un buen ajuste de los picos y una alta flexibilidad.

Los modelos gaussianos modificados polinomialmente (PMG) son, en realidad, una familia de funciones, que están basadas en la modificación polinomial de la desviación estándar de un pico gaussiano puro [15]. Para describir picos con una asimetría moderada, un polinomio de primer grado (modelo LMG, *linearly modified Gaussian*) es adecuado:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{(\sigma_0 + mt_c)^2}\right) \quad (3.2)$$

donde σ_0 es la desviación estándar para un pico gaussiano que se comporta como el pico asimétrico en las proximidades de su máximo, y m es un parámetro del modelo que tiene en cuenta la deformación del pico. Cuando existe una elevada asimetría, los polinomios de grado superior son preferibles para describir los perfiles de los picos.

En un estudio comparativo, Nikitas *et al.* [19] señalaron que el modelo PMG es el único capaz de describir casi cualquier pico. Sin embargo, posee el inconveniente de la indefinición de las funciones cuando los polinomios se anulan. Otro problema es el crecimiento incontrolado de la señal predicha fuera de la región del pico. Este problema puede solventarse fácilmente (cuando es posible) anulando la función ($h(t_c) = 0$) fuera de la región del pico [15]. Otra solución práctica es el uso de una función mixta exponencial-PMG, que se obtiene añadiendo dos decaimientos exponenciales en ambos lados del pico PMG al 10% de la altura del pico, con la restricción de que las pendientes de las funciones gaussiana y exponencial en los respectivos puntos de conexión coincidan [27].

Alternativamente, se han sugerido otras ecuaciones para describir los picos, que corrigen los inconvenientes del modelo PMG [19,21,22,26]. Uno de estos modelos es la gaussiana modificada parabólica-lorentziana (PLMG) [21]:

$$h(t_c) = H_0 \exp \frac{-\frac{1}{2}t_c^2}{\sigma_m^2 + m \left(\frac{(t_c + d)^2}{1 + \frac{(t_c + r)^2}{w^2}} \right)} \quad (3.3)$$

Los parámetros σ_m^2 , m y d en la Ecuación (3.3) corresponden a la función parabólica, y r y w a la lorentziana. El componente parabólico describe el perfil de los picos no gaussianos, y el lorentziano cancela el incremento de la varianza fuera de la región de elución. Se ha demostrado que este modelo ajusta con exactitud una gran variedad de picos, superando a otros modelos [21,28]. Sin embargo, el ajuste de los datos experimentales al modelo PLMG puede ser muy complejo, o éste puede no converger si los valores iniciales utilizados para ajustar el modelo se encuentran lejos de los valores óptimos [29]. Por lo tanto, los resultados que proporciona deben ser controlados estrechamente para garantizar que los mejores parámetros obtenidos por el programa de cálculo posean un sentido físico [30].

El modelo gaussiano modificado con varianza parabólica (PVMG, *parabolic-variance modified Gaussian*) es un modelo simplificado, en el que se ha eliminado la lorentziana [22]. Este modelo es útil para la mayoría de picos que poseen una asimetría moderada:

$$h(t_c) = H_0 \exp \left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{\sigma_0^2 + b t_c + c t_c^2} \right) \quad (3.4)$$

donde b y c son parámetros del modelo. Este modelo proporciona una elevada exactitud en el ajuste de picos por encima del 60% de la altura de los picos.

Se puede concluir que, en la actualidad se dispone de modelos exactos capaces de describir casi cualquier pico. Sin embargo, todavía sigue siendo conveniente desarrollar modelos prácticos para predecir picos con un amplio abanico de asimetrías, con fines de optimización cromatográfica, en los que los parámetros del modelo sean una función de propiedades fácilmente medibles, como es el caso de las semi-anchuras de los picos. En este capítulo, se

presentan desarrollos en esta dirección, basados en los modelos LMG, PVMG y PLMG. Además, se ofrecen algunas recomendaciones para obtener ajustes fiables de los perfiles de los picos cromatográficos experimentales al modelo PLMG, independientemente de la deformación de los picos.

3.3. Parte experimental

3.3.1. Reactivos

Las fases móviles se prepararon con acetonitrilo (Scharlab, Barcelona) o con dodecilsulfato sódico (SDS, 99% de pureza, Merck, Darmstadt, Alemania) y 1-butanol (Scharlab). El pH se tamponó con ácido cítrico 0.01 M (Panreac, Barcelona) y NaOH (Scharlab). El electrodo se calibró con tampones acuosos, y el pH de las fases móviles se midió tras la adición del disolvente orgánico.

Los compuestos de prueba fueron: ácido benzoico, butilbenceno (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), el antibiótico tetraciclina (Sigma), los diuréticos benzotiazida, bumetanida, furosemida, ácido etacrínico (Sigma), bendroflumetiazida (Davur, Madrid), y xipamida (Lacer, Barcelona), los β -bloqueantes alprenolol, acebutolol (Sigma), y celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón), y el flavonoide crisina (Sigma). Los fármacos se disolvieron en unos pocos mililitros de acetonitrilo o de una disolución de SDS, con ayuda de un baño de ultrasonidos. Las diluciones se efectuaron con agua. Las concentraciones de las disoluciones inyectadas, que se almacenaron en la oscuridad a 4°C, fue de 10 mg/mL. Otros detalles se pueden consultar en el Capítulo 2.

3.3.2. Instrumentación

El sistema de HPLC (Agilent, Serie 1100, Waldbronn, Alemania) consistió en una bomba isocrática, un muestreador automático, un detector UV-visible, y un controlador de temperatura. Las señales se monitorizaron a 254 nm. La adquisición de datos se llevó a cabo con una estación de datos HPChemStation (Agilent).

Se utilizaron varias columnas cromatográficas con un tamaño de partícula de 5 μm : Zorbax SB C₁₈, Zorbax Eclipse C₁₈ (Agilent, 150 mm \times 4.6 mm), XTerra MS C₁₈ (Waters, MA, EE.UU., 150 mm \times 4.6 mm), Spherisorb S5 ODS-2 (Scharlab, 125 mm \times 4.6 mm) y Nucleosil 120 C₁₈ (Scharlab, 150 mm \times 4.6 mm), que se protegieron con una pre-columna C₁₈ (Scharlab, 30 mm \times 4.0 mm). Además, se utilizó una columna Chromolith Performance RP-18e (Merck, Darmstadt, Alemania, 100 mm \times 4.6 mm), precedida por una pre-columna Chromolith RP-18e (5.0 mm \times 4.6 mm). Los compuestos de prueba se inyectaron tras las pre-columnas. Los picos se obtuvieron tanto en elución isocrática como en gradiente, utilizando varios caudales para la primera.

3.4. Base teórica

3.4.1. Modelos para predecir perfiles de pico

La forma más conveniente para evaluar la capacidad de diferentes modelos, con el fin de predecir picos cromatográficos, es su aplicación a picos experimentales, obtenidos en condiciones distintas. Se espera que los picos predichos se ajusten lo mejor posible a los experimentales. Por otro lado, con el fin de facilitar las predicciones, los modelos deben incluir parámetros fácilmente medibles, como las semi-anchuras de los picos medidas a una cierta

altura. En los métodos que hemos desarrollado, se utilizan los valores de las semi-anchuras medidas al 60.65% y 10% de la altura de los picos.

A continuación, se describen diversos métodos para la predicción de los perfiles de picos, algunos de ellos desarrollados para este estudio.

a) Método I: Modelo gaussiano puro

A partir de la Ecuación (3.1):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{\sigma_0^2} \quad (3.5)$$

y sustituyendo t_c por los valores de semi-anchura izquierda y derecha ($t_c = -A$, y $t_c = B$), se obtiene:

$$p \sigma_0^2 = A^2 \quad (3.6)$$

$$p \sigma_0^2 = B^2 \quad (3.7)$$

Se consigue una buena estimación de la desviación estándar a partir de la raíz cuadrada del producto de las Ecuaciones (3.6) y (3.7):

$$\sigma_0^2 = \frac{AB}{p} \quad (3.8)$$

Como se observa en la Ecuación (3.5), p depende de la altura a la que se han medido las semi-anchuras. Así, $p = 1$ para el 60.65% de la altura de los picos ($h = 0.6065H_0$), y $p = 4.605$ para el 10% ($h = 0.1H_0$). Como por lo general existe un mayor interés en predecir la parte inferior del pico, que se ve afectada en mayor medida por los solapamientos, es conveniente utilizar las

semi-anchuras al 10% de la altura de los picos para estimar la varianza en el punto máximo del pico, σ_0^2 . De la Ecuación (3.8):

$$\sigma_0^2 = \frac{A_{10} B_{10}}{4.605} \quad (3.9)$$

b) Método II: Modelo LMG

A partir de la Ecuación (3.2):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{(\sigma_0 + m t_c)^2} \quad (3.10)$$

de la cual, tras sustituir $t_c = -A$, y $t_c = B$:

$$\sqrt{p} = \frac{A}{\sigma_0 - m A} \quad (3.11)$$

$$\sqrt{p} = \frac{B}{\sigma_0 + m B} \quad (3.12)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones ((3.11) y (3.12)):

$$\sigma_0 = \frac{2}{\sqrt{p}} \frac{A B}{A + B} \quad (3.13)$$

$$m = \frac{1}{\sqrt{p}} \frac{B - A}{A + B} \quad (3.14)$$

Puesto que al 10% de la altura de pico, $\sqrt{p} = \sqrt{4.605} = 2.146$:

$$\sigma_0 = \frac{2}{2.146} \frac{A_{10} B_{10}}{A_{10} + B_{10}} \quad (3.15)$$

$$m = \frac{1}{2.146} \frac{B_{10} - A_{10}}{A_{10} + B_{10}} \quad (3.16)$$

c) Método III: Modelo PVMG

A partir de la Ecuación (3.4):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{\sigma_0^2 + b t_c + c t_c^2} \quad (3.17)$$

Como se observa, el término de la varianza en el modelo PVMG posee tres parámetros (σ_0^2 , b y c), lo que hace el cálculo algo más complicado que para los modelos anteriores. De nuevo es conveniente expresar los parámetros del modelo en función de las semi-anchuras de pico. Mediante la sustitución de los valores de semi-anchura a una cierta altura de los picos en la Ecuación (3.17), se obtiene:

$$p \sigma_0^2 + p b A + p c A^2 = A^2 \quad (3.18)$$

$$p \sigma_0^2 - p b B + p c B^2 = B^2 \quad (3.19)$$

y resolviendo el sistema de ecuaciones:

$$b = \frac{\sigma_0^2}{AB} (B - A) \quad (3.20)$$

$$c = \frac{1}{p} - \frac{\sigma_0^2}{AB} \quad (3.21)$$

Con el fin de evitar cualquier indeterminación, la función parabólica en la Ecuación (3.17) debe ser siempre positiva. Para ello, es necesario que el

parámetro c y el mínimo de la parábola sean > 0 (se debe señalar que el mínimo de la parábola para el modelo LMG, Ecuación (3.2), posee un valor nulo). Estas condiciones se cumplen cuando:

$$b^2 < 4\sigma_0^2 c \quad (3.22)$$

Todavía es necesario calcular σ_0^2 , que representa la varianza medida en el máximo del pico. Desarrollando el término de la varianza para el modelo LMG, e igualándolo a la varianza en el modelo PLMG:

$$(\sigma_0 + mt_c)^2 = \sigma_0^2 + 2\sigma_0 mt_c + m^2 t_c^2 = \sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2 \quad (3.23)$$

se puede observar que el modelo LMG coincide con el modelo PVMG cuando:

$$b^2 = 4\sigma_0^2 m^2 = 4\sigma_0^2 c \quad (3.24)$$

Sobre la base de estas consideraciones, se puede utilizar una expresión derivada de la Ecuación (3.13) para calcular σ_0^2 en el modelo PVMG:

$$\sigma_0^2 = \frac{d}{p} \frac{A^2 B^2}{(A+B)^2} \quad (3.25)$$

Para el modelo de LMG, $d = 4$ (véase la Ecuación (3.13)), mientras que para el modelo PVMG, y de acuerdo a las Ecuaciones (3.20)–(3.24), la Ecuación (3.25) sólo es válida cuando $d < 4$. Se realizó el ajuste de un gran número de picos experimentales a la Ecuación (3.4), para diferentes compuestos eluidos de diferentes columnas, obteniendo el valor $d = 3.82 \pm 0.06$ cuando las semi-anchuras se midieron al 60.65% de la altura de los picos, y $d = 3.6 \pm 0.4$ cuando se midieron al 10%. Estos valores medios indican que la parte superior de los picos experimentales se ajustaron mejor al modelo LMG ($d = 3.82 \approx 4$) que la parte inferior ($d = 3.6$). Además, la desviación

estándar de los valores d medios sugieren una mayor similitud entre los picos en la parte superior. Dado que, por lo general, es necesaria una descripción exacta de la parte inferior del pico, se decidió utilizar los valores de las semi-anchuras medidas al 10% de la altura de los picos, y la relación $d/p = 3.6/4.605 = 0.79 \approx 0.8$ (véase la Ecuación (3.25)) para calcular la varianza en el modelo PVMG):

$$\sigma_0^2 = 0.8 \frac{A_{10}^2 B_{10}^2}{(A_{10} + B_{10})^2} \quad (3.26)$$

Los otros dos parámetros en el modelo PVMG se calcularon de la siguiente forma (véanse las Ecuaciones (3.20) y (3.21).):

$$b = \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (3.27)$$

$$c = 0.2171 - \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} \quad (3.28)$$

donde $1/p = 1/4.605 = 0.2171$.

d) Método IV: Modelo PLMG

Para simplificar el tratamiento y relacionar el modelo PLMG (Ecuación (3.3)) con los enfoques anteriores, es más conveniente reescribirlo como:

$$h(t_c) = H_0 \exp \left(- \frac{1}{2} \frac{1 + w t_c + z t_c^2}{\sigma_0^2 + b t_c + c t_c^2} t_c^2 \right) \quad (3.29)$$

A partir de la Ecuación (3.29):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2 + wt_c^3 + zt_c^4}{\sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2} \quad (3.30)$$

y finalmente:

$$p\sigma_0^2 - t_c^2 = -bpt_c - cpt_c^2 + wt_c^3 + zt_c^4 \quad (3.31)$$

La varianza en el modelo PLMG (Ecuación (3.29)) contiene cinco parámetros: tres para la parábola (σ_0^2 , b y c), y dos para la lorentziana (w y z). Por lo tanto, se necesitan dos pares de valores de las semi-anchuras para estimar los parámetros del modelo. Nuestra propuesta es que se utilicen las semi-anchuras al 60.65% (A_{60} y B_{60}) y 10% (A_{10} y B_{10}) de la altura de los picos. Los parámetros del modelo b , c , w y z se pueden obtener mediante la resolución de un sistema de cuatro ecuaciones con b , c , w y z como variables. En forma matricial:

$$\begin{pmatrix} b \\ c \\ w \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{60} & -A_{60}^2 & -A_{60}^3 & A_{60}^4 \\ -B_{60} & -B_{60}^2 & B_{60}^3 & B_{60}^4 \\ pA_{10} & -pA_{10}^2 & -A_{10}^3 & A_{10}^4 \\ -pB_{10} & -pB_{10}^2 & B_{10}^3 & B_{10}^4 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sigma_0^2 - A_{60}^2 \\ \sigma_0^2 - B_{60}^2 \\ p\sigma_0^2 - A_{10}^2 \\ p\sigma_0^2 - B_{10}^2 \end{pmatrix} \quad (3.32)$$

donde $p = 4.605$. La Ecuación (3.25) se utilizó de nuevo para calcular σ_0^2 , utilizando los valores de semi-anchura al 60.65% ($p = 1$) y el correspondiente valor experimental $d = 3.8$.

e) Métodos V: Métodos simplificados para el modelo PLMG

Como se ha comentado, el modelo PVMG, que es más sencillo que el modelo PLMG, ajusta con exactitud la parte superior de los picos cromatográficos (por encima de aproximadamente el 60% de la altura). Con los picos de los compuestos de prueba utilizados en este trabajo, los errores relativos medios siempre se situaron por debajo del 0.2%. A la vista de este resultado, se desarrollaron dos métodos simplificados, basados en el modelo PLMG.

En el primer método (Método Va), los parámetros de la parábola en la Ecuación (3.29) se evaluaron utilizando los valores de las semi-anchuras medidos al 60.65% de la altura de los picos, donde $p = 1$ (compárense con las Ecuaciones (3.25), (3.20) y (3.21)):

$$\sigma_0^2 = 3.8 \frac{A_{60}^2 B_{60}^2}{(A_{60} + B_{60})^2} \quad (3.33)$$

$$b = \frac{2}{3} \frac{\sigma_0^2}{A_{60} B_{60}} (B_{60} - A_{60}) \quad (3.34)$$

$$c = 1 - \frac{\sigma_0^2}{A_{60} B_{60}} \quad (3.35)$$

El factor 2/3 en la Ecuación (3.34) es empírico y se comprobó que mejoraba el ajuste de los picos experimentales examinados en este estudio (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Condiciones experimentales utilizadas en la elución de los compuestos de prueba, y propiedades de pico.

Pico	Compuesto	Condiciones de elución ^a	t_m (min)	A_{60} (min)	B_{60} (min)	$(B/A)_{60}$	A_{10} (min)	B_{10} (min)	$(B/A)_{10}$
1	Alprenolol	Zorbax SB, 45% AcN, pH 3, 30°C	2.10	0.0305	0.0515	1.69	0.0583	0.146	2.50
2	Bendroflumetazida	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	2.38	0.0303	0.0486	1.61	0.0603	0.144	2.39
3	Tetraciclina	Spherisorb, SDS 0.05 M, 5% de I-butanol, pH 3, 25°C	10.16	0.303	0.440	1.45	0.592	1.398	2.36
4	Alprenolol	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	3.40	0.0430	0.0639	1.40	0.0785	0.163	2.07
5	Bendroflumetazida	Zorbax SB, 30% AcN, pH 3, 30°C	2.74	0.0373	0.0552	1.48	0.0754	0.152	2.02
6	Ácido etacrínico	Spherisorb, 46% AcN (gradiente: 0.4%/min), pH 3, 25°C	7.61	0.0660	0.0881	1.34	0.132	0.263	2.00
7	Acebutolol	Chromolith, 15% AcN, (0.4 ml/min), pH 3, 25°C	13.38	0.119	0.159	1.34	0.235	0.437	1.86
8	Bumetanida	Chromolith, 35% AcN, pH 3, 30°C	10.96	0.102	0.117	1.15	0.213	0.348	1.63
9	Butilbenceno	Nucleosil, 70% AcN, (0.6 ml/min), 25°C	10.74	0.100	0.115	1.14	0.209	0.312	1.49
10	Ácido benzoico	Chromolith, 15% AcN, (2 ml/min), pH 3, 25°C	3.85	0.0392	0.0435	1.11	0.0820	0.120	1.47

^a Si no se indica otro valor, el caudal fue 1.0 mL/min.

Tabla 3.1 (continuación).

Pico	Compuesto	Condiciones de elución ^a	t_m (min)	A_{60} (min)	B_{60} (min)	$(B/A)_{60}$	A_{10} (min)	B_{10} (min)	$(B/A)_{10}$
11	Ácido benzoico	Nucleosil, 20% AcN (2 ml/min), pH 3, 25°C	3.78	0.0455	0.0523	1.15	0.0935	0.138	1.47
12	Celiprolol	Chromolith, 15% AcN, (2 ml/min), pH 3, 25°C	5.91	0.0676	0.0809	1.20	0.139	0.201	1.44
13	Ácido benzoico	Spherisorb, 25% AcN, (2 ml/min), pH 3, 25°C	2.66	0.0311	0.0344	1.11	0.0660	0.0848	1.29
14	Benzotiazida	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	8.18	0.0781	0.0870	1.11	0.166	0.211	1.27
15	Ácido benzoico	XTerra, 15% AcN, (2 ml/min), pH 3, 25°C	7.14	0.0848	0.0953	1.12	0.177	0.219	1.24
16	Benzotiazida	XTerra, 35% AcN, pH 3, 30°C	8.74	0.0985	0.105	1.06	0.204	0.236	1.16
17	Furosemida	Spherisorb, 40% AcN, (gradiente: 1.0%/min), pH 3, 25°C	4.62	0.0442	0.0460	1.04	0.0949	0.104	1.10
18	Xipamida	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 30°C	16.84	0.150	0.153	1.02	0.325	0.341	1.05
19	Crisina	Zorbax Eclipse, 35% AcN, pH 3.5, 25°C	20.71	0.185	0.181	0.98	0.407	0.393	0.97
20	Furosemida	Zorbax SB, 25% AcN, pH 3, 20°C	25.96	0.262	0.245	0.79	0.740	0.531	0.72

^a Si no se indica otro valor, el caudal fue 1.0 mL/min.

En el método propuesto en este capítulo, una vez que los parámetros de la parábola (σ_0 , b y c) son conocidos, se calculan los parámetros de la lorentziana (w , z), a partir de la Ecuación (3.30), para los valores de las semi-anchuras derecha e izquierda a un 10% de la altura de los picos, resolviendo un sistema de dos ecuaciones:

$$\alpha_A = 4.605 (\sigma_0^2 - b A_{10} + c A_{10}^2) - A_{10}^2 = -w A_{10}^3 + z A_{10}^4 \quad (3.36)$$

$$\alpha_B = 4.605 (\sigma_0^2 + b B_{10} + c B_{10}^2) - B_{10}^2 = w B_{10}^3 + z B_{10}^4 \quad (3.37)$$

del que se obtiene:

$$w = \frac{A_{10}^4 \alpha_B - B_{10}^4 \alpha_A}{(A_{10} + B_{10}) A_{10}^3 B_{10}^3} \quad (3.38)$$

$$z = \frac{A_{10}^3 \alpha_B + B_{10}^3 \alpha_A}{(A_{10} + B_{10}) A_{10}^3 B_{10}^3} \quad (3.39)$$

Como se observa, el Método Va hace uso de los valores de semi-anchura tanto al 60.65% (Ecuaciones (3.33), (3.34) y (3.35)), como al 10% (Ecuaciones (3.38) y (3.39)) de la altura de los picos. Un tratamiento aún más simple (Método Vb) consideraría únicamente los valores de semi-anchura al 10% para predecir todos los parámetros del modelo:

$$\sigma_0^2 = 0.76 \frac{A_{10}^2 B_{10}^2}{(A_{10} + B_{10})^2} \quad (3.40)$$

$$b = 0.72 \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (3.41)$$

$$c = 0.217 - 0.86 \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} \quad (3.42)$$

$$w = -\frac{A_{10}^2 + B_{10}^2 - 0.5 A_{10} B_{10}}{(A_{10} + B_{10})^2 A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (3.43)$$

$$z = \frac{A_{10}^2 + B_{10}^2 - 1.5 A_{10} B_{10}}{(A_{10} + B_{10})^2 A_{10} B_{10}} \quad (3.44)$$

Los coeficientes de las Ecuaciones (3.40)–(3.42) se obtuvieron empíricamente. Por su parte, las Ecuaciones (3.43) y (3.44) se obtuvieron resolviendo el sistema formado por las Ecuaciones (3.36) y (3.37).

3.4.2. Ajuste de los picos experimentales

El ajuste de los datos experimentales de un pico cromatográfico al modelo PLMG (Ecuación (3.29)) tiene el inconveniente de necesitar valores iniciales de los parámetros del modelo suficientemente próximos a los valores óptimos. Debido a la flexibilidad del modelo, éste puede converger fácilmente a mínimos locales sin significado físico [30]. Por otro lado, cualquier modelo de pico requiere estimaciones de gran exactitud del tiempo de retención en el máximo del pico y valores bastante exactos de la altura y de la varianza en el máximo del pico. Si la calidad de estos valores no es suficiente, el ajuste puede no converger.

Además de los problemas anteriores, un ajuste totalmente libre al modelo PLMG (y en menor medida, al modelo PVMG) puede producir indeterminaciones que detengan el proceso de minimización. Con el fin de mejorar la aplicabilidad de estos modelos y evitar valores negativos para la varianza de pico, debe cumplirse la condición expresada en la Ecuación (3.22). Esta condición está garantizada en las Ecuaciones (3.33)–(3.35). Sin embargo,

con el fin de aumentar la capacidad de ajuste, se sustituyó la varianza en el máximo del pico de la Ecuación (3.33) por:

$$\sigma_0^2 = \frac{4}{1+a^2} \frac{A_{60}^2 B_{60}^2}{(A_{60} + B_{60})^2} \quad (3.45)$$

Es conveniente utilizar un valor inicial de $a = 0.23$ (que proporciona un coeficiente de valor 3.8 en la Ecuación (3.33)) con el fin de realizar la optimización no lineal para obtener los parámetros del modelo de la Ecuación (3.29). Además, el numerador en el exponente de la función gaussiana modificada (la lorentziana) debe ser siempre positivo, lo que se garantiza si:

$$z > \frac{w^2}{4} \quad (3.46)$$

Se comprobó que las Ecuaciones (3.43) y (3.44) cumplían esta condición para los picos experimentales estudiados. Sin embargo, todavía no existe garantía de que esto suceda siempre a lo largo de las iteraciones en un proceso de optimización llevado a cabo para obtener los parámetros del modelo, en las que las semi-anchuras de los picos cambian continuamente. Por lo tanto, proponemos la siguiente ecuación:

$$z = \frac{w^2}{4} + d^2 \quad (3.47)$$

para garantizar la condición (3.46). De esta forma, los parámetros de ajuste serían $t_m, H_0, A_{60}, B_{60}, a, w$ y d (se encontró que es conveniente asignar valores iniciales de $w = d = 0$). Las Ecuaciones (3.33), (3.34) y (3.45) facilitan los ajustes y controlan las indeterminaciones. Se obtuvieron excelentes ajustes, como se observará a continuación. Esto, sin embargo, no garantiza que los valores de semi-anchura calculados (A_{60} y B_{60}) concuerden con los valores reales.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Evaluación de la capacidad de ajuste y predicción para los métodos propuestos

Con el fin de comprobar los métodos propuestos, se seleccionaron 20 picos de nuestra base de datos, que corresponden a varios compuestos de prueba con diversos valores de eficacia y asimetría. Los picos experimentales se obtuvieron utilizando diferentes modos cromatográficos, en elución isocrática y en gradiente, diferentes columnas, composiciones de fase móvil, temperaturas, caudales y valores de pH (Tabla 3.1). En ella se indican además los valores de las semi-anchuras al 60.65% (A_{60} y B_{60}), y al 10% (A_{10} y B_{10}) de la altura máxima de los picos, junto con los correspondientes factores de asimetría (B_{60}/A_{60} y B_{10}/A_{10}). Debe observarse que los picos se han ordenado de acuerdo a su asimetría obtenidas al 10% (los picos presentan cola cuando $B_{10}/A_{10} > 1$, y deformación frontal cuando $B_{10}/A_{10} < 1$).

La capacidad de ajuste y predicción de los métodos descritos en la sección teórica se evaluaron a través del cálculo de los errores relativos medios, de acuerdo a:

$$\varepsilon_r(\%) = \frac{\sum_{i=1}^N |h_i - \hat{h}_i|}{\sum_{i=1}^N |h_i|} \times 100 \quad (3.48)$$

donde h_i y \hat{h}_i son las alturas experimentales y predichas, respectivamente, para cada punto de los picos cromatográficos, y N es el número de puntos de los picos experimentales. Como se ha comentado anteriormente, se necesitan modelos para ajustar o predecir picos cromatográficos por diversas razones. Así, el ajuste de los picos se utiliza para la caracterización de picos o su deconvolución, mientras que es necesario predecir (simular) picos en la

optimización de la resolución cromatográfica. El ajuste de los picos es más exigente, mientras que la optimización de picos requiere métodos altamente estables y rápidos para predecir un gran número de picos realistas, en una amplia variedad de condiciones experimentales y en tiempos prácticos. En cualquier caso, es deseable disponer de descripciones exactas, independientemente de las características de los picos (de su anchura y asimetría).

3.5.2. Ajuste de picos experimentales

Se han propuesto varios modelos que proporcionan buenos resultados en el ajuste y predicción de picos cromatográficos. Sin embargo, como se ha comentado, pueden producirse problemas de convergencia (especialmente con picos muy asimétricos). Asimismo, cuando se realiza una optimización libre (sin restricciones), el proceso puede fácilmente originar indeterminaciones que pueden detenerlo al cabo de algunas iteraciones, o dar lugar a picos mal definidos. Existe, así, una gran necesidad de incrementar la estabilidad de los modelos añadiendo algunas restricciones.

Los errores obtenidos en el ajuste de los picos para los compuestos de prueba indicados en la Tabla 3.1, a los modelos PVMG (Ecuación (3.4)) y PLMG (Ecuación (3.29)), sin aplicar ningún tipo de restricción y tras aplicar las restricciones descritas en la Sección 3.4, se recogen en la Tabla 3.2. Cuando no se aplicaron esas restricciones, se estableció una condición de no negatividad para garantizar el ajuste de la región del pico. Para el modelo PVMG, se ajustó la parte superior del pico (por encima del 60% de la altura de los picos), o el pico completo. Para el modelo PLMG, siempre se ajustó el pico completo.

Tabla 3.2. Errores relativos (%) obtenidos en el ajuste de los picos experimentales de la Tabla 3.1 a los modelos PVMG y PLMG.

Pico	$(B/A)_{10}$	Sin restricciones			Con restricciones	
		PVMG ^a	PVMG ^b	PLMG ^c	PVMG ^d	PLMG ^e
1	2.50	0.036	4.68	0.75	5.89	0.75
2	2.39	0.081	4.36	1.83	4.61	1.83
3	2.36	0.12	1.90	0.47	1.90	0.47
4	2.07	0.072	1.70	0.49	3.15	0.74
5	2.02	0.048	3.51	1.48	3.51	1.48
6	2.00	0.009	0.75	0.44	0.75	0.44
7	1.86	0.021	0.87	0.67	0.87	0.67
8	1.63	0.029	2.32	0.67	2.32	0.67
9	1.49	0.059	1.20	0.44	1.20	0.44
10	1.47	0.032	2.13	0.68	2.13	0.68
11	1.47	0.038	1.27	0.96	1.27	0.96
12	1.44	0.020	1.40	1.27	1.40	1.36
13	1.29	0.019	1.22	0.71	1.22	0.71
14	1.27	0.019	0.29	0.21	0.29	0.27
15	1.24	0.16	1.26	1.03	1.26	1.03
16	1.16	0.077	0.75	0.52	0.75	0.66

^a Ecuación (3.4) (sólo se ajustó la parte superior del pico).

^b Ecuación (3.4) (se ajustó el pico completo). ^c Ecuación (3.29).

^d Ecuación (3.4) combinada con las Ecuaciones (3.27), (3.28) y (3.45).

^e Ecuación (3.29) combinada con las Ecuaciones (3.34), (3.35), (3.45) y (3.47).

Tabla 3.2 (continuación).

Pico	$(B/A)_{10}$	Sin restricciones			Con restricciones	
		PVMG ^a	PVMG ^b	PLMG ^c	PVMG ^d	PLMG ^e
17	1.10	0.002	0.27	0.16	0.27	0.17
18	1.05	0.031	0.63	0.57	0.63	0.57
19	0.97	0.045	0.40	0.33	0.40	0.37
20	0.72	0.047	2.39	0.36	2.39	0.35
Valor medio		0.051±0.038	1.7±1.3	0.70±0.43	1.8±1.5	0.73±0.42

Los errores obtenidos con el modelo PLMG (ajustando el pico completo) fueron significativamente menores, estando situados por debajo del 1%. La Figura 3.1a muestra el excelente ajuste del pico del alprenolol (que presenta una cola pronunciada, $B_{10}/A_{10} = 2.07$) al modelo PLMG, mientras que la Figura 3.1b ilustra el ajuste de la parte superior del mismo pico para el modelo PVMG. Se observó un comportamiento similar para los otros picos estudiados. La adición de restricciones puede incrementar el error de ajuste, aunque en la mayoría de casos no se observó diferencia con los resultados obtenidos sin aplicar restricciones. La característica especial al aplicar restricciones es que éstas aumentan significativamente la garantía de convergencia en valores fiables y eliminan el riesgo de obtener indeterminaciones.

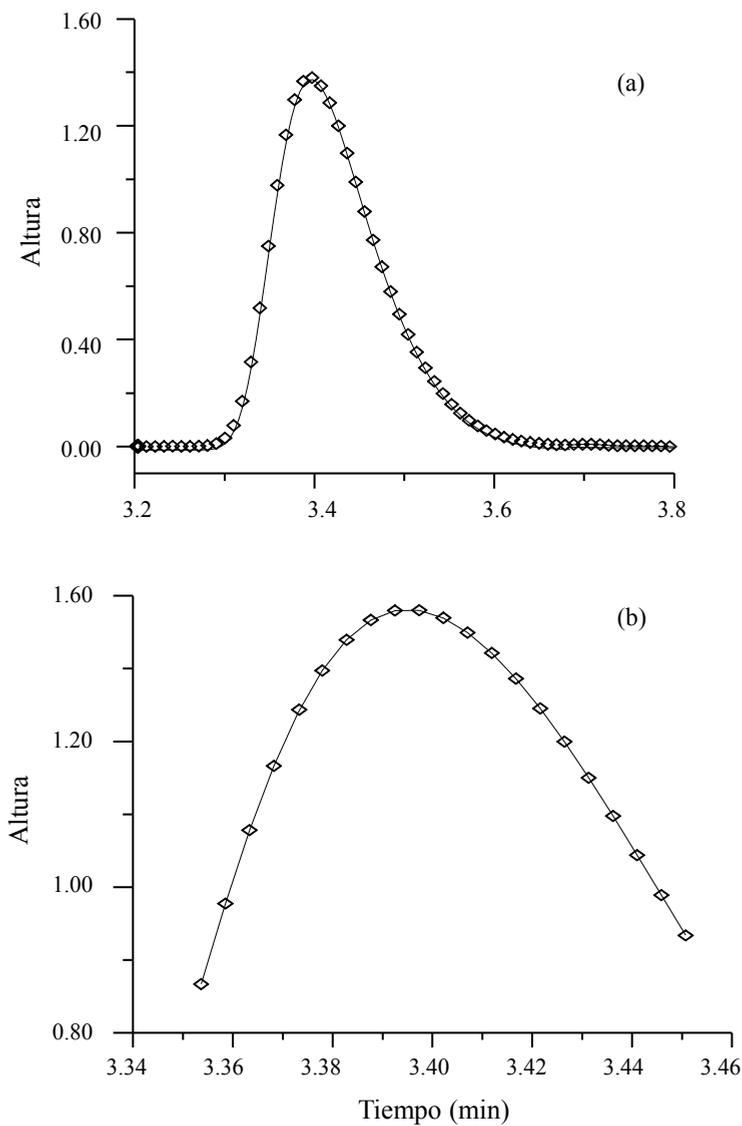


Figura 3.1. Ajuste de un pico de alprenolol (pico 4 en la Tabla 3.1) al: (a) modelo PLMG, y (b) modelo PVMG, en ambos casos sin aplicar restricciones. En (b), se ajustó únicamente la parte superior del pico.

3.5.3. Predicción de perfiles de pico

La optimización de la resolución cromatográfica incrementa su fiabilidad si además de la retención de los picos predichos, se considera también su perfil. La forma más conveniente de predecir los perfiles de pico es a través de los valores de las semi-anchuras de los picos, ya que éstas permiten tener en cuenta no sólo la anchura, sino también la deformación de los picos (por ejemplo, la formación de colas). Es posible predecir las semi-anchuras de los picos en cualquier condición de un diseño experimental, en base a los valores de las semi-anchuras para las condiciones seleccionadas. El proceso se puede llevar a cabo mediante al menos dos métodos distintos. En el primero, las semi-anchuras de los picos predichos se obtienen por interpolación a partir de los picos en las condiciones más cercanas del diseño experimental. En el segundo método, las semi-anchuras se predicen a partir de correlaciones previamente establecidas entre las semi-anchuras de los picos y los tiempos medidos en su máximo, utilizando las condiciones del diseño experimental:

$$A = A_0 + at_m + bt_m^2 \quad (3.49)$$

$$B = B_0 + a't_m + b't_m^2 \quad (3.50)$$

El amplio intervalo y número de condiciones a la que los picos deben predecirse, en la optimización de la resolución cromatográfica, requieren métodos fiables que garanticen la ausencia de indeterminaciones. En el estudio presentado aquí, hemos evaluado seis métodos diferentes: el modelo gaussiano puro, los modelos LMG y PVMG, junto a tres modalidades del modelo PLMG.

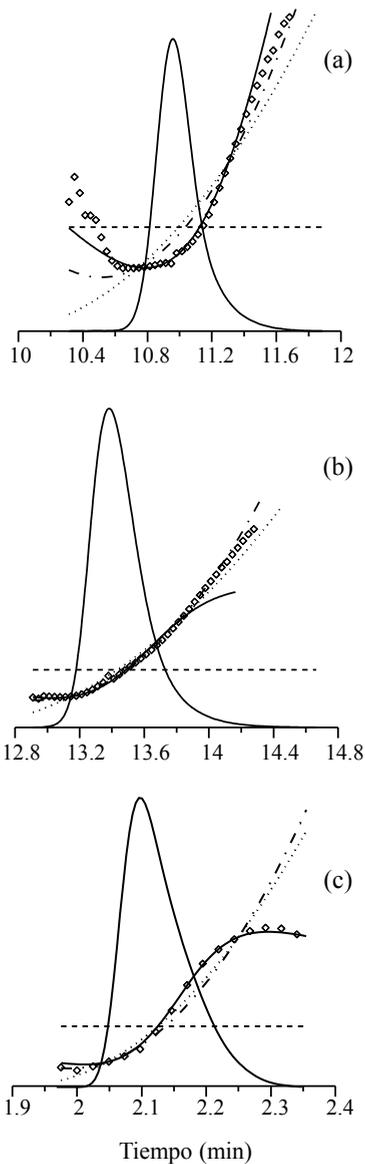


Figura 3.2. Picos cromatográficos para: (a) bumetanida (pico 8), (b) acebutolol (pico 7), y (c) alprenolol (pico 1). Se ha superpuesto sobre la representación de los picos la varianza experimental (\diamond) y predicha ($\times 200$), utilizando los métodos I (---), II (...), III (-.-.-), y Va (—).

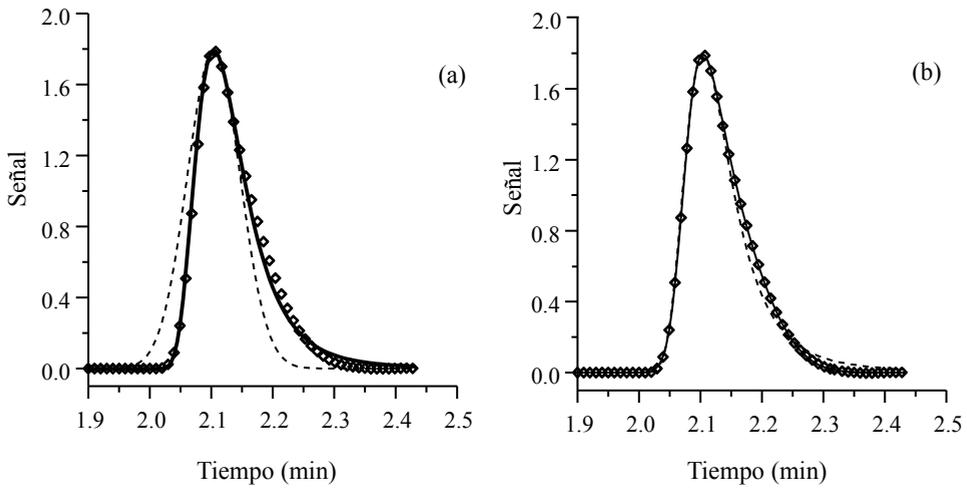


Figura 3.3. Calidad de los modelos propuestos en el ajuste del pico de alprenolol (pico 1): (a) Modelo gaussiano (Método I, - - -), y modelo LMG (Método II, —); (b) Modelo PVMG (Método III, - - -), y modelo PLMG (Método Va,—). La calidad de los Métodos IV y Vb fue similar a la del Método Va. Los puntos experimentales se han representado como (\diamond).

Las Figuras 3.2 y 3.3 muestran la calidad de las predicciones para varios picos. Los errores de predicción para el conjunto completo de picos estudiados se presentan en la Tabla 3.3. La Figura 3.2 ilustra la varianza experimental dentro de la región de los picos obtenidos para bumetanida, acebutolol y alprenolol, junto con las predicciones ofrecidas por los distintos métodos. La varianza experimental se obtuvo de acuerdo a:

$$\sigma^2 = \frac{t_c^2}{-2 \ln \frac{h}{H_0}} \tag{3.51}$$

Tabla 3.3. Errores relativos (%) en la predicción de los perfiles de pico para los compuestos de prueba de la Tabla 3.1, utilizando los métodos descritos en la Sección 3.4.

Pico	$(B/A)_{10}$	Métodos					
		I	II	III	IV	Va	Vb
1	2.50	33.8	7.42	8.35	1.50	0.92	2.09
2	2.39	35.1	6.06	6.77	3.02	3.14	2.89
3	2.36	31.8	5.13	3.18	2.76	3.75	6.34
4	2.07	28.2	4.67	6.35	a	2.35	5.00
5	2.02	28.6	4.76	4.98	2.06	3.00	2.79
6	2.00	27.5	7.75	5.53	3.72	2.78	6.00
7	1.86	23.1	3.75	1.85	3.92	2.51	2.80
8	1.63	19.6	9.38	7.33	a	2.84	6.83
9	1.49	15.0	5.51	3.89	2.29	1.51	2.78
10	1.47	15.9	8.04	6.09	a	1.92	5.32
11	1.47	15.0	5.27	3.32	a	2.01	3.07
12	1.44	15.0	4.44	2.56	4.50	2.19	2.21
13	1.29	10.6	5.54	3.66	4.28	1.89	2.42
14	1.27	9.86	3.82	1.96	2.56	0.80	0.59
15	1.24	8.4	2.21	1.42	a	1.98	2.59

^a Los picos estaban mal definidos debido a la aparición de indeterminaciones.

Tabla 3.3 (continuación).

Pico	$(B/A)_{10}$	Métodos					
		I	II	III	IV	Va	Vb
16	1.16	5.28	1.06	1.54	0.80	1.62	2.95
17	1.10	4.18	2.17	0.52	^a	0.98	1.54
18	1.05	2.96	2.39	0.71	1.45	1.15	1.73
19	0.97	2.09	1.66	0.75	0.98	1.17	2.11
20	0.72	15.4	9.85	7.88	^a	3.74	6.61
Valor medio		17.4±10.6	5.0±2.5	3.9±2.6	–	2.1±0.9	3.4±1.9

^a Los picos estaban mal definidos debido a la aparición de indeterminaciones.

Para un pico simétrico, la varianza no cambia con el tiempo. En consecuencia, el modelo gaussiano puro (que supone picos simétricos) tendrá un carácter invariable, independientemente de la asimetría (véase la Figura 3.2). Como se observa en la Tabla 3.3, este modelo (método I) produjo predicciones muy pobres (con errores relativos generalmente por encima del 10–20%). Por lo general, los métodos II (modelo LMG) y III (modelo PVMG) ofrecieron buenos resultados con picos que mostraban una pequeña asimetría. Sin embargo, debe indicarse que teniendo en cuenta la gran variedad de picos cromatográficos que pueden generarse, picos simétricos con una gran curtosis no pueden descartarse, para los que las predicciones serían aún más pobres.

Como se ha comentado, el método IV (modelo PLMG aplicado sin restricciones) es un modelo inestable debido a la exigencia de invertir la matriz (3.32), que puede estar mal definida y se ve muy afectada por los errores

experimentales. Ésta es, de hecho, la razón de las frecuentes indeterminaciones [30]. Este inconveniente se soluciona con los métodos Va y Vb (modelos PLMG adaptados para evitar indeterminaciones).

El método Va que utiliza información al 60.65% y al 10% de la altura de los picos, ofreció los errores más bajos, con predicciones que concuerdan en gran medida con los picos experimentales (los errores relativos, por lo general, se situaron por debajo del 2–3%). Los resultados obtenidos con los métodos III y Vb también fueron satisfactorios. El método Vb condujo a resultados algo mejores, pero el método III es más simple. Por lo tanto, cuando no se requiera una gran exactitud, este método puede ser la mejor opción.

3.6. Conclusiones

El modelo PLMG (Ecuaciones (3.3) o (3.29)) se desarrolló para ajustar picos que presentan una elevada asimetría [22]. Este modelo ofrece excelentes descripciones de los picos cromatográficos. Sin embargo, la estabilidad del modelo no está garantizada para la predicción de picos, necesaria en la optimización de la resolución cromatográfica. En los estudios presentados en este capítulo, se propone un método que incluye varias restricciones y la expresión de los parámetros del modelo en función de los valores de las semi-anchuras de los picos, lo que hace al modelo más práctico con fines de predicción. La aplicación del nuevo método a picos experimentales, con una amplia variedad de comportamientos, indicó que se logró el objetivo planteado. Por otro lado, se proporcionan algunas recomendaciones para mejorar la capacidad de ajuste del modelo PLMG. Esto permitirá la obtención de propiedades de pico más fiables, como el área o los momentos de diverso grado, así como la mejora de los resultados en la deconvolución de picos.

Los nuevos métodos propuestos en este capítulo (basados en el modelo PLMG con restricciones) utilizan la información de las semi-anchuras al 60.65% y al 10% de la altura de los picos, o sólo al 10%. En el primer caso, obviamente, se producen los mejores resultados ya que es posible describir adecuadamente tanto la parte superior como la inferior de los picos (puesto que se fuerza el ajuste a los valores de semi-anchura al 60.65% y 10%, además de a su máximo, H_0). Ambos métodos evitan la aparición de indeterminaciones en la función parabólica. No se han encontrado problemas con los picos estudiados, para los que la condición (3.46) se cumplía. Esto evidencia que la adición de restricciones incrementa las expectativas de éxito. No obstante, la ausencia de indeterminaciones en la lorentziana no está totalmente garantizada.

Por último, debemos señalar el interés de las directrices ofrecidas en este estudio para desarrollar mejores modelos, con el fin de ajustar y predecir picos de cualquier procedencia. Ello permitirá que cualquier laboratorio elabore su propio método para conseguir el mejor ajuste a una aplicación particular.

3.7. Referencias

- [1] A. Cavazzini, F. Dondi, A. Jaulmes, C. Vidal-Madjar, A. Felinger, *Monte Carlo model of nonlinear chromatography: Correspondence between the microscopic stochastic model and the macroscopic Thomas kinetic model*, Anal. Chem. 74 (2002) 6269–6278.
- [2] H. Gao, P.G. Stevenson, F. Gritti, G. Guiochon, *Investigations on the calculation of the third moments of elution peaks. I: Composite signals generated by adding up a mathematical function and experimental noise*, J. Chromatogr. A 1222 (2012) 81–89.

- [3] Su-Cheng Pai, *Parcel model for peak shapes in chromatography: Numerical verification of the temporal distortion effect to peak asymmetry*, J. Chromatogr. A 988 (2003) 233–260.
- [4] A. Felinger, G. Guiochon, *Comparison of the kinetic models of linear chromatography*, Chromatographia 60 (2004) S175–S180.
- [5] L. Pasti, A. Cavazzini, A. Felinger, M. Martin, F. Dondi, *Single-molecule observation and chromatography unified by Lévy process representation*, Anal. Chem. 77 (2005) 2524–2535.
- [6] F. Gritti, G. Guiochon, *General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC*, Anal. Chem. 78 (2006) 5329–5347.
- [7] F. Dondi, A. Cavazzini, L. Pasti, *Chromatography as Lévy stochastic process*, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 257–267.
- [8] K. Kaczmarski, G. Guiochon, *Modeling of the mass-transfer kinetics in chromatographic columns packed with shell and pellicular particles*, Anal. Chem. 79 (2007) 4648–4656.
- [9] K. Miyabe, Y. Matsumoto, Y. Niwa, N. Ando, G. Guiochon, *An estimation of the column efficiency made by analyzing tailing peak profiles*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8319–8330.
- [10] L. Pasti, A. Cavazzini, M. Nassi, F. Dondi, *Dynamic chromatography: A stochastic approach*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1000–1009.
- [11] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *A theoretical plate model accounting for slow kinetics in chromatographic elution*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5166–5174.
- [12] G.K.C. Low, P.R. Haddad, A.M. Duffield, *Proposed model for peak splitting in reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with computer prediction of eluted peak profiles*, J. Chromatogr. B 336 (1984) 15–24.
- [13] E.V. Dose, G. Guiochon, *Normalized measure of overlap between non-Gaussian chromatographic peaks*, Anal. Chem. 62 (1990) 174–181.

-
- [14] M.C. Pietrogrande, F. Dondi, A. Felinger, J.M. Davis, *Statistical study of peak overlapping in multicomponent chromatograms: importance of the retention pattern*, Chemom. Intel. Lab. Syst. 28 (1995) 239–258.
- [15] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks*, Anal. Chem. 69 (1997) 3822–3831.
- [16] A. Felinger, *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 97–119.
- [17] A.G. Stromberg, S.V. Romanenko, E.S. Romanenko, *Systematic study of elementary models of analytical signals in the form of peaks and waves*, J. Anal. Chem. 55 (2000) 615–625.
- [18] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, *Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks*, J. Chromatogr. A 931 (2001) 1–30.
- [19] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, *On the equations describing chromatographic peaks and the problem of the deconvolution of overlapped peaks*, J. Chromatogr. A 912 (2001) 13–29.
- [20] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, A. Garrido Frenich, M.C. García Álvarez-Coque, *A hybrid genetic algorithm with local search. II. Continuous variables: Multibatch peak deconvolution*, Chemom. Intel. Lab. Syst. 59 (2001) 107–120.
- [21] R.D. Caballero, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Parabolic-Lorentzian modified Gaussian model for describing and deconvolving chromatographic peaks*, J. Chromatogr. A 954 (2002) 59–76.
- [22] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17–24.
- [23] P. Moretti, S. Vezzani, E. Garrone, G. Castello, *Evaluation and prediction of the shape of gas chromatographic peaks*, J. Chromatogr. A 1038 (2004) 171–181.

- [24] B. Steffen, K.P. Müller, M. Komenda, R. Koppmann, A. Schaub, *A new mathematical procedure to evaluate peaks in complex chromatograms*, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 239–246.
- [25] S.V. Romanenko, A.G. Stromberg, *Modelling of analytical peaks: Peak modifications*, Anal. Chim. Acta 581 (2007) 343–354.
- [26] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape in hydro-organic and micellar-organic liquid chromatography as a function of mobile phase composition*, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 119–127.
- [27] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, A.M. van Niederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals: Part II: Peak model and deconvolution algorithms*, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146–155.
- [28] M.C. García Álvarez-Coque, E.F. Simó Alfonso, J.M. Sanchis Mallols, J.J. Baeza Baeza, *A new mathematical function for describing electrophoretic peaks*, Electrophoresis 26 (2005) 2076–2085.
- [29] J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Approaches to estimate the time and height at the peak maximum in liquid chromatography based on a modified Gaussian model*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1385–1392.
- [30] P.G. Stevenson, F. Gritti, G. Guiochon, *Automated methods for the location of the boundaries of chromatographic peaks*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8255–8263.

CAPÍTULO 4

**IMPLEMENTACIÓN DE GRADIENTES DE DISOLVENTE
ORGÁNICO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR
UTILIZANDO DRYLAB®: SEPARACIÓN DE COMPUESTOS
BÁSICOS EN MUESTRAS DE ORINA**

4.1. Summary

In micellar liquid chromatography (MLC), the peaks are more evenly distributed compared to conventional reversed-phase liquid chromatography (RPLC). This is the reason that most procedures are implemented using isocratic elution. However, gradient elution may be still useful in MLC to analyse mixtures of compounds within a wide range of polarities, decreasing the analysis time. Also, it benefits the determination of moderately to low polar compounds in physiological fluids performing a direct injection of the sample: an initial micellar eluent with a low organic solvent content, or a pure micellar (without surfactant) solution, will provide better protection of the column against the proteins in the physiological fluid, and once the proteins are swept away, the elution strength can be increased using a positive linear gradient of organic solvent to reduce the analysis time. This work aims to encourage analysts to implement gradients of organic solvent in MLC, which is rather simple and allows rapid analytical procedures without pre-treatment or the need of re-equilibration. The implementation of gradient elution is illustrated through the separation of eight basic compounds (β -blockers) in urine samples directly injected into the chromatograph, the most hydrophobic showing large retention in both conventional RPLC and MLC. The use of the DryLab[®] software to optimise gradients of organic solvent with eluents containing a fixed amount of surfactant above the critical micellar concentration is shown to provide satisfactory predictions, and can facilitate greatly the implementation of gradient protocols.

4.2. Introducción

La cromatografía líquida micelar (MLC) es un modo de la cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), en la que la fase móvil se compone básicamente de una disolución acuosa de un surfactante iónico o neutro en una concentración por encima de la concentración micelar crítica (CMC). Este modo de RPLC ha evolucionado desde una curiosidad en los laboratorios durante los años 80 [1], hasta su utilidad práctica actual. Hay más de tres décadas de experiencia en MLC con varios cientos de métodos publicados [2,3]. Una de las características más sobresalientes de la MLC es su selectividad única, a menudo atribuida a la habilidad de las micelas de organizar solutos a nivel molecular. Sin embargo, la asociación de los monómeros del surfactante a la fase estacionaria, formando una estructura similar al exterior de micelas abiertas [4], tiene implicaciones profundas en el comportamiento cromatográfico (tiempo de análisis, selectividad y eficacia). La adsorción de una cantidad aproximadamente constante de monómeros de surfactante sobre la fase estacionaria [5] da lugar a una fase modificada estable, con propiedades notablemente diferentes a las de la fase enlazada subyacente [6,7].

La MLC se propuso inicialmente como un modo cromatográfico que hacía uso de fases móviles que contenían tan sólo agua, tampón, micelas y una pequeña cantidad de monómeros de surfactante [1]. Por lo tanto, las micelas jugaban el papel del modificador orgánico. Sin embargo, las disoluciones que contienen sólo surfactante son demasiado débiles y producen picos deformados. Para remediar estos problemas, Dorsey *et al.* sugirieron añadir una pequeña cantidad de disolvente orgánico a la fase móvil [8]. Desde entonces, la mayoría de procedimientos analíticos publicados en MLC hacen

uso de disoluciones acuosas de surfactante, mezcladas con una pequeña cantidad de disolvente orgánico (principalmente, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol y acetonitrilo) [2,3]. En estas disoluciones, la concentración de disolvente orgánico se mantiene suficientemente baja para permitir la formación de micelas. Sin embargo, también se ha descrito la ventaja de aumentar la concentración de disolvente orgánico a valores a los que se destruyen las micelas, ya que se originan tiempos de análisis más cortos, una mayor selectividad y mejoras en el perfil de los picos cromatográficos, respecto a la MLC y a la RPLC convencional [9–11]. A esta técnica se le ha denominado cromatografía líquida submicelar (HSLC, *high submicellar liquid chromatography*). En HSLC, las interacciones hidrofóbicas pueden dominar, debido a la reducción del revestimiento de surfactante iónico sobre la fase estacionaria, la desagregación de las micelas y la disminución de la polaridad de la fase móvil.

La selectividad única de la MLC, junto con el menor consumo de disolvente orgánico y menor toxicidad, respecto a la RPLC hidro-orgánica convencional, pueden no ser razones de peso para adoptar este modo cromatográfico. Tal vez, la razón principal del creciente interés en la MLC es la posibilidad de realizar la inyección directa de muestras fisiológicas a través de la solubilización de las proteínas de la muestra por interacción con las micelas en la fase móvil, y la protección de la fase estacionaria mediante su recubrimiento con monómeros del surfactante, evitando la obstrucción de la columna [12–14]. Así, las proteínas son eliminadas de la columna con o poco después del frente del disolvente. Las micelas también pueden liberar los fármacos unidos a proteínas, lo que da lugar a concentraciones más elevadas de éstos en la fase móvil, favoreciendo su reparto y detección. Estas

características simplifican los procedimientos analíticos e incrementan el número de muestras analizadas.

En la RPLC convencional sin aditivos, existe una dependencia lineal entre el logaritmo del factor de retención ($\log k$) y la polaridad del soluto, que generalmente se mide como el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua ($P_{o/w}$) [15]. Esta relación da lugar a uno de los principales problemas de la técnica, a lo que se ha llamado "el problema de elución general de la cromatografía": si el intervalo de polaridades de los solutos es demasiado amplio, será difícil encontrar una condición experimental capaz de lograr resoluciones satisfactorias para los solutos menos retenidos y tiempos de retención razonables para los solutos más retenidos [16]. Una solución lógica para superar esta situación es la aplicación de gradientes, en los que la fuerza eluyente se incrementa gradualmente a medida que progresa el análisis, mediante la alteración de al menos un factor experimental (por lo general, el contenido de disolvente orgánico).

En la MLC, la situación es diferente debido a la mayor efectividad de las micelas en la desorción de los solutos altamente hidrofóbicos. Ello da lugar a relaciones lineales entre k y $\log P_{ow}$ [17], lo que se traduce en un mayor número de compuestos eluidos por unidad de tiempo en el modo isocrático, respecto a la RPLC convencional. Con ello, en MLC, los picos cromatográficos aparecen más uniformemente distribuidos [18]. Este comportamiento se ha denominado "efecto acordeón" y es la principal razón de que en casi todos los procedimientos de MLC publicados se utilicen condiciones isocráticas. A pesar de ello, la elución en gradiente puede ser útil en MLC para acelerar algunos análisis, o incluso su aplicación puede mejorar la capacidad de separación de la técnica.

Sin embargo, tras los estudios fundamentales desarrollados por Dorsey, Khaledi *et al.* [19–22], donde se describe la capacidad y utilidad de la elución en gradiente en MLC para acelerar la elución de compuestos fuertemente retenidos, sólo muy pocos autores se han preocupado por el desarrollo de procedimientos analíticos que utilicen gradientes en MLC. Paleologos *et al.* determinaron aminas biogénicas en pescado, pollo y muestras de vino usando un eluyente con dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulphate*) 0.40 M y concentraciones crecientes de acetonitrilo (del 30 al 50% v/v) [23,24]. Ghorbani *et al.* determinaron vitaminas solubles en agua en comprimidos multi-vitamínicos con SDS 0.016 M e incrementos de 1-butanol (desde el 3.5 al 10%) [25]. Bryant y Altria determinaron fármacos básicos y compuestos neutros utilizando gradientes en los que se aumentaba simultáneamente la concentración de SDS y 1-pentanol (desde SDS 0.006 M / 0.7 % de 1-pentanol a 0.08 M / 9.8%, y desde 0.011 M / 1.4% a 0.11 M / 14 %) [26]. Cao *et al.* separaron un conjunto de compuestos fenólicos con un eluyente que contenía una concentración fija de SDS (0.05 M) y un gradiente de acetonitrilo desde el 0 al 30% [27].

Es particularmente interesante el trabajo de Nakao *et al.*, que determinaron varios radio-metabolitos en muestras de plasma mediante tomografía por emisión de positrones (PET, *positron emission tomography*) para evaluar la farmacocinética de los ligandos PET, utilizando gradientes de 1-butanol o acetonitrilo y manteniendo la concentración de SDS fija [10,28,29]. Para el análisis de los radio-ligandos de vida corta es esencial que los análisis sean rápidos, así como la posibilidad de procesar una gran cantidad de muestras para obtener funciones farmacocinéticas correctas de los metabolitos. Estos autores demostraron que la MLC supera las limitaciones de la RPLC convencional, que sólo permite el análisis de los radio-metabolitos para un

número limitado de muestras de plasma. El trabajo fue desarrollado guiado por el principio de la inyección directa de las muestras fisiológicas en la columna cromatográfica, en condiciones en las que se encuentra protegida (condiciones de MLC), seguida por la rápida elución de los analitos altamente retenidos (tras la separación de las proteínas, incrementando rápidamente la concentración del disolvente orgánico hasta alcanzar condiciones de HSLC).

En nuestra opinión, a pesar de la ventaja del uso de la elución en el modo isocrático de la MLC, los analistas deberían considerar la mejora de algunos procedimientos mediante la aplicación de gradientes. Para fomentar la aplicación del gradiente en MLC, en este capítulo, se muestra en detalle el desarrollo de un procedimiento de gradiente para la separación de un conjunto de compuestos básicos (β -bloqueantes) en orina, realizando la inyección directa de las muestras, y empleando una concentración constante de SDS y un aumento lineal de la concentración del disolvente orgánico. Se describe también el uso del software DryLab[®] para predecir las condiciones óptimas de separación.

Tabla 4.1. Estructuras, constantes de disociación (pK_a) y coeficientes de reparto octanol-agua ($\log P_{o/w}$) de los β -bloqueantes.

Compuesto	Estructura	pK_a^a	$\log P_{o/w}^b$
Acebutolol		9.2	1.19
Atenolol		9.6	-0.026
Carteolol		NA	1.42
Celiprolol		NA	1.93
Labetolol		8.7; 7.4	2.41
Metoprolol		9.7	1.69
Oxprenolol		9.5	1.83
Propranolol		9.5	2.60

^a Ref. [30]; NA = No disponible. ^b Ref. [31]: Valores calculados a partir de las estructuras de los compuestos, haciendo uso de un programa on-line (LOGKOW del Centro de Ciencias Medioambientales de Syracuse Research Corporation).

4.3. Parte experimental

4.3.1. Reactivos y columnas

Se analizaron los siguientes compuestos básicos (β -bloqueantes) (Tabla 4.1): acebutolol, atenolol, carteolol, labetalol, metoprolol y propranolol de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), celiprolol de Rhône-Poulenc Rorer (Alcorcón), y oxprenolol de Ciba-Geigy (Barcelona). Los fármacos se disolvieron en una pequeña cantidad del disolvente orgánico utilizado en el eluyente, y se diluyeron con agua. La concentración de las disoluciones inyectadas fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las mezclas acuosas, y de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las muestras de orina enriquecidas, que se obtuvieron de voluntarios.

Las fases móviles contenían dodecilsulfato sódico de Merck (99% de pureza, Darmstadt, Alemania), y acetonitrilo o 1-propanol de Scharlau (Sentmenat, Barcelona). El pH se tamponó a 3 con dihidrógenofosfato sódico anhidro 0.01 M (Fluka, Steinheim, Alemania). Se utilizaron dos columnas cromatográficas: una Zorbax Eclipse XDB-C₈ y una Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (ambas de 150 mm \times 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm) de Agilent (Waldbronn, Alemania).

4.3.2. Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo líquido modular de Agilent, equipado con los siguientes módulos: una bomba cuaternaria (HP 1200) operada a un caudal de 1 mL/min, un muestreador automático (HP 1100) con viales de 2 mL, y un detector UV-visible (HP 1100) fijado a 225 nm. La temperatura se controló a 25°C con un compartimento de columnas termostatzado (HP 1100). La presión máxima de la bomba fue de 400 bares.

El sistema se controló mediante una estación de datos ChemStation LC OpenLAB CDS (Agilent B.04.03). Las condiciones de separación se optimizaron asistidas del software DryLab® (Instituto Molnár, Berlín, Alemania). Los cromatogramas se exportaron en DryLab® con ayuda del software PeakMatch® de Agilent en formato AIA (*. Cdf) para el seguimiento de los picos.

El valor medio del tiempo de retardo (*dwel time*) fue $t_d = 0.89$ min. El tiempo muerto (t_0) en RPLC convencional se obtuvo a partir del pico de uracilo ($t_0 = 1.42$ min). La primera perturbación en los cromatogramas permitió la determinación del tiempo muerto en MLC ($t_0 = 1.30$ min). Otros detalles pueden consultarse en el Capítulo 2.

4.4. Resultados y discusión

Este estudio se desarrolló basado en la experiencia previa del grupo investigador en la separación isocrática de β -bloqueantes mediante MLC y HSLC. En él se examina y optimiza la capacidad de las disoluciones que contienen SDS y disolvente orgánico para el trabajo en gradiente. Para ello, se seleccionó un grupo de ocho β -bloqueantes con diferentes polaridades como compuestos de prueba: acebutolol, atenolol, carteolol, celiprolol, labetolol, metoprolol, oxprenolol y propranolol. A lo largo del estudio, se comparó el comportamiento en MLC con el observado en RPLC hidro-orgánica utilizando el mismo disolvente orgánico. El objetivo de este trabajo no es la implementación de un procedimiento específico para analizar los β -bloqueantes, sino mostrar una metodología útil para los analistas que desean implementar gradientes de disolvente orgánico en MLC para el análisis de β -bloqueantes (los fármacos padre y/o sus metabolitos), u otros compuestos (de carácter básico o de otro tipo).

4.4.1. Separación isocrática de β -bloqueantes

a) Ensayos preliminares

Antes de implementar la elución en gradiente, a menudo es conveniente evaluar el comportamiento cromatográfico en el modo isocrático. Esto es especialmente útil para MLC. Por lo tanto, se realizaron en primer lugar experiencias preliminares para separar los ocho β -bloqueantes, utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ y fases móviles que contenían un 15% de acetonitrilo, en presencia de SDS 0.10 M.

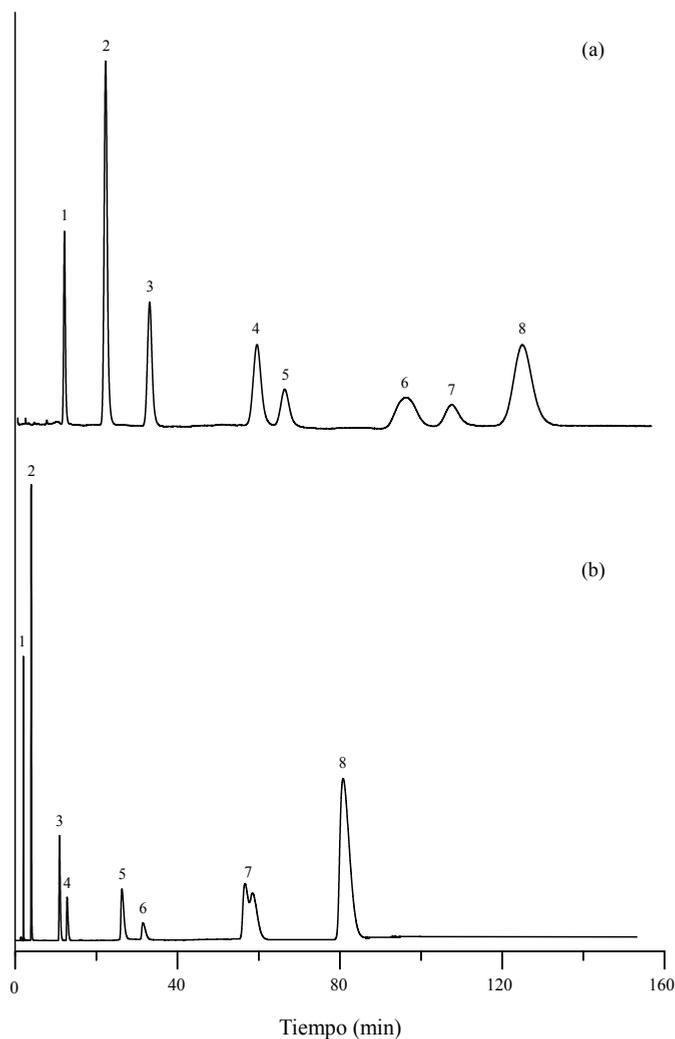


Figura 4.1. Cromatogramas de una mezcla acuosa de un conjunto de β -bloqueantes eluidos isocráticamente con 15% v/v de acetonitrilo, en presencia de SDS 0.10 M (a), y en su ausencia (b). Columna: Zorbax Eclipse XDB-C₈. Compuestos: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) acebutolol, (4) metoprolol, (5) celiprolol, (6) oxprenolol, (7) labetalol, y (8) propranolol.

La retención fue muy elevada, especialmente para los compuestos más hidrofóbicos (oxprenolol, labetalol y propranolol), con tiempos de retención cercanos a los 300 min o superiores. Se decidió cambiar la columna por otra similar menos hidrofóbica (Zorbax Eclipse XDB-C₈), con la que los tiempos de retención disminuyeron significativamente, pero éstos todavía eran demasiado elevados, tal como se puede observar en la Figura 4.1a.

Con fines comparativos, en la Figura 4.1b, se muestra el cromatograma obtenido con un 15% de acetonitrilo (sin SDS). Aunque el orden de elución es el mismo para ambos modos cromatográficos, se observa el comportamiento particular de la MLC (Figura 4.1a) y la RPLC convencional (Figura 4.1b): la distribución de los picos es más homogénea a lo largo del cromatograma para MLC. Además, la formación de colas en los picos observada con la mezcla de acetonitrilo-agua es menos evidente con la fase móvil micelar-orgánica, pero en este caso los picos son más anchos y la retención de todos los picos se desplaza a tiempos mayores. Debe también llamarse la atención sobre el doble pico observado para el labetalol en el cromatograma para la RPLC convencional. Este doble pico también se observó en otros cromatogramas obtenidos con mezclas hidro-orgánicas, a lo largo de este trabajo.

b) Uso de fases móviles híbridas de SDS y 1-propanol

Aunque el 1-propanol no es un disolvente habitual en la RPLC convencional, se ha convertido en el disolvente más empleado en MLC desde los inicios de la técnica. Este disolvente proporciona una solución a la débil fuerza eluyente del metanol y acetonitrilo en MLC, siendo particularmente útil para compuestos moderadamente polares.

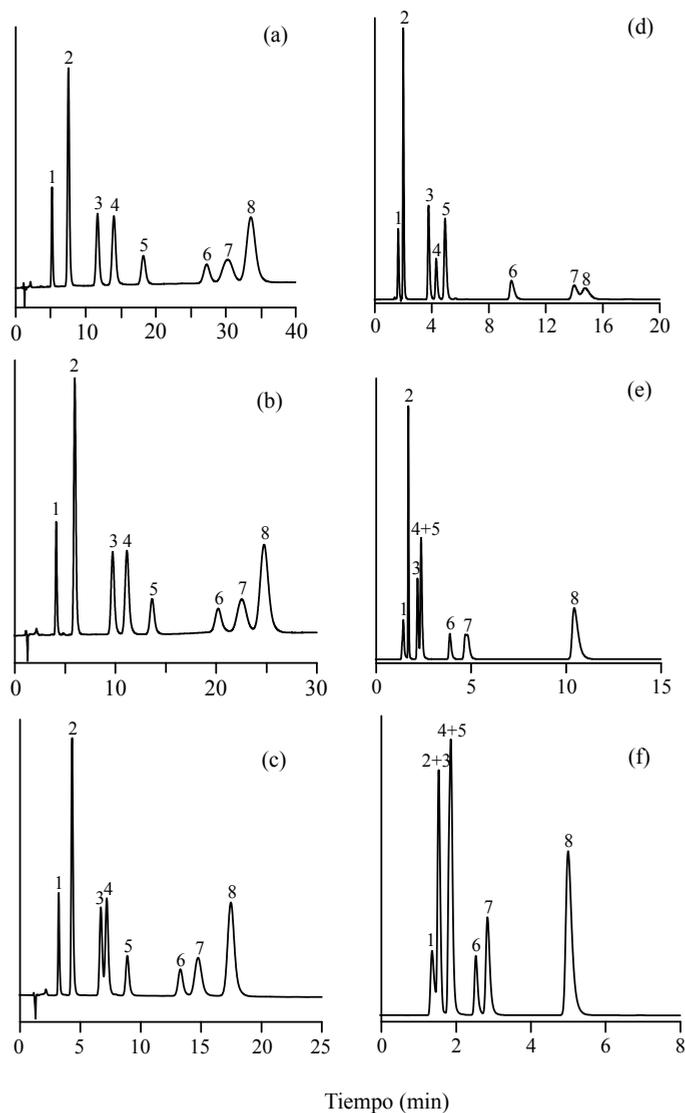


Figura 4.2. Cromatogramas para una mezcla acuosa de un conjunto de β -bloqueantes eluidos isocráticamente con fases móviles micelar-orgánicas (a–c) e hidro-orgánicas (d–f), conteniendo 10% (a y d), 15% (b y e), y 20% (c y f) de 1-propanol. La concentración de SDS en las fases móviles micelar-orgánicas fue 0.10 M. Para más detalles, véase la Figura 4.1.

En las Figuras 4.2a–c, se muestran los cromatogramas obtenidos para el conjunto de los β -bloqueantes utilizando 10, 15 y 20% de 1-propanol, respectivamente, en presencia de SDS 0.10 M. Con fines comparativos, en las Figuras 4.2d–f, se muestran los cromatogramas obtenidos con 1-propanol a las mismas concentraciones en ausencia del surfactante. Las pautas de elución son distintas en los dos modos cromatográficos.

Como se observa, en la RPLC convencional (Figuras 4.2d–f), la fuerza eluyente del 1-propanol es demasiado elevada: la separación es adecuada para 10% de 1-propanol, pero con 15% se produce la coelución de metoprolol y celiprolol, y con 20% de 1-propanol, también coeluyen carteolol y acebutolol. Por el contrario, los picos en los cromatogramas obtenidos con la combinación de SDS y 1-propanol (Figuras 4.2a–c) se hallan suficientemente resueltos para las tres concentraciones ensayadas del disolvente orgánico, aunque los tiempos de retención son todavía demasiado elevados. Debe observarse que en el modo micelar, la selectividad con 10 y 15% de 1-propanol es similar. En consecuencia, la separación de los β -bloqueantes en ambos modos cromatográficos debe realizarse preferiblemente en el modo gradiente, para lograr la resolución de los compuestos poco retenidos y/o reducir el tiempo de análisis.

4.4.2. Ensayos preliminares utilizando gradientes en MLC

Puesto que el objetivo de este trabajo era implementar un procedimiento de inyección directa, se concentró el esfuerzo en la optimización de un gradiente en MLC. El cromatograma de la Figura 4.2c indicó la necesidad de emplear 1-propanol a una concentración de al menos un 20% para eluir los β -bloqueantes más hidrófobicos en tiempos suficientemente cortos, pero

acebutolol y metoprolol mostraron un pequeño solapamiento a esta composición de la fase móvil. Por otro lado, cuando se inyectan muestras fisiológicas, la columna se encuentra mejor protegida de la obstrucción si el eluyente contiene una concentración baja del disolvente orgánico (o no contiene disolvente orgánico). Por lo tanto, se decidió implementar gradientes utilizando inicialmente una disolución de SDS 0.10 M e incrementar linealmente la cantidad de 1-propanol desde el 0 al 30% a lo largo de diferentes periodos de tiempo ($t_G = 15$ a 45 min). Los gradientes se construyeron mezclando gradualmente una disolución acuosa de SDS 0.10 M (canal A) con 1-propanol (canal B). En otras experiencias, se añadió una etapa isocrática de 2 min con SDS 0.10 M antes de iniciar el gradiente, a fin de incrementar la protección de la columna frente a las proteínas del fluido fisiológico.

El uso de una disolución micelar pura, o de una disolución híbrida de SDS conteniendo una cantidad muy baja de 1-propanol, al comienzo del gradiente, obliga a aumentar el contenido de 1-propanol en el eluyente por encima del 20% al final del gradiente. El contenido final de 1-propanol se limitó al 30% para mantener la presión del sistema por debajo de la presión máxima de funcionamiento de la bomba. A lo largo de los gradientes, la presión varió entre 100 y 250 bares, sin observarse diferencias aparentes entre los modos hidro-orgánico y micelar.

Debe hacerse notar que por encima del 22% de 1-propanol, las micelas de SDS se destruyen [32]. Por lo tanto, el comportamiento cambia al modo de HSLC. Sin embargo, en un trabajo previo del grupo investigador, se comprobó que dentro de ciertos intervalos de disolvente orgánico, puede utilizarse un único modelo de retención para describir la retención tanto en MLC como en

HSLC [7]. Con los gradientes seleccionados (0–30% de 1-propanol con o sin una etapa isocrática previa de 2 min con SDS 0.10 M), se necesitó un tiempo $t_G > 20$ min para eluir a todos los β -bloqueantes. Como se observa en las Figuras 4.3a–c, y 4.4a y b, en estas condiciones, los cromatogramas contienen un par crítico (picos 6 y 7 correspondientes a oxprenolol y labetalol), que en el modo isocrático también eluyen a tiempos próximos, pero resolviéndose hasta la línea base. Cabe señalar que al aumentar t_G (desde 25 a 45 min, Figuras 4.3a–c), el tiempo de análisis aumenta, pero la resolución del par crítico disminuye.

Se examinó también el efecto de la concentración de SDS sobre la resolución. Como se observa en las Figuras 4.4a y b, un incremento en la concentración de SDS desde 0.10 a 0.20 M en el canal A disminuyó el tiempo de análisis, pero deterioró la resolución del par crítico. Una concentración más baja de SDS mejoraría la resolución del par crítico, pero se decidió utilizar SDS 0.10 M para garantizar la protección de la columna con los monómeros del surfactante. La Figura 4.4c muestra un cromatograma obtenido con un gradiente similar en ausencia de SDS (en el modo de RPLC convencional). El perfil de elución es significativamente diferente al del modo micelar. Como se observa, acebutolol y metoprolol coeluyeron y labetalol originó un pico doble.

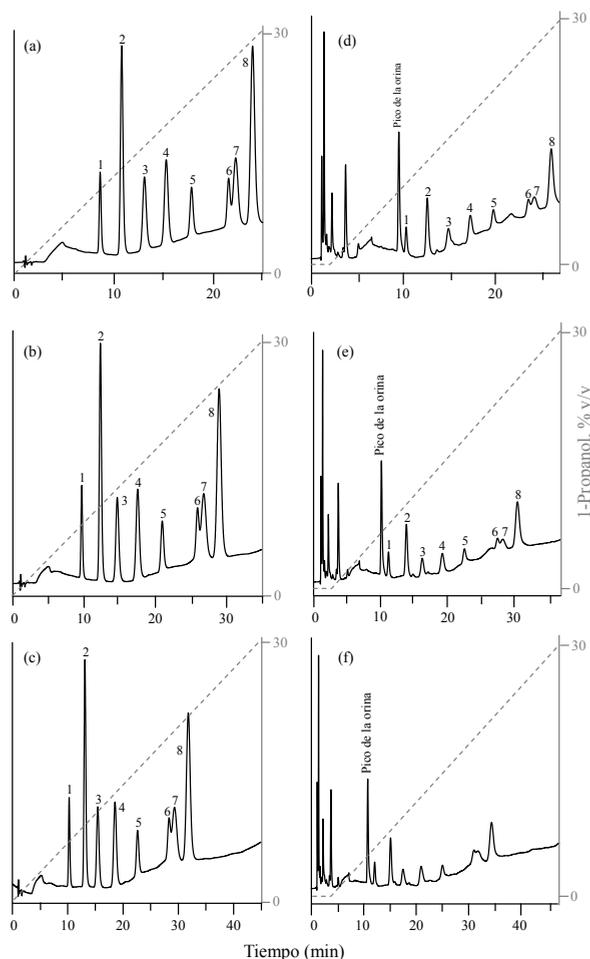


Figura 4.3. Cromatogramas obtenidos con elución en gradiente en presencia de SDS, para una mezcla acuosa de los β -bloqueantes (a–c), y una muestra de orina fortificada con los mismos compuestos (d–f). La concentración de SDS en el canal A se fijó a 0.10 M, y el contenido de 1-propanol se incrementó linealmente desde el 0 al 30% en 25 min (a y d), 35 min (b y e), y 45 min (c y f). Para la muestra fortificada, se añadió una etapa previa isocrática de 2 min con SDS 0.10 M. Los picos que aparecen a tiempos de retención inferiores al del pico marcado como "pico de la orina" (perteneciente a un compuesto endógeno) corresponden a la elución de las proteínas de la matriz y de otros compuestos endógenos. Para otros detalles, véase la Figura 4.1.

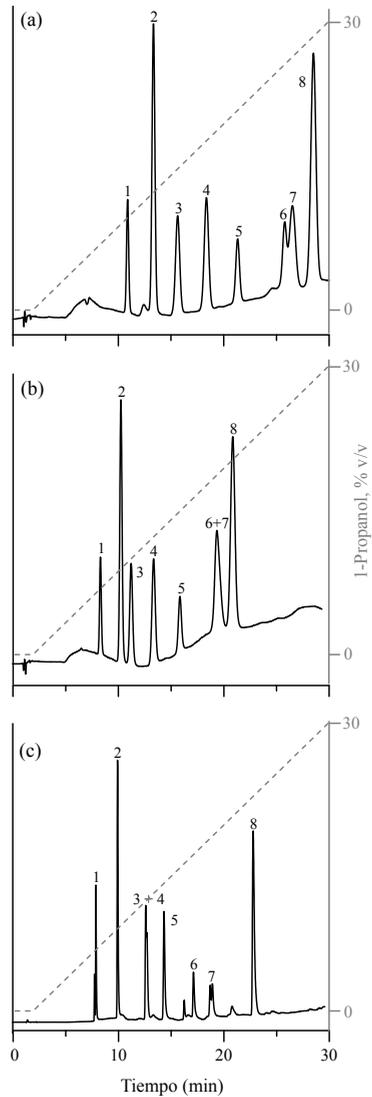


Figura 4.4. Cromatogramas obtenidos aplicando un gradiente lineal de 1-propanol desde el 0 al 30% en 30 min, tras una etapa isocrática de 2 min. El gradiente se inició con: (a) SDS 0.10 M, (b) SDS 0.20 M, y (c) ausencia de SDS. Para más detalles, véase la Figura 4.1.

4.4.3. Re-equilibrado de la columna

En la RPLC convencional, la fase estacionaria alquil-enlazada extrae una cantidad significativa del disolvente orgánico. Por lo tanto, al incrementarse la concentración del disolvente orgánico durante el gradiente, la composición de la fase enlazada puede cambiar, puesto que puede hallarse solvatada en distinta proporción [33,34]. Otros procesos no ideales que pueden ocurrir son la variación de la composición de la mezcla eluyente debido a la adsorción preferente de uno de los componentes por la fase estacionaria, y el cambio en el tiempo muerto de la columna. La regeneración incompleta de una columna tras un gradiente puede producir una gran variabilidad, entre inyecciones, en los tiempos de retención de los picos más tempranos. La columna necesita, por lo tanto, ser sometida a una etapa de re-equilibrado pasando a través de la columna algunos volúmenes del eluyente con la composición inicial, antes de realizar el siguiente gradiente. A pesar de que la separación en gradiente es más rápida, debe tenerse en cuenta que el tiempo de re-equilibrado puede ser importante, lo que incrementaría indeseablemente el tiempo de análisis total.

Debido al extenso uso en cromatografía líquida de pares iónicos de los surfactantes en concentraciones por debajo de la CMC, se han realizado numerosos estudios sobre su adsorción en las fases estacionarias de RPLC [35]. En estas condiciones, los tiempos de equilibrado son demasiado largos. Sin embargo, por encima de la CMC (condiciones micelares), la cantidad de surfactante libre en la fase móvil es aproximadamente constante, por lo que cualquier cambio en la concentración total de surfactante sólo producirá un cambio en la concentración de micelas. La construcción de isotermas de adsorción ha demostrado que, en estas condiciones, no se producen cambios en la fase estacionaria o éstos son pequeños, incluso en presencia de disolvente

orgánico [5]. Por lo tanto, es posible acelerar la elución de compuestos fuertemente retenidos mediante gradientes de surfactante. Iniciando el gradiente por encima de la CMC, no se produce adsorción adicional del surfactante sobre la fase estacionaria al incrementarse la concentración total de surfactante. Además, el surfactante no se desorberá al volver a las condiciones iniciales. La única operación necesaria, previa al siguiente análisis, es la limpieza del sistema (mezclador, inyector y columna, así como otros volúmenes pre-columnares). La capacidad de realizar gradientes en MLC apareció por primera vez en un artículo publicado por Landy y Dorsey en 1984 [19], y más tarde fue descrita con mayor detalle por Madamba-Tan *et al.* en 1994 [21]. En ambos casos, se presentó como una alternativa más rápida al uso de gradientes en RPLC convencional, debido a la reducción significativa del tiempo de re-equilibrado de las columnas tras el gradiente. En 2003, McCormick *et al.* demostraron que el re-equilibrado de la columna entre inyecciones, tras un gradiente de surfactante, es tan rápido en columnas de tamaño de poro grande como en columnas de tamaño de poro pequeño [36,37].

Sin embargo, cuando se utiliza un gradiente de disolvente orgánico en MLC, la fase estacionaria puede modificarse debido a la desorción de los monómeros de surfactante de la fase estacionaria por el disolvente orgánico [38]. Además, la CMC del surfactante en la fase móvil depende del contenido de disolvente orgánico [39], y un cambio en la CMC puede conducir a un cambio en la concentración de los monómeros de surfactante adsorbidos. Esto perturbaría el equilibrio de la columna. Sin embargo, varios autores han observado que los tiempos de re-equilibrado de la columna para gradientes de disolvente orgánico también son cortos [10,22,23]. Según Madamba-Tan *et al.*, la razón de este comportamiento es el intervalo de disolvente orgánico necesario a lo largo del gradiente, que es muy estrecho para producir un efecto

significativo sobre la composición de la fase estacionaria [22]. Por otro lado, el tiempo de re-equilibrado en la RPLC convencional tras la elución en gradiente con propanol también es corto. Este efecto fue descrito por primera vez por Cole y Dorsey, que explicaron se debe a la importante solvatación de la fase estacionaria por este disolvente [40].

Es interesante mostrar aquí una representación de algunos datos obtenidos por Madamba-Tan *et al.*, en 1994 [22] para ilustrar el corto tiempo de re-equilibrado en un procedimiento de MLC con un gradiente de disolvente orgánico, en comparación con un gradiente en RPLC convencional (Fig. 4.5a y b, respectivamente). Los autores inyectaron fenilalanina dansilada en una columna Nucleosil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm con partículas de 5 μm) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.), empleando un gradiente en el intervalo 3–15% de 2-propanol, en presencia y ausencia de SDS 0.15 M. En ese estudio, se pasaron diferentes volúmenes (hasta 20 ml) de la concentración inicial de disolvente orgánico en el gradiente a través del sistema, a un caudal de 1 mL/min. La columna puede considerarse completamente equilibrada cuando el tiempo de retención del compuesto de prueba alcanza un valor constante. Como se observa, en las experiencias de Madamba-Tan *et al.*, la señal se estabilizó tras unos 11 min para ambos modos de RPLC convencional y MLC. El primer punto en cada gráfico se obtuvo inmediatamente después de que el gradiente alcanzara su valor más alto (se utilizó un inyector manual). Dado que el tiempo de retardo (tiempo necesario para alcanzar las condiciones iniciales) fue de 3.5 min, el tiempo de re-equilibrado de la columna fue en realidad de 7.5 min.

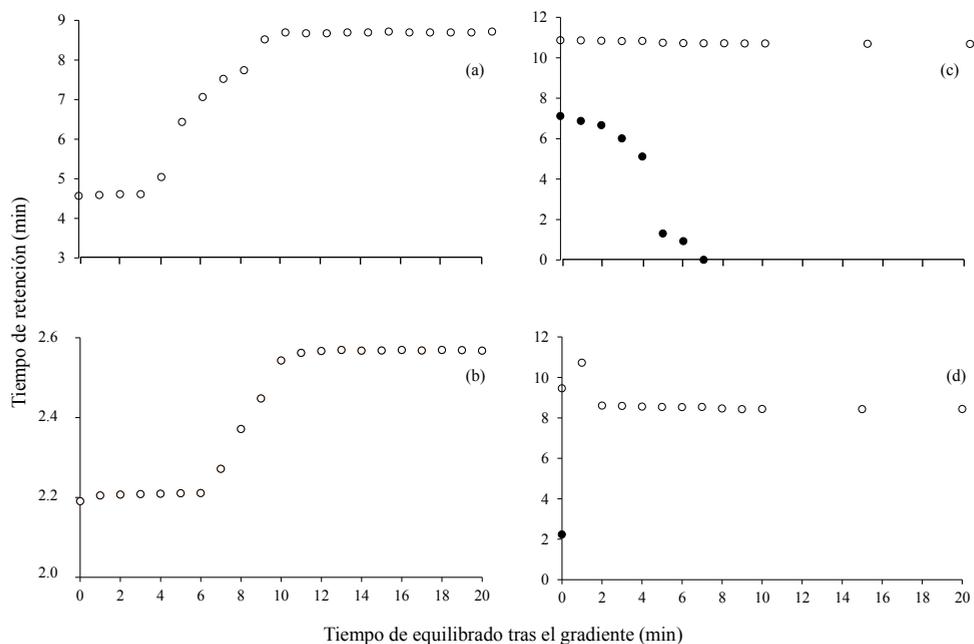


Figura 4.5. Experiencias llevadas a cabo para obtener el tiempo de re-equilibrado de la columna tras la elución en gradiente, empleando un eluyente micelar-orgánico con SDS (a y c), y un eluyente hidro-orgánico (b y d); (a y b) representan los datos publicados por Madamba-Tan *et al.* en 1994 [22], y (c y d) corresponden a datos obtenidos para este trabajo. El gradiente para (a y b) consistió en un aumento lineal de 2-propanol del 3 al 15% durante 15 min, y para (c y d), se efectuó un aumento lineal de 1-propanol del 0 al 30% en 30 min. Los gráficos corresponden a: (a, b) fenilalanina dansilada (○), y (c, d) atenolol (○) y al pico frontal en el cromatograma (●). Para más detalles, véase el texto.

En las experiencias realizadas para este trabajo, se empleó un inyector automático con una rutina de inyección que se inició justo en el momento en el que se alcanzó el valor más alto del gradiente con una duración de aproximadamente 2 min, valor que superaba el tiempo de retardo ($t_d = 0.89$ min). Es evidente que el tiempo de re-equilibrado fue significativamente más corto (menos de 2 min) respecto al indicado por Madamba Tan *et al.* hace 20 años (alrededor de 7.5 min). Para evaluar mejor este resultado, debe tenerse en cuenta que los β -bloqueantes están cargados positivamente, y en consecuencia, su retención es muy sensible a los cambios en la composición de la fase estacionaria, especialmente a la cantidad de surfactante aniónico adsorbido. Además, el gradiente se inicia en condiciones micelares puras (con una disolución de SDS 0.10 M) y progresivamente se incrementa el contenido de disolvente orgánico, lo que podría afectar significativamente a la capa de surfactante en la fase estacionaria (pero esto no parece suceder). El tiempo de re-equilibrado encontrado en nuestro laboratorio con la tecnología actual está de acuerdo con los valores publicados recientemente por Nakao *et al.* para MLC, de 1 o 2 min antes de realizar la siguiente inyección [10,28 29].

Antes de terminar este apartado, es interesante mostrar algunos cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos, entre 1 y 10 min, tras finalizar el gradiente (Figura 4.6). Se observa la señal del frente del disolvente a tiempos decrecientes, como un pico agudo. En la Figura 4.5c, se ha dibujado el momento en el que aparece esta señal como círculos rellenos. Se observó una señal similar para el modo hidro-orgánico (Figura 4.5d), pero ésta apareció siempre a un tiempo inferior a 1 min.

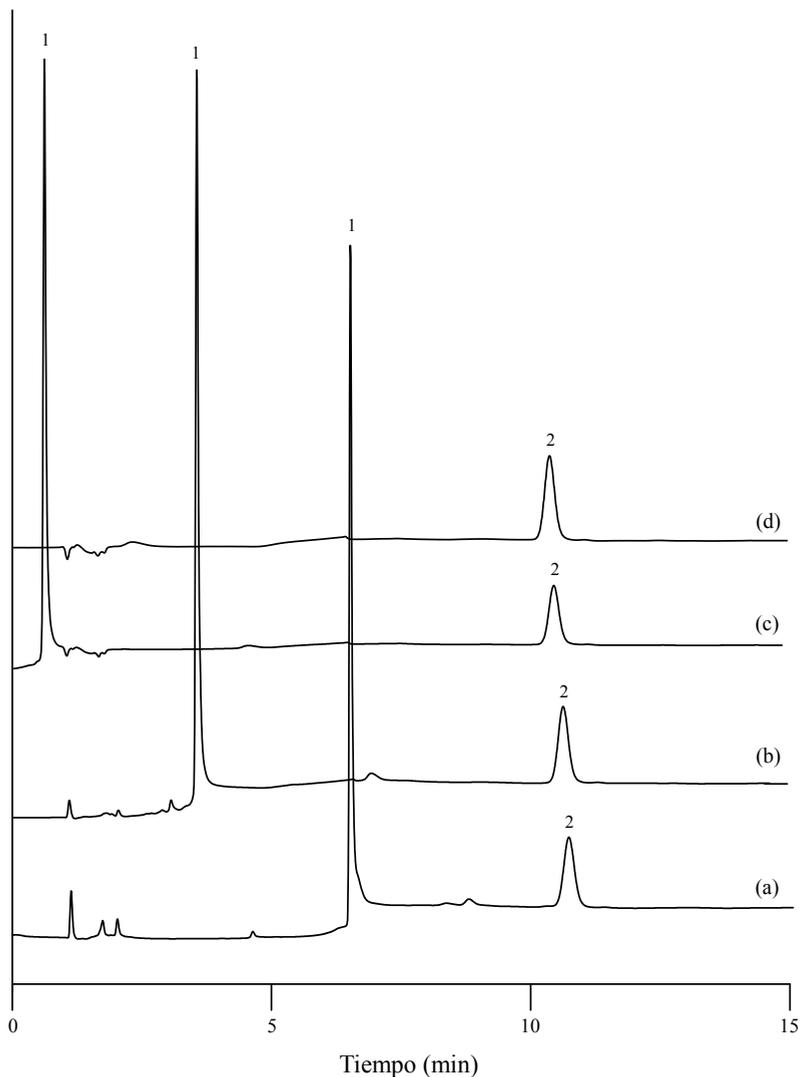


Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos para el modo micelar-orgánico con SDS/1-propanol, empleando diferentes tiempos de equilibrado tras el gradiente: (a) 1 min, (b) 5 min, (c) 8 min, y (d) 10 min. Columna: Zorbax Eclipse XDB-C₈. Gradiente: SDS 0.10 M en el canal A y aumento lineal de 1-propanol desde 0 al 30% en 30 min. Identidad de los picos: (1) Señal del frente del disolvente, y (2) atenolol.

Debe tenerse en cuenta que el gradiente de disolvente orgánico en MLC se construye mezclando volúmenes de una disolución acuosa de SDS 0.10 M (canal A) con volúmenes de 1-propanol (canal B). Concretamente, durante el gradiente, el eluyente varió en los intervalos 100–70% para A y 0–30% para B. Cuando se alcanzó el valor superior, el sistema se cambió inmediatamente a 100% de A (SDS puro), dando lugar a la señal observada del frente.

Por lo tanto, el tiempo de re-equilibrado en MLC es inmediato, pero la señal del frente del disolvente puede interferir en los cromatogramas, lo que obligaría a esperar aproximadamente 7 min antes de iniciar el siguiente gradiente. Sin embargo, en el estudio que se presenta aquí, la señal frontal no interfirió en los análisis, ya que aparece en la región anterior a la de elución de los β -bloqueantes.

4.4.4. Uso de DryLab[®] para optimizar gradientes de disolvente orgánico en MLC/HSLC con inyección directa

a) El software DryLab[®]

DryLab[®] es un paquete informático utilizado ampliamente en los laboratorios de rutina para optimizar protocolos en RPLC convencional, ya sea en el modo isocrático o en gradiente [41,42]. En un intervalo de concentración de disolvente orgánico suficientemente estrecho, la elución isocrática en RPLC se describe por la siguiente ecuación lineal:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (4.1)$$

donde k_w es el factor de retención en agua, φ la concentración del disolvente orgánico, y S la "fuerza eluyente". Se ha demostrado que esta ecuación es también válida en MLC [43,44].

La elución en gradiente es significativamente más compleja que en el modo isocrático. El comportamiento de retención en gradiente se describe mediante la denominada "ecuación fundamental para la elución en gradiente":

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \quad (4.2)$$

donde t es una variable de tiempo, t_0 es el tiempo que la fase móvil necesita para atravesar la columna (el tiempo muerto), t_g el tiempo que requiere un soluto para alcanzar la salida de la columna bajo condiciones de gradiente, y $k(\varphi(t))$ la función que relaciona el factor de retención isocrático con el contenido de disolvente orgánico, que cambia con el tiempo de acuerdo al programa de gradiente empleado. El método más simple en elución en gradiente implica un modelo de retención lineal (Ecuación (4.1)), y un programa de gradiente también lineal:

$$\varphi = \varphi_0 + m t \quad (4.3)$$

siendo m la pendiente del gradiente y φ_0 el contenido inicial del disolvente orgánico en el gradiente. En estas condiciones, la integración de la Ecuación (4.2) es simple, dando lugar al conocido "modelo de la fuerza lineal del disolvente" [45,46]:

$$t_g = \left[\frac{t_0}{b} \log 2.3 k_0 b (1-f) + 1 \right] + t_d + t_0 \quad (4.4)$$

donde k_0 es el factor de retención isocrático para la composición inicial de la fase móvil, f la fracción de la columna que el soluto ha atravesado antes de ser alcanzado por el gradiente, t_d el tiempo de retardo, y b la pendiente del gradiente, calculada como:

$$b = \frac{S t_0 \Delta\varphi}{t_G} \quad (4.5)$$

donde $\Delta\varphi$ es el cambio en la fracción de volumen del modificador orgánico durante el gradiente, y t_G el tiempo total del gradiente.

Madamba-Tan *et al.* aplicaron las Ecuaciones (4.1), (4.4) y (4.5) para predecir la retención en MLC con resultados satisfactorios [22]. El software DryLab[®] utilizado en el desarrollo de métodos empleando un gradiente en RPLC convencional está construido en base a estas ecuaciones [45,46]. DryLab[®] implementa un enfoque interpretativo, en el que el comportamiento de retención se modeliza, en primer lugar, utilizando información experimental de gradientes previos, y los tiempos de retención en otras condiciones se predicen en un dominio experimental seleccionado. Esto permite calcular la resolución para el par crítico (de acuerdo a la R_S de Snyder), y hallar la separación óptima. Además, el software proporciona información sobre los cromatogramas que se pueden obtener mediante la modificación del gradiente recomendado para gradientes lineales o multi-lineales.

b) Análisis de muestras de orina

Para controlar la ingesta de fármacos, se prefiere el análisis de orina frente a otros fluidos fisiológicos, debido a la facilidad para obtener las muestras. Como se ha comentado, en MLC, las micelas en la fase móvil solubilizan las proteínas de alto peso molecular. Mientras tanto, la fase alquil-enlazada de la columna de sílice se halla protegida por una capa constante de monómeros de surfactante. Las proteínas no son retenidas, probablemente, debido a la formación de complejos proteína-surfactante, que quedan excluidos de los poros de la fase estacionaria, apareciendo como una banda ancha en el frente

del disolvente [13,14]. La matriz también contiene compuestos endógenos con picos a diversos tiempos de retención, que pueden solapar los picos de los analitos, dando lugar a una región del cromatograma no útil. Sin embargo, con frecuencia, los analitos eluyen después de esta región, como se muestra en los cromatogramas de las Figuras 4.3d, e y f, obtenidos con un gradiente lineal de 0–30% de 1-propanol a diferentes tiempos de gradiente, $t_G = 25, 35$ y 45 min, respectivamente, tras una etapa isocrática de 2 min con SDS 0.10 M. Atenolol, que es el compuesto menos retenido en este estudio, eluyó cerca de un pico prominente que corresponde a un compuesto endógeno de la orina, cuyo tiempo de retención se ha comprobado que varía menos de un 4% considerando hombres y mujeres de diversas edades, dietas y pesos, aunque su intensidad cambia para diferentes individuos [13].

Los análisis se realizaron con 1 ml de orina fortificada con los β -bloqueantes y diluida en un factor de 1:25 con agua. Cabe destacar que la dilución de la muestra de orina ayuda a mantener operativa la columna cromatográfica durante un periodo más largo, pero en general es posible la inyección de muestras de orina sin diluir, para conseguir límites de detección lo más bajos posibles, siempre que se implemente una detección adecuada. Las disoluciones de orina se inyectaron en el cromatógrafo sin ningún otro tratamiento que la filtración directa en los viales del muestreador automático, a través de una membrana de nylon de $0.45 \mu\text{m}$. Es interesante observar que en las Figuras 4.3d–f, el contenido de 1-propanol cuando eluye el pico de la orina fue de 9.0, 7.0 y 5.8%, respectivamente.

c) Optimización del protocolo de gradiente

En esta sección, se muestra la aplicación del software DryLab[®] a la optimización de un gradiente de disolvente orgánico en MLC. Debe primero indicarse que el software requiere un conjunto de entrenamiento constituido por dos gradientes, que cubren el mismo dominio de disolvente orgánico, pero con diferentes valores de t_G . Estas experiencias permiten ajustar el modelo de retención (Ecuación (4.4)) para la aplicación.

Debemos recordar que el eluyente en MLC contiene micelas de SDS, lo que influye en la fuerza eluyente. Por lo tanto, se comprobó en primer lugar la capacidad de predicción del DryLab[®] en presencia de SDS. Para entrenar el software, se utilizaron los tiempos de retención para los cromatogramas de las Figuras 4.3a y c, correspondientes a gradientes que contenían SDS 0.10 M y un aumento lineal del contenido de 1-propanol entre el 0 y el 30% durante 25 y 45 min, respectivamente. El tiempo de retardo alimentado al software fue $t_d = 0.89$ min. A continuación, se predijeron los tiempos de retención para un valor intermedio $t_G = 35$ min (Figura 4.3b). Estos datos se compararon con los datos experimentales para las mismas condiciones (Tabla 4.2). Como se observa, los tiempos de retención predichos coincidieron satisfactoriamente con los valores experimentales obtenidos, con errores negativos pequeños máximos de hasta 0.7 min.

Se debe indicar que en estas experiencias, el gradiente lineal de disolvente orgánico se inició de inmediato. Sin embargo, el gradiente que recomendamos para el análisis de muestras de orina incluye una etapa isocrática anterior de 2 min con SDS 0.10 M, que DryLab[®] no considera. Con el fin de predecir esta situación, decidimos incrementar el valor del tiempo de retardo en el software en 2 min ($t_d = 2.89$ min). Los tiempos de retención de los gradientes de

entrenamiento se corresponden con los cromatogramas de las Figuras 4.3d y f, con $t_G = 25$ y 45 min, respectivamente. Se predijeron de nuevo los datos para $t_G = 35$ min (Figura 4.3e) y se compararon con los datos experimentales para la muestra de orina (Tabla 4.2). Las predicciones fueron de nuevo satisfactorias, con errores positivos de hasta 0.8 min.

La Figura 4.7a muestra el valor de resolución del par crítico, tal como se ilustra en el software DryLab[®]. Las líneas verticales corresponden a los dos gradientes de entrenamiento ($t_G = 25$ y 45 min), y al gradiente recomendado, que en este caso es el límite de extrapolación satisfactoria ($t_G = 18.6$ min en el caso de estudio). El cromatograma que se muestra en la Figura 4.7b corresponde a la predicción dada por el software para este límite. El tiempo de retardo de nuevo se fijó en $t_d = 2.89$ min. Obsérvese que se predice que los picos de oxprenolol y labetolol aparecen resueltos.

A continuación, se consideró la posibilidad de modificar el gradiente recomendado para obtener una mejor resolución y/o un menor tiempo de análisis. Para ello, se modificó el tiempo de gradiente sucesivamente a $t_G = 15$, 13 y 11 min, manteniendo el tiempo de retardo a $t_d = 2.89$ min, y se analizaron los cromatogramas predichos. También se examinó un gradiente con $t_G = 15$ min y $t_d = 7.89$ min, correspondiente a una etapa isocrática de 7 min con SDS 0.10 M previamente al inicio del gradiente de disolvente orgánico.

Tabla 4.2. Tiempos de retención (min) experimentales y predichos, obtenidos con DryLab[®] para un gradiente que utiliza SDS 0.10 M, e incrementa linealmente el 1-propanol entre el 0 y el 30% en 35 min. Los resultados corresponden a una mezcla acuosa de estándares y a una muestra de orina fortificada con estándares. Para la muestra de orina fortificada, una etapa isocrática de 2 min precedía al gradiente.

Identidad	Estándares ^a		Orina + estándares ^b	
	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho
Pico de la orina	–	–	10.16	10.28
Atenolol	9.67	9.52	11.21	11.41
Carteolol	12.29	12.06	13.89	14.18
Acebutolol	14.66	14.42	16.27	16.55
Metoprolol	17.52	17.12	19.27	19.62
Celiprolol	20.97	20.47	22.58	23.09
Oxprenolol	25.92	25.25	27.53	28.27
Labetolol	26.79	26.11	28.32	29.00
Propranolol	28.95	28.23	30.50	31.30

^a Se introdujo el tiempo de retardo real (0.89 min) en DryLab[®].

^b Se tomó como tiempo de retardo la suma del tiempo de retardo real y la etapa isocrática (en total: 2.89 min).

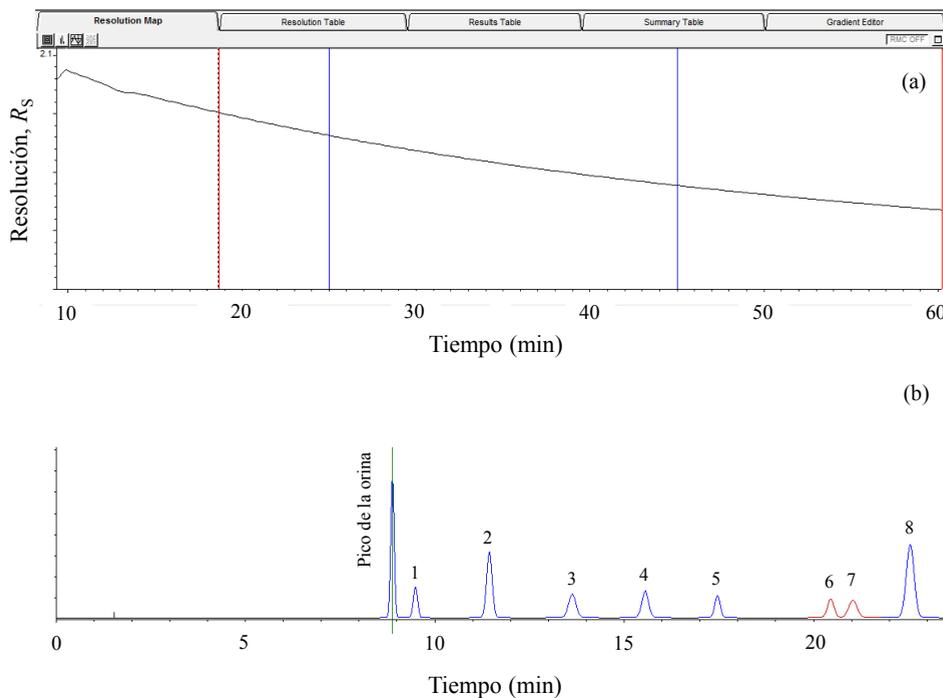


Figura 4.7. Optimización de la separación en gradiente de los β -bloqueantes en una muestra de orina, asistida por DryLab[®]: (a) Mapa de resolución, y (b) cromatograma recomendado. Para conocer la identidad de la columna y de los picos, véase la Figura 4.1. Las líneas verticales corresponden a los gradientes de entrenamiento ($t_G = 25$ y 45 min), y a la separación recomendada (18.6 min).

Tabla 4.3. Tiempos de retención (min) experimentales y predichos, obtenidos con DryLab® para un gradiente que utiliza SDS 0.10 M, e incrementa linealmente el 1-propanol entre el 0 y el 30% en 15 min (Experiencias 1 y 4), 13 min (Experiencia 2), y 11 min (Experiencia 3), tras una etapa isocrática de 2 min (Experiencias 1 a 3), y 7 min (Experiencia 4). Los resultados corresponden a una muestra de orina fortificada con estándares.^a

Identidad	Experiencia 1		Experiencia 2		Experiencia 3		Experiencia 4	
	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho
Pico de la orina	8.36	8.44	8.04	8.16	7.73	7.85	11.53	9.96
Atenolol	8.80	8.92	8.40	8.57	8.00	8.19	12.26	10.78
Carteolol	10.52	10.66	9.97	10.17	9.45	9.63	13.69	11.57
Acebutolol	12.45	12.72	11.78	12.15	11.07	11.50	15.07	13.26
Metoprolol	13.78	14.36	12.88	13.82	11.93	12.78	16.15	14.94
Celiprolol	15.07	15.92	13.99	14.97	12.87	13.93	17.06	16.57
Oxprenolol	17.23	18.41	15.90	17.17	14.60	15.86	18.84	19.11
Labetolol	17.58	18.94	16.25	17.67	14.96	16.37	19.07	19.62
Propranolol	19.16	20.30	17.93	19.06	16.70	17.80	20.90	20.93

^a Se tomó como tiempo de retardo la suma del tiempo de retardo real y la etapa isocrática: 2.89 min para las Experiencias de 1 a 3, y 7.89 min para la Experiencia 4.

La Tabla 4.3 compara los tiempos de retención predichos en estas condiciones, con los valores experimentales. Los errores sistemáticos más elevados se obtuvieron para el gradiente que incluye la etapa isocrática más larga (7 min), con errores negativos de hasta 2 min para los compuestos menos retenidos, y positivos de hasta 0.5 min para los más retenidos. Por lo tanto, en estas condiciones, la actuación del SDS como eluyente disminuye significativamente la exactitud de las predicciones.

La Figura 4.8 compara el cromatograma experimental con el predicho por DryLab[®] para el gradiente lineal de 0–30% de 1-propanol y $t_G = 15$ min, tras una etapa isocrática de 2 min con SDS 0.10 M. La concordancia entre ambos es satisfactoria, aunque los picos experimentales son más anchos, lo que produce un mayor solapamiento de los picos de oxprenolol y labetolol, respecto al cromatograma predicho.

4.5. Conclusiones

El comportamiento particular en MLC hace a menudo innecesaria la elución en gradiente. A pesar de ello, es sorprendente que entre los cientos de procedimientos analíticos publicados en MLC, en los que se determinan diferentes tipos de compuestos en una gran variedad de muestras, sólo muy pocos hagan uso de elución en gradiente. Este modo de elución puede ser útil para disminuir el tiempo de análisis en la determinación de mezclas de compuestos que muestren un amplia variedad de polaridades, y como han demostrado recientemente Nakao *et al.* [10,28,29], puede beneficiar el análisis de muestras fisiológicas, especialmente en el caso de la aplicación a compuestos moderadamente polares o apolares.

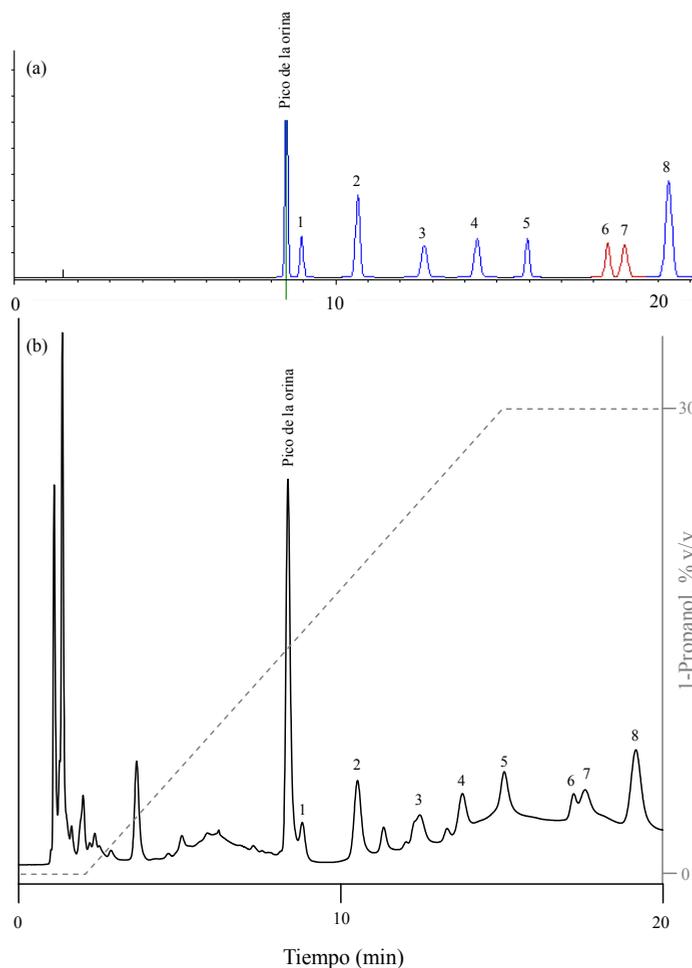


Figura 4.8. Cromatograma predicho por DryLab® (a), y cromatograma experimental (b), para una muestra de orina enriquecida con los β -bloqueantes, en las condiciones de separación seleccionadas. Gradiente: SDS 0.10 M en el canal A y aumento lineal de 1-propanol en el intervalo 0–30% en 15 min, tras una etapa isocrática de 2 min con SDS 0.10 M, y seguido de una etapa isocrática con SDS 0.07 M / 30% de 1-propanol a partir de los 15 min. Para conocer la identidad de la columna y de los picos, véase la Figura 4.1.

El uso inicial de un eluyente micelar con un bajo contenido en disolvente orgánico, o simplemente una disolución micelar pura (sin disolvente orgánico), que sería insuficiente para eluir analitos moderadamente polares o apolares en el modo isocrático, proporciona una mejor protección de la columna frente a las proteínas de los fluidos fisiológicos. Una vez que las proteínas son eliminadas de la columna, la fuerza eluyente se puede incrementar utilizando un gradiente lineal positivo de disolvente orgánico.

Este trabajo tiene como objetivo mostrar que la implementación de un gradiente en MLC es sencilla y permite desarrollar procedimientos rápidos sin la necesidad de realizar un tratamiento previo de las muestras, o el re-equilibrado de la columna. Además, en el caso de utilizar un gradiente de disolvente orgánico, a pesar de la presencia del surfactante, la optimización de las condiciones de separación puede llevarse a cabo, satisfactoriamente, con el software de optimización comercial DryLab[®], que no había sido utilizado previamente en MLC. Por lo tanto, los analistas ciertamente deberían considerar la posibilidad de utilizar elución en gradiente en MLC.

La selectividad de la separación en MLC es bastante distinta con respecto a la RPLC convencional, debido a la variedad de interacciones entre los solutos, las micelas y los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria, lo que da lugar a una técnica altamente versátil, adecuada para una amplia variedad de solutos (desde hidrofílicos a hidrofóbicos). El uso de eluyentes híbridos en MLC posee la ventaja de utilizar cantidades significativamente más bajas de disolvente orgánico respecto a la RPLC convencional, especialmente para los compuestos apolares, incluso cuando se utiliza un procedimiento de HSLC para el que la cantidad de disolvente orgánico es algo mayor. Esto se traduce en un menor costo, menor toxicidad y

menor impacto ambiental al disminuir la cantidad de residuos contaminantes. Además, la estabilización de los disolventes orgánicos por las micelas presentes en la fase móvil reduce el riesgo de evaporación. Estas propiedades son atractivas teniendo en cuenta la restricción creciente del uso de disolventes orgánicos en los laboratorios.

4.6. Referencias

- [1] D.W. Armstrong, S.J. Henry, *Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons via HPLC*, J. Liq. Chromatogr. 3 B(1980) 657–662.
- [2] A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Separation Science Series (editada por J. Cazes), Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [3] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *New insights and recent developments in micellar liquid chromatography*, Sep. Purif. Rev. 38 (2009) 45–96.
- [4] B.K. Lavine, S. Hendayana, *Band broadening in micellar liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 19 (1996) 101–123.
- [5] A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Micellar liquid chromatography: Adsorption isotherms of two ionic surfactants on five stationary phases*, Anal. Chem. 58 (1986) 1356–1358.
- [6] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar-organic versus aqueous-organic mobile phases for the screening of β -blockers*, Anal. Chim. Acta 454 (2002) 109–123.
- [7] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Performance of short-chain alcohols versus acetonitrile in the surfactant-mediated reversed-phase liquid chromatographic separation of β -blockers*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7090–7099.

- [8] J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray, J.S. Landy, *Efficiency enhancement in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 55 (1983) 924–928.
- [9] X. Li, S. Fritz, *Novel additives for the separation of organic compounds by high performance liquid-chromatography*, J. Chromatogr. A 728 (1996) 235–247.
- [10] R. Nakao, M. Schou, C. Halldin, *Direct plasma metabolite analysis of positron emission tomography radioligands by micellar liquid chromatography with radiometric detection*, Anal. Chem. 84 (2012) 3222–3230.
- [11] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *High submicellar liquid chromatography*, Sep. Purif. Rev. 43 (2014) 124–154.
- [12] L.J. Cline-Love, J.J. Fett, *Optimization of selectivity in micellar chromatographic procedures for the determination of drugs in urine by direct injection*, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 323–333.
- [13] E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographic monitoring of diuretics in urine samples using a sodium dodecyl sulphate-propanol micellar eluent*, Quim. Anal. 12 (1993) 167–172.
- [14] M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Direct injection of physiological fluids in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. B 736 (1999) 1–18.
- [15] J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, *Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes*, J. Chromatogr. A 656 (1993) 485–499.
- [16] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2^a ed., Wiley, Nueva York, 1997.
- [17] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, *Quantitation of hydrophobicity in micellar liquid chromatography*, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 533–543.

-
- [18] M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography: Suitable technique for screening analysis*, J. Chromatogr. A 947 (2002) 31–45.
- [19] J.S. Landy, J.G. Dorsey, *Rapid gradient capabilities of micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. Sci. 22 (1984) 68–70.
- [20] J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, J.S. Landy, J.L. Lin, *Gradient elution micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. 316 (1984) 183–191.
- [21] L.S. Madamba-Tan, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *Gradient elution in micellar liquid chromatography I. Micelle concentration gradient*, J. Chromatogr. A 683 (1994) 321–334.
- [22] L.S. Madamba, J.K. Strasters, M.G. Khaledi. *Gradient elution in micellar liquid chromatography. II. Organic modifier gradients*, J. Chromatogr. A 683 (1994) 335–345.
- [23] E.K. Paleologos, S.D. Chytiri, I.N. Savvaidis, M.G. Kontominas, *Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation*, J. Chromatogr. A 1010 (2003) 217–224.
- [24] E.K. Paleologos, M.G. Kontominas, *On-line solid-phase extraction with surfactant accelerated on column derivatization and micellar liquid chromatographic separation as a tool for the determination of biogenic amines in various food substrates*, Anal. Chem. 76 (2004) 1289–1294.
- [25] A.R. Ghorbani, F. Momenbeik, J.H. Khorasani, M.K. Amini, *Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of seven water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex*, Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 439–444.
- [26] S.M. Bryant, K.D. Altria, *An initial assessment of the use of gradient elution in microemulsion and micellar liquid chromatography*, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1498–1502.
- [27] J. Cao, H. Qu, Y. Cheng, *Micellar and aqueous-organic liquid chromatography using sub-2 μm packings for fast separation of natural phenolic compounds*, J. Sep. Sci. 33 (2010) 1946–1953.
-

- [28] R. Nakao, M. Schou, C. Halldin, *Rapid metabolite analysis of positron emission tomography radioligands by direct plasma injection combining micellar cleanup with high submicellar liquid chromatography with radiometric detection*, J. Chromatogr. A 1266 (2012) 76–83.
- [29] R. Nakao, C. Halldin, *Improved radiometabolite analysis procedure for positron emission tomography (PET) radioligands using a monolithic column coupled with direct injection micellar/high submicellar liquid chromatography*, Talanta 113 (2013) 130–134.
- [30] C.J. Drayton (editor), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [31] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, D.L. Massart, *Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of β -blocking agents by micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 912 (2001) 211–221.
- [32] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Effect of short-chain alcohols on surfactant-mediated reversed-phase liquid chromatographic systems*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7082–7089.
- [33] R.M. McCormick, B.L. Karger, *Role of organic modifier sorption on retention phenomena in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. 199 (1980) 259–273.
- [34] R.M. McCormick, B.L. Karger, *Distribution phenomena of mobile-phase components and determination of dead volume in reversed-phase liquid chromatography*, Anal. Chem. 52 (1980) 2249–2257.
- [35] R.P.W. Scott, P. Kucera, *Some aspects of ion-exchange chromatography employing adsorbed ion exchangers on reversed-phase columns*, J. Chromatogr. 175 (1979) 51–63.
- [36] T.J. McCormick, J.P. Foley, Ch.M. Riley, D.K. Lloyd, *The effect of stationary-phase pore size on retention behavior in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 72 (2000) 294–301.

-
- [37] T.J. McCormick, J.P. Foley, D.K. Lloyd, *Chromatographic performance of large-pore versus small-pore columns in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. B 785 (2003) 1–20.
- [38] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, W.C. Hamlin, *Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 61 (1989) 1353–1358.
- [39] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Influence of the addition of modifiers on solute-micelle interaction in hybrid micellar liquid chromatography*, Chromatographia 48 (1998) 655–663.
- [40] L.A. Cole, J.G. Dorsey, *Reduction of reequilibration time following gradient elution reversed-phase liquid chromatography*, Anal. Chem. 62 (1990) 16–21.
- [41] L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: I. Isocratic elution*, J. Chromatogr. 485 (1989) 65–89.
- [42] L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: II. Gradient elution*, J. Chromatogr. 485 (1989) 91–112.
- [43] M.G. Khaledi, E. Peuler, J. Ngeh-Ngwainbi, *Retention behavior of homologous series in reversed-phase liquid chromatography using micellar*, Anal. Chem. 59 (1987) 2738–2747.
- [44] A.S. Kord, M.G. Khaledi, *Selectivity of organic solvents in micellar liquid chromatography of amino acids and peptides*, J. Chromatogr. 631 (1993) 125–132.
- [45] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems*, J. Chromatogr. 165 (1979) 3–30.
- [46] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
-

CAPÍTULO 5

**ADSORCIÓN DEL SURFACTANTE ANIÓNICO
DODECILSULFATO SÓDICO SOBRE UNA FASE
ESTACIONARIA C₁₈ BAJO CONDICIONES MICELARES Y
SUBMICELARES EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FASE
INVERSA**

5.1. Summary

Micellar liquid chromatography (MLC) makes use of aqueous solutions or aqueous-organic solutions containing a surfactant, at a concentration above its critical micelle concentration. In the mobile phase, the surfactant monomers aggregate to form micelles, whereas on the surface of the non-polar alkyl-bonded stationary phases they are significantly adsorbed. If the mobile phase contains a high concentration of organic solvent, micelles breakdown and the amount of surfactant adsorbed on the stationary phase is reduced, giving rise to another chromatographic mode named high submicellar liquid chromatography (HSLC). The presence of a thinner coating of surfactant enhances the selectivity and peak shape, especially for basic compounds. However, the risk of full desorption of surfactant is the main limitation in the HSLC mode. This study examines the adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) under micellar (MLC) and high submicellar (HSLC) conditions on a C₁₈ column, applying two methods. One of them uses a refractive index detector to obtain direct measurements of the adsorbed amount of SDS, whereas the second method is based on the retention and peak shape for a set of cationic basic compounds to indirectly reveal the presence of adsorbed monomers of surfactant on the stationary phase.

5.2. Introducción

La adición de un surfactante a una fase móvil acuo-orgánica en cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), por encima de la concentración micelar crítica (CMC), da lugar a un modo cromatográfico particular, con un comportamiento significativamente distinto en el análisis de compuestos de diversa naturaleza [1–3]. Entre varias opciones, el surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) es, con diferencia, el más comúnmente utilizado para este fin [1,2]. El SDS se adsorbe apreciablemente sobre la superficie de las fases estacionarias apolares alquil-enlazadas, que como consecuencia muestran una carga neta negativa capaz de actuar como un intercambiador iónico dinámico para solutos catiónicos. Mientras tanto, en la fase móvil, los monómeros de surfactante se agregan para formar micelas. Esta última característica es la razón del nombre que se da a este modo cromatográfico: cromatografía líquida micelar (MLC). Sin embargo, debe señalarse que los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria poseen un papel destacado en el comportamiento cromatográfico observado.

Es bien conocido que las fases móviles micelares en ausencia de disolvente orgánico son demasiado débiles y producen formas de pico deficientes, en relación a los picos obtenidos con fases móviles acuo-orgánicas convencionales [4]. Por ello, en el inicio del desarrollo de la MLC se sugirió la adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico a la fase móvil, a fin de mejorar su fuerza eluyente, así como la eficacia de la columna [5]. Dicha mejora se debe a que las moléculas de disolvente orgánico y los monómeros de surfactante compiten por los sitios activos. Ello reduce la cantidad de surfactante adsorbido

sobre la fase estacionaria en una magnitud que depende de la relación disolvente orgánico/surfactante [6].

La concentración de disolvente orgánico debe controlarse para preservar la integridad de las micelas. Cuando la concentración de disolvente orgánico es elevada, las micelas se desagregan [7]. Ello cambia el comportamiento, dando lugar a un nuevo modo cromatográfico que fue reseñado por primera vez por Li y Fritz [8], y que ha sido explorado recientemente bajo el nombre de cromatografía líquida submicellar (high submicellar liquid chromatography, HSLC) [9,10]. La HSLC ofrece algunas ventajas atractivas respecto a la MLC o RPLC en términos de menor tiempo de análisis, mayor selectividad y mejora de la forma de los picos cromatográficos, especialmente en el análisis de solutos básicos catiónicos [9–14].

Cuando se trabaja en el modo de HSLC, existe la preocupación de que se produzca la desorción completa del surfactante al añadir grandes cantidades de disolvente orgánico, lo que acercaría este modo cromatográfico a la RPLC acuo-orgánica. Se ha encontrado que cantidades moderadas de diversos alcoholes añadidos a las fases móviles micelares de SDS son capaces de reducir significativamente la cantidad de surfactante adsorbido, con una clara tendencia que depende del peso molecular del alcohol [15]. También se ha indicado que la cantidad adsorbida de SDS tras la adición de diversos disolventes orgánicos, incluyendo metanol y 1-propanol, es lineal [16]. De acuerdo a Li y Fritz, que investigaron el efecto de varios surfactantes no iónicos e iónicos en presencia de un 60% v/v de acetonitrilo [12], no quedan restos del surfactante adsorbido bajo estas condiciones. Estos autores llegaron a esta conclusión observando que no se producía una pérdida del surfactante en la disolución, y que no se requería el re-equilibrado de la columna para obtener una línea base estable. Sin

embargo, recientemente se ha observado que el tiempo de re-equilibrado de una columna en presencia de SDS, utilizando un gradiente lineal de 1-propanol del 0 al 30% v/v durante 30 min es inferior a 2 min, mientras que en ausencia de SDS es significativamente mayor [17], comportamiento que también ha sido observado por otros autores [14,18,19]. Por lo tanto, el corto tiempo de equilibrado significa más bien que la columna se halla aún cubierta por el surfactante.

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, que examinaba la interacción de un grupo de solutos básicos catiónicos con los silanoles libres de la fase estacionaria, se observó la adsorción del SDS sobre una columna C₁₈, en presencia de hasta el 50% v/v de acetonitrilo [9]. El aumento en la retención y la mejora en la forma de los picos se explica por la interacción de los solutos catiónicos con el SDS (aniónico), lo que confirma el recubrimiento de la fase estacionaria por este surfactante. Los largos tiempos de retención y las altas eficacias encontradas para un conjunto de compuestos básicos con una columna Kromasil C₁₈, en un estudio similar llevado a cabo con fases móviles que contenían SDS y cantidades elevadas de diferentes alcoholes, también pusieron de manifiesto que una cantidad significativa de surfactante recubre la fase estacionaria [20].

Este trabajo examina la adsorción del SDS sobre una fase estacionaria C₁₈, bajo condiciones micelares y submicelares, utilizando dos métodos distintos. Uno de ellos implica la medida directa de la cantidad adsorbida del surfactante mediante un detector de índice de refracción, que se utiliza convencionalmente para controlar la adsorción de aditivos en la fase móvil. El segundo método revela la presencia de los monómeros de surfactante adsorbidos en la fase

estacionaria, en base a los tiempos de retención y a la forma de los picos cromatográficos, para un conjunto de solutos básicos catiónicos.

5.3. Parte experimental

5.3.1. Reactivos

Se hizo uso de un conjunto de ocho β -bloqueantes: atenolol, pindolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), celiprolol (Rhône Poulenc Rorer, Alcorcón, Madrid), esmolol (Du Pont-de Nermours, Le Grand Saconnex, Suiza), y nadolol (Squibb, Esplugues de Llobregat, Barcelona). Se prepararon disoluciones madre de 100 $\mu\text{g/mL}$, disolviendo los compuestos en unos pocos mililitros de acetonitrilo (Scharlab, Barcelona) con la ayuda de un baño de ultrasonidos (Elmasonic, Singen, Alemania), y posterior dilución con agua nanopura, obtenida con un sistema de purificación de agua ultrapura Barnstead (Sybron, Boston, MA, EE.UU.). La concentración de las disoluciones inyectadas fue de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Las fases móviles se prepararon con acetonitrilo y docedilsulfato sódico (99% de pureza, Merck, Darmstadt, Alemania). También se utilizaron mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia del surfactante. En todos los casos, las fases móviles se tamponaron a pH 3 con dihidrógenofosfato sódico anhidro 0.01 M (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).

5.3.2. Instrumentación y columna

Se utilizó un sistema cromatográfico de Agilent (Waldbronn, Alemania), que constaba de los siguientes módulos: bomba cuaternaria (HP 1100), inyector automático con viales de 2 mL (HP 1260 Infinity), compartimento de

columna termostático (HP 1260 Infinity) en el que se fijó la temperatura a 25°C, y detector UV-visible (HP 1100) ajustado a 225 nm para monitorizar los β -bloqueantes. También se utilizó un detector de índice de refracción (HP 1260 Infinity), que poseía dos celdas: la celda de referencia y la celda de la muestra. En este trabajo, a través de la celda de referencia se hizo pasar una fase móvil acu-orgánica, y a través de la celda de la muestra, se bombeó la fase móvil micelar-orgánica.

El sistema se controló mediante una HPChemStation (Agilent B.03.02). El tratamiento matemático se realizó con Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, EE.UU.). Los tiempos de retención y las semianchuras de los picos se midieron con el software MICHROM, construido en nuestro laboratorio [21].

Se empleó una columna Kromasil C₁₈ encapsada (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula) de Análisis Vínicos (Ciudad Real), con las siguientes características: tamaño de poro de 10 nm, área superficial de 340 m²/g y ~20% de contenido de carbono, lo que se corresponde con una densidad de enlace de aproximadamente 3.1 μ mol/m². El caudal de fase móvil fue de 1 mL/min para el análisis de los β -bloqueantes, y 0.5 mL/min para las experiencias de adsorción. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

5.3.3. Metodología empleada en los estudios de adsorción utilizando cromatografía frontal

Cuando se añade el surfactante a la fase móvil por encima de su CMC, la cantidad de surfactante adsorbido sobre una fase estacionaria de RPLC se incrementa rápidamente hasta alcanzar la estabilidad [22,23]. En este trabajo, se

estimó la cantidad de SDS adsorbido sobre la fase estacionaria utilizando cromatografía frontal [24]. Este método consiste en la monitorización del cambio en la señal del detector cuando se hace pasar continuamente una concentración constante de un aditivo a través de la columna. El volumen de retención medido a partir del punto de inflexión de la curva de adsorción (Figura 5.1), tras la corrección del volumen muerto, permite determinar la cantidad de aditivo adsorbido sobre la fase estacionaria (Q), a una concentración determinada de aditivo en la fase móvil. Esta cantidad puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$Q_f = V_S (q_f - q_i) = (V_{R,f} - V_0) (C_f - C_i) \quad (5.1)$$

donde q_i y q_f son las concentraciones inicial y final del aditivo adsorbido sobre la fase estacionaria, respectivamente, y C_i y C_f sus concentraciones inicial y final en la fase móvil, respectivamente; V_S es el volumen de aditivo adsorbido sobre la columna, V_0 el volumen muerto, y $V_{R,f}$ el volumen de retención medido a partir del punto de inflexión de la curva de adsorción.

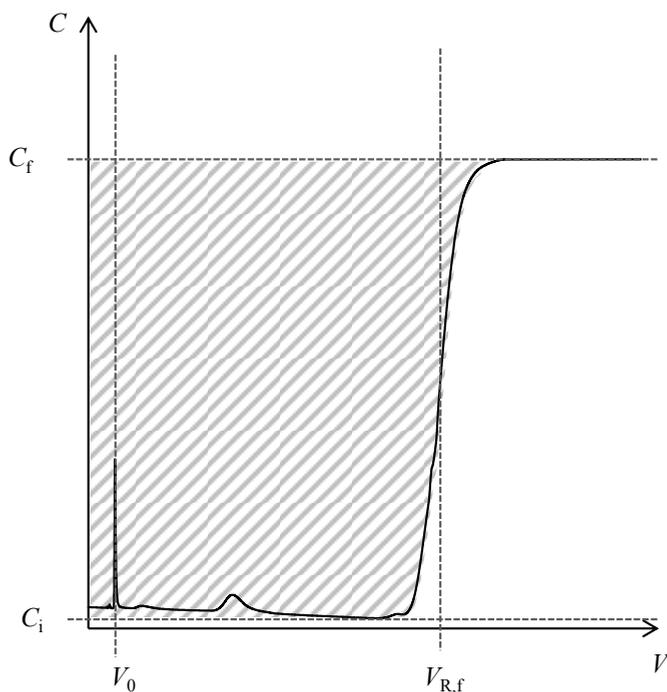


Figura 5.1. Curva cromatográfica de adsorción. La zona interior indica la cantidad adsorbida de un compuesto hipotético.

En este trabajo, se partió de una situación en la que el aditivo no estaba adsorbido sobre la fase estacionaria ($q_i = 0$). En las distintas experiencias realizadas, se estimó que $V_0 = 1.9$ mL, lo que se corresponde con la señal del pico positivo o negativo observado a 3.8 min en todos los cromatogramas frontales.

El sistema cromatográfico se equilibró, en primer lugar, con una fase móvil de acetonitrilo-agua en ausencia de SDS, que como se ha comentado, también se utilizó para rellenar la celda de referencia del detector de índice de refracción. Inicialmente, se bombeó la fase móvil acuo-orgánica durante 10 min, hasta alcanzar un valor de línea base próximo a cero. A continuación,

se hizo pasar a través de la columna una fase móvil que contenía la misma cantidad de acetonitrilo y el tensioactivo SDS en una concentración 0.075 M. Una vez obtenida la curva de adsorción, el sistema cromatográfico se limpió siguiendo el protocolo habitual en MLC para desorber un surfactante [25], antes de llevar a cabo la siguiente experiencia con otra concentración de acetonitrilo.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Desorción del surfactante de la fase estacionaria

Para lograr medidas cromatográficas fiables cuando se emplean modos cromatográficos que utilizan surfactantes (u otros aditivos), es necesario lograr la desorción total de los monómeros de surfactante de la superficie de la fase estacionaria, antes de cambiar la naturaleza de la fase móvil, a fin de recuperar las condiciones originales de la columna. Por esta razón, se estudió en primer lugar el carácter reversible/irreversible de la adsorción del SDS sobre la columna seleccionada (Kromasil C₁₈).

El procedimiento consistió en la comparación de los tiempos de retención de ocho β -bloqueantes con una fase móvil conteniendo un 15% v/v de acetonitrilo, antes y después de utilizar otra fase móvil con la misma concentración de acetonitrilo y concentraciones variables de SDS.

La Figura 5.2 ilustra los cromatogramas obtenidos para el acebutolol y celiprolol empleando SDS 0.075 M, y en la Tabla 5.1 se muestran los tiempos de retención, semianchuras y factores de asimetría (B/A) para los ocho β -bloqueantes. Como se observa, las diferencias en los parámetros cromatográficos obtenidos con un 15% v/v de acetonitrilo, antes y después de eluir con la fase móvil micelar de SDS, se encuentran dentro de la variabilidad de las medidas.

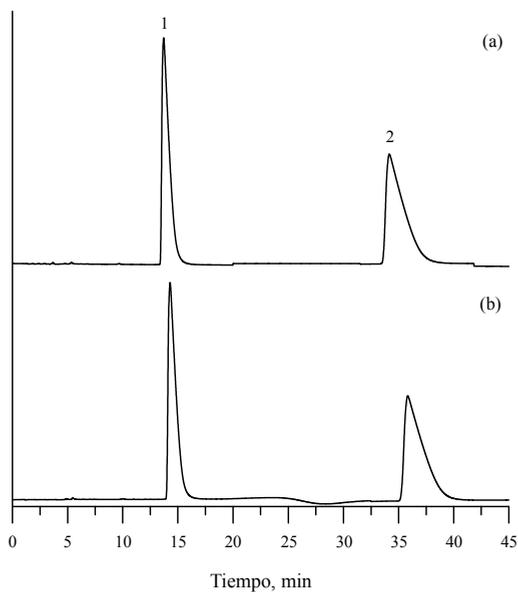


Figura 5.2. Cromatogramas de una mezcla de acebutolol (1) y celiprolol (2) eluidos con una fase móvil conteniendo un 15% v/v de acetonitrilo, antes (a) y después (b) de bombear a través de la columna otra fase móvil que además contenía SDS 0.075 M.

Tabla 5.1. Tiempos de retención, semianchuras y factores de asimetría (B/A) para ocho β -bloqueantes eluidos con una fase móvil conteniendo un 15% v/v de acetonitrilo, antes y después de bombear a través de la columna una fase móvil con la misma concentración de acetonitrilo y concentraciones variables de SDS.^a

Compuestos	Antes de utilizar el SDS				Tras regenerar la columna			
	t_R (min)	A	B	B/A	t_R (min)	A	B	B/A
Atenolol	2.30	0.18	0.54	2.92	2.30	0.18	0.62	3.39
Carteolol	4.48	0.13	0.39	3.04	4.62	0.14	0.42	2.96
Nadolol	5.11	0.14	0.43	3.08	5.29	0.15	0.45	2.98
Esmolol	28.14	0.45	2.72	6.04	30.14	0.46	2.07	4.52
Acebutolol	13.74	0.32	1.17	3.66	14.30	0.32	1.20	3.76
Timolol	13.39	0.27	1.11	4.09	13.90	0.31	1.03	3.34
Celiprolol	34.21	0.56	2.91	5.18	35.96	0.71	3.05	4.26
Pindolol	7.01	0.17	0.5	3.12	7.15	0.18	0.56	3.10

^a A y B son los valores de las semianchuras izquierda y derecha, respectivamente.

5.4.2. Medida de la cantidad de SDS adsorbido bajo condiciones micelares y submicelares empleando el método de cromatografía frontal

El objetivo de este estudio fue determinar cómo se ve afectada la cantidad de SDS adsorbido sobre una columna Kromasil C₁₈, al incrementarse la concentración de acetonitrilo en la fase móvil, hasta alcanzar condiciones submicelares (en las que las micelas no pueden formarse), que tiene lugar a concentraciones de acetonitrilo por encima del 30% v/v [9]. Para este estudio, se exploraron nueve fases móviles con concentraciones de acetonitrilo en el intervalo 5–60% v/v, utilizando una concentración fija de SDS (0.075 M). En general, con las fases móviles micelares acuosas (es decir, en ausencia de cualquier disolvente orgánico), la cantidad de SDS adsorbido sobre la fase estacionaria de base sílice de diferente naturaleza es independiente de la concentración de SDS, cuando ésta se halla por encima o próxima a la CMC. En contraste, en presencia de un disolvente orgánico, la cantidad de surfactante adsorbido puede seguir aumentando al incrementarse la concentración del disolvente orgánico en la fase móvil [15].

La Figura 5.3 muestra los cromatogramas obtenidos con el método de cromatografía frontal, utilizando fases móviles que contenían SDS 0.075 M cubriendo la región micelar y submicelar con concentraciones de acetonitrilo en el intervalo 5–50% v/v. Cabe destacar que tras alcanzar el punto de inflexión de las curvas de adsorción, la respuesta del detector se mantuvo estable durante un período muy corto de tiempo, adquiriendo rápidamente un estado de desequilibrio debido a la saturación del detector (la corta señal vertical a los tiempos mayores).

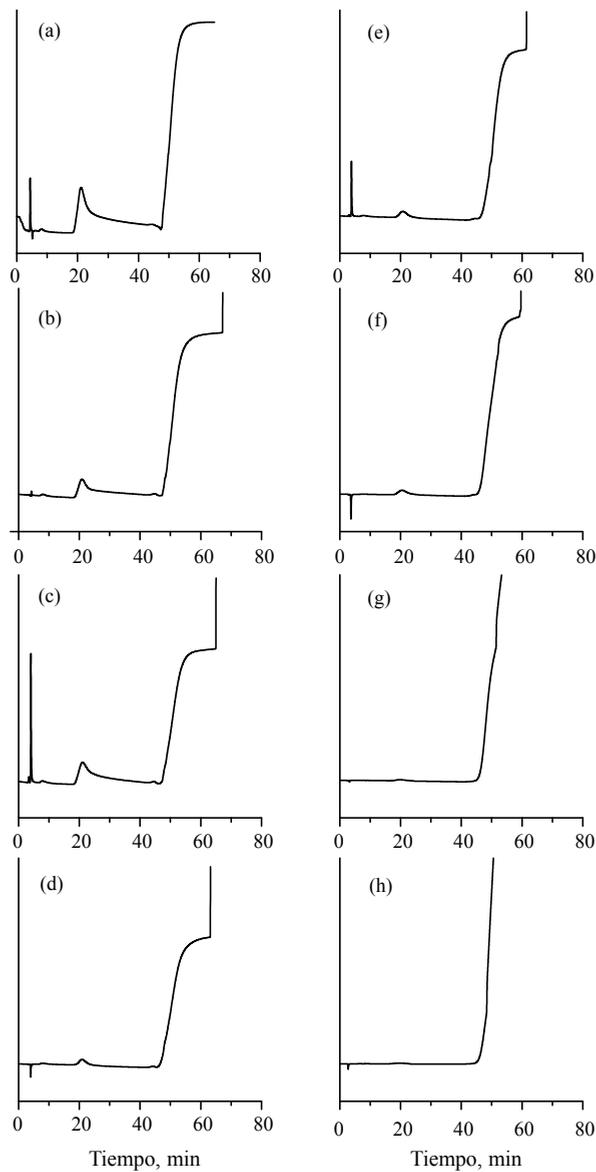


Figura 5.3. Curvas cromatográficas de adsorción para fases móviles que contienen SDS 0.075 M y diferentes concentraciones de acetonitrilo (v/v): (a) 5%, (b) 10%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 25%, (f) 30%, (g) 40% y (h) 50%.

El efecto observado por el estado de desequilibrio fue más pronunciado a medida que la concentración de acetonitrilo se incrementó, lo que dificultó el cálculo exacto de la cantidad de SDS adsorbido en la región submicellar, especialmente para las concentraciones en el intervalo 40–60% de acetonitrilo (véanse las Figuras 5.3g y h; los resultados al 60% no se muestran).

La saturación del detector puede atribuirse a la gran diferencia entre los índices de refracción para las fases móviles que atraviesan las celdas de referencia y de la muestra. En las experiencias realizadas, ambas celdas contenían inicialmente la misma fase móvil acuo-orgánica, y a continuación se hacía pasar una fase móvil micelar de concentraciones crecientes a través de la celda de la muestra, que sustituye a la mezcla acuo-orgánica inicial. Cabe señalar que en las rutinas de trabajo en las que se emplea un detector de índice de refracción con fines analíticos, la misma fase móvil rellena ambas celdas de referencia y de la muestra. Seguidamente, se realiza la inyección de uno o más solutos en baja concentración, que eluyen desde el interior de la columna a la celda de la muestra, dando lugar a pequeños cambios en el índice de refracción.

La Figura 5.4 representa la variación de la cantidad de SDS adsorbido sobre la columna Kromasil C₁₈, al incrementarse la concentración de acetonitrilo en la fase móvil, aplicando el método de cromatografía frontal. En las condiciones micelares (5–20% de acetonitrilo), la cantidad de SDS adsorbido permaneció casi constante ($\sim 2.6 \text{ mol/m}^2$), mientras que en el intervalo 20–50% se observó una ligera disminución gradual.

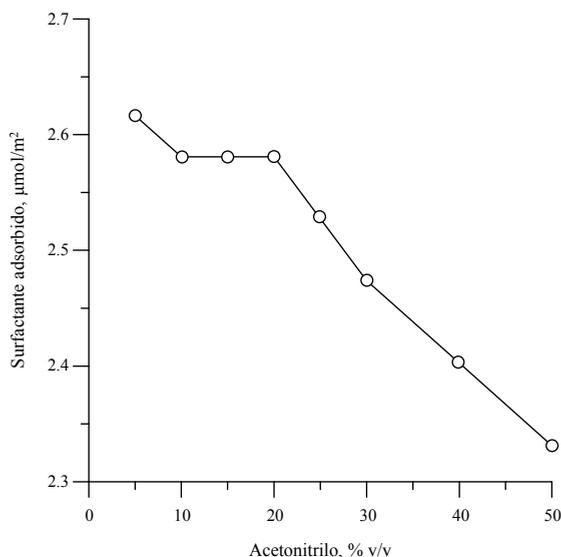


Figura 5.4. Cantidad de SDS adsorbido sobre una fase estacionaria Kromasil C₁₈, utilizando fases móviles que contienen SDS 0.075 M y concentraciones crecientes de acetonitrilo.

Con fines comparativos, la Figura 5.5 muestra la cantidad de SDS adsorbido sobre la fase estacionaria, aplicando el método de cromatografía frontal, a diferentes concentraciones de surfactante y en presencia de una cantidad relativamente baja de acetonitrilo en la fase móvil (10%). Cuando se incrementa la concentración del surfactante por encima de la CMC, la cantidad de micelas en la disolución aumenta, pero la concentración de monómeros libres permanece constante y equivalente a la CMC. Sin embargo, como se observa en la Figura 5.5, en presencia del disolvente orgánico, la adsorción del SDS en la fase estacionaria continúa a concentraciones muy por encima de la CMC (al menos hasta una concentración de SDS 0.1 M).

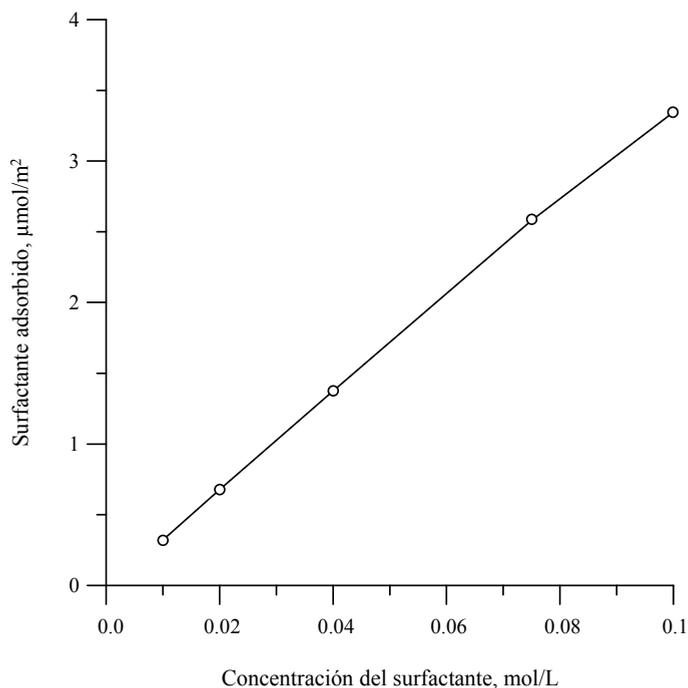


Figura 5.5. Cantidad de SDS adsorbido sobre una fase estacionaria Kromasil C₁₈, utilizando fases móviles que contienen un 10% de acetonitrilo y concentraciones crecientes de SDS.

5.4.3. Revelación de la adsorción del SDS bajo condiciones micelares y submicelares a partir de los tiempos de retención y forma de los picos cromatográficos

Los monómeros de SDS adsorbidos sobre una fase estacionaria C₁₈ crean una doble capa cargada negativamente, capaz de atraer especies de carga positiva, como los solutos básicos protonados. Esto aumenta la capacidad de retención de la fase estacionaria respecto a la RPLC convencional. Como se ha

comentado, el disolvente orgánico añadido a un sistema de este tipo reduce la cantidad de monómeros de surfactante que recubren la superficie de la fase estacionaria. Sin embargo, siempre que existan monómeros de SDS recubriendo la fase estacionaria, la retención de los solutos básicos catiónicos se mantendrá elevada en relación a una fase móvil similar en ausencia de SDS.

Para comprobar la adsorción del surfactante en presencia de una cantidad elevada de disolvente orgánico, se utilizaron fases móviles que contenían un 40% de acetonitrilo y concentraciones de SDS variables en el intervalo 0–0.075 M (lo que corresponde a condiciones submicelares), para eluir un conjunto de β -bloqueantes a través de una columna Kromasil C₁₈. Las experiencias se llevaron a cabo a pH 3, al que los β -bloqueantes se hallan cargados positivamente.

La Figura 5.6 muestra el comportamiento de retención para el celiprolol y el propranolol (se obtuvieron resultados similares para los otros β -bloqueantes). El cromatograma de la Figura 5.6a se obtuvo mediante RPLC convencional (sin surfactante). Los demás cromatogramas corresponden a condiciones por debajo (Figuras 5.6b a 5.6e) y por encima (Figura 5.6f) de la CMC. Como se observa, la retención de los dos β -bloqueantes se incrementó al aumentar la concentración del surfactante. Esto reveló el revestimiento gradual de la fase estacionaria por el surfactante, que produce el aumento en la retención de los β -bloqueantes gracias a la atracción electrostática.

Los mayores tiempos de retención obtenidos bajo condiciones submicelares (Figura 5.6f), respecto a la RPLC clásica en ausencia de SDS (Figura 5.6a), sugiere que una importante cantidad de surfactante sigue recubriendo la fase estacionaria a una concentración elevada de acetonitrilo (40%).

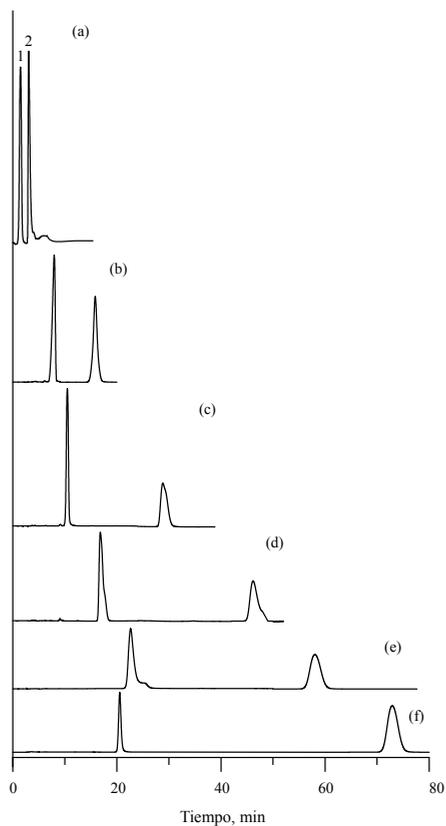


Figura 5.6. Cromatogramas de una mezcla de celiprolol (1) y propranolol (2) eluidos con una fase móvil que contiene un 15% de acetonitrilo y concentraciones crecientes de SDS (M): (a) 0, (b) 0.0005, (c) 0.001 (d) 0.003 (e) 0.005 y (f) 0.075.

El recubrimiento de la fase estacionaria por el surfactante también se revela mediante la forma de los picos cromatográficos de los compuestos básicos. Los monómeros de SDS que cubren la superficie de la fase estacionaria enmascaran los grupos silanol residuales. Esto dificulta la interacción electrostática entre los solutos catiónicos y los silanoles ionizados, que es la responsable de un proceso lento de adsorción-desorción de los solutos, que produce picos anchos y asimétricos mostrando colas [26–30]. La interacción de los solutos catiónicos con el recubrimiento aniónico de SDS tiene lugar a través de un proceso rápido de intercambio iónico, lo que origina un aumento significativo de la eficacia de la columna y picos prácticamente simétricos [31,32]. Por lo tanto, el perfil de los picos de los solutos estudiados puede también revelar si la fase estacionaria se encuentra recubierta por el surfactante.

La forma de los picos de los β -bloqueantes se examinó mediante el uso de gráficos que representan la semianchura izquierda (A) y derecha (B), medidas al 10% de la altura de los picos frente al tiempo de retención [33]:

$$A = A_0 + m_A t_R \quad (5.2)$$

$$B = B_0 + m_B t_R \quad (5.3)$$

Resulta conveniente medir la señal al 10% de la altura de los picos para evitar el ruido de la línea base y apreciar aún la asimetría. Los gráficos se pueden construir con las semianchuras de los picos, obtenidos para un grupo de compuestos eluidos con una fase móvil en particular, o con varias fases móviles. En este estudio, hemos utilizado el primer enfoque, debido al cambio que sufre la fase estacionaria con la composición de la fase móvil, que contiene acetonitrilo y SDS.

A partir de la suma de las pendientes (m_A+m_B), es posible obtener la anchura de los picos a distintos tiempos de retención (la velocidad de ensanchamiento), mientras que la relación de las pendientes (m_B/m_A) caracteriza la asimetría de los picos de compuestos que muestran una retención significativa. Si $m_B = m_A$, los picos de los compuestos que eluyen a diferentes tiempos de retención son simétricos. Por otro lado, la contribución extra-columnar se halla asociada a las ordenadas en el origen de los gráficos ($A_0 + B_0$ y B_0/A_0 , Ecuaciones (5.2) y (5.3)). Por lo tanto, los gráficos de semianchuras permiten el aislamiento y la evaluación de la contribución extra- e intra-columnar al ensanchamiento de los picos [33].

Las Figuras 5.7a y 5.7f muestran los gráficos de semianchura para el grupo de β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen 15 y 30% de acetonitrilo, respectivamente, en ausencia de SDS. Se puede observar que las correlaciones son satisfactorias y la pendiente de la semianchura derecha es significativamente mayor respecto a la semianchura izquierda, lo que indica la existencia de picos con importantes colas. Las Figuras 5.7b–e y g–j corresponden a las medidas realizadas con fases móviles que contienen cantidades variables de acetonitrilo, en presencia de SDS 0.075 M.

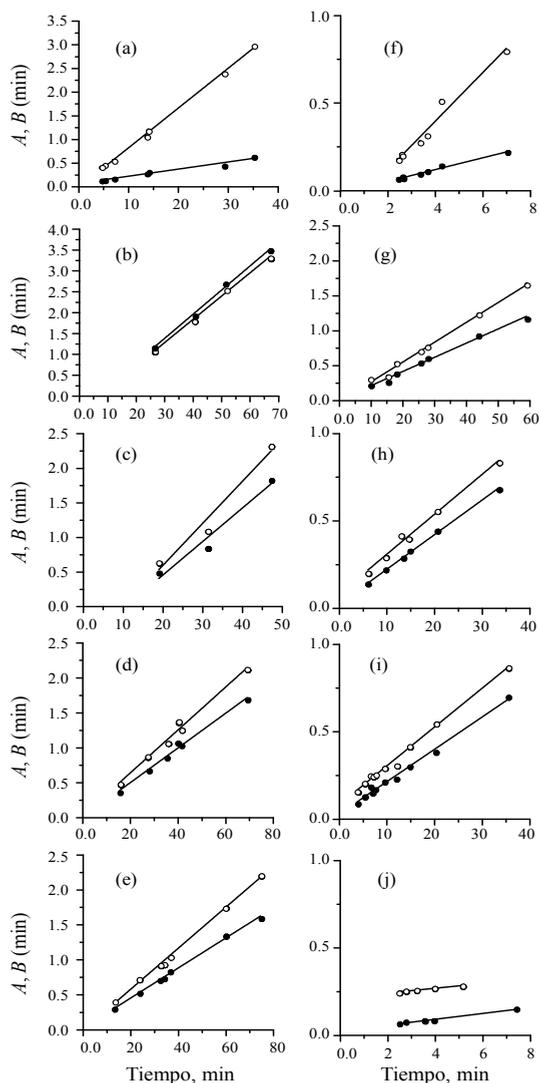


Figura 5.7 Gráficos de semianchura de pico para el conjunto de β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen un 15% (a) o un 30% (f) de acetonitrilo, en ausencia de SDS, y para fases móviles que contienen SDS 0.075 M en presencia de concentraciones crecientes de acetonitrilo: (b) 5%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 25%, (g) 30%, (h) 40%, (i) 50% y (j) 60%. Semianchuras: izquierda (A, ●), y derecha (B, ○).

Es evidente la disminución de la pendiente para la semianchura derecha al existir SDS en la fase móvil, con respecto a las fases móviles en su ausencia, incluso a concentraciones crecientes de acetonitrilo. Esto indica una mejora significativa de la forma de los picos, especialmente en cuanto a su simetría. En la Tabla 5.2, se comparan las pendientes correspondientes a la semianchura izquierda y derecha, y su suma y cociente, para mezclas de acetonitrilo-agua, en ausencia y presencia de SDS 0.075 M.

Tabla 5.2 Parámetros de ajuste de los gráficos de semianchuras obtenidos empleando mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia y presencia de SDS.

Acetonitrilo (% v/v) / SDS (M)	m_A	m_B	m_A+m_B	m_B/m_A
15 / 0	0.015	0.084	0.099	5.60
30 / 0	0.034	0.139	0.173	4.13
5 / 0.075	0.058	0.056	0.113	0.96
15 / 0.075	0.048	0.061	0.109	1.26
20 / 0.075	0.025	0.031	0.055	1.24
25 / 0.075	0.021	0.029	0.051	1.36
30 / 0.075	0.020	0.028	0.048	1.40
40 / 0.075	0.020	0.023	0.043	1.22
50 / 0.075	0.018	0.022	0.041	1.15
60 / 0.075	0.017	0.013	0.030	0.80

Se observa que la simetría de los picos (m_B/m_A) mejora notablemente tras la adición de SDS. Para 15 y 30% de acetonitrilo, estos valores variaron entre $m_B/m_A = 5.6$ y 4.1 en ausencia de surfactante a 1.3 y 1.4 en su presencia, respectivamente. Por otro lado, en presencia del surfactante, los valores de m_B/m_A apenas cambiaron con el contenido de acetonitrilo. En cambio, en estas condiciones, el ensanchamiento de los picos (m_B+m_A) disminuyó a concentraciones crecientes del disolvente orgánico, desde $m_B+m_A = 0.11$ a 0.03 para 5 y 60% de acetonitrilo, respectivamente.

Con fines comparativos, la Tabla 5.3 recoge información similar para fases móviles submicelares que contienen un 40% de acetonitrilo y concentraciones de SDS en el intervalo 0–0.075 M. Como se observa, la forma de los picos mejora cuando se incrementa la concentración del surfactante.

Tabla 5.3. Parámetros de ajuste de los gráficos de semianchuras obtenidos empleando mezclas de 40% de acetonitrilo y diferentes concentraciones de SDS.

SDS (mM)	0.0	0.05	1.0	3.0	5.0	75
m_A	0.072	0.076	0.025	0.036	0.030	0.020
m_B	0.304	0.035	0.055	0.075	0.038	0.023
$m_A + m_B$	0.102	0.110	0.081	0.111	0.067	0.043
m_B / m_A	0.42	0.46	2.18	2.09	1.26	1.15

5.5. Conclusiones

La cromatografía frontal es una herramienta útil y sencilla para la determinación de la cantidad de SDS adsorbido sobre una fase estacionaria C₁₈. Sin embargo, si se utiliza un detector de índice de refracción, la calidad de los resultados obtenidos se ve afectada significativamente por la concentración de acetonitrilo en la fase móvil, especialmente por encima del 30% de acetonitrilo. La aplicación de un método de RPLC basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos de retención y semianchuras de pico) es una buena alternativa para revelar la existencia de una capa de surfactante adsorbido sobre la superficie de la fase estacionaria. Este método también se puede utilizar para comprobar la adsorción de otros aditivos en la fase estacionaria, como los líquidos iónicos [34].

La mejora en la forma de los picos cromatográficos al aumentar la concentración de disolvente orgánico, en presencia de surfactante, puede explicarse por la existencia de una delgada capa de surfactante sobre la fase estacionaria, que protege los grupos silanol. La información obtenida sugiere que a la concentración máxima de acetonitrilo examinada en este trabajo (60% v/v), la fase estacionaria todavía se halla recubierta por SDS.

5.6. Referencias

- [1] A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Separation Science Series (editada por J. Cazes), Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [2] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *New insights and recent developments in micellar liquid chromatography*, Sep. Purif. Rev. 38 (2009) 45–96.
- [3] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Retention mechanisms in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1798–1814.
- [4] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographic efficiency in micellar liquid chromatography: should it be still a topic of concern?*, Sep. Purif. Rev. 42 (2013) 1–27.
- [5] J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray, J.S. Landy, *Efficiency enhancement in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 55 (1983) 924–928.
- [6] S. López Grío, M.C. García Álvarez-Coque, M.L. Hinze, F.H. Quina, A. Berthod, *Effect of a variety of organic additives on retention and efficiency in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 72 (2000) 4826–4835.
- [7] R. Zana, *Aqueous surfactant-alcohol systems*, Adv. Colloid Interface Sci. 57 (1995) 1–64.
- [8] X. Li, J.S. Fritz, *Novel additives for the separation of organic-compounds by high-performance liquid-chromatography*, J. Chromatogr. A 728 (1996) 235–247.
- [9] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Retention mechanisms for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes*, Anal. Chem. 80 (2008) 9705–9713.

- [10] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of β -blockers*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3199–3209.
- [11] J. Fischer, P. Jandera, *Chromatographic behaviour in reversed-phase high-performance liquid chromatography with micellar and submicellar mobile phases: effects of the organic modifier*, J. Chromatogr. B 681 (1996) 3–19.
- [12] X. Li, J.S. Fritz, *Mixed surfactants as mobile phase additives for the separations of organic compounds by HPLC*, Anal. Chem. 68 (1996) 4481–4484.
- [13] P. Jandera, J. Fischer, H. Effenberger, *Characterization of retention in micellar high-performance liquid-chromatography and in micellar electrokinetic chromatography using lipophilicity and polarity indexes*, J. Chromatogr. A 807 (1998) 57–70.
- [14] R. Nakao, M. Schou, C. Halldin, *Direct plasma metabolite analysis of positron emission tomography radioligands by micellar liquid chromatography with radiometric detection*, Anal. Chem. 84 (2012) 3222–3230.
- [15] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, W.C. Hamling, *Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 61 (1989) 1353–1358.
- [16] A. Berthod, A. Roussel, *The role of the stationary phase in micellar liquid chromatography adsorption and efficiency*, J. Chromatogr. 449 (1988) 349–360.
- [17] J. Rodenas Montano, C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Optimisation of gradient elution of organic solvent in micellar liquid chromatography using Drylab®: screening of β -blockers in urine samples*, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 31–41.

-
- [18] L.S. Madamba, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *Gradient elution in micellar liquid chromatography II. Organic modifier gradients*, J. Chromatogr. A 683 (1994) 335–345.
- [19] E.K. Paleologos, S.D. Chytiri, I.N. Savvaidis, M.G. Kontominas, *Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation*, J. Chromatogr. A 1010 (2003) 217–224.
- [20] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Effect of short-chain alcohols on surfactant-mediated reversed-phase liquid chromatographic systems*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7082–7089.
- [21] J.R. Torres Lapasió, *MICROM, software*, asociado al libro *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [22] A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Micellar liquid chromatography, adsorption isotherms of two ionic surfactants on five stationary phases*, Anal. Chem. 58 (1986) 1356–1358.
- [23] A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Additive effects on surfactant adsorption and ionic solute retention in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 58 (1986) 1362–1367.
- [24] A. Cavazzini, A. Felinger, G. Guiochon, *Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns*, J. Chromatogr. A 1012 (2003) 139–149.
- [25] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography in doping control*, LC–GC Europe 21 (2008) 420–429.
- [26] M.T. Saarinen, H. Sirén, M.L. Riekkola, *Screening and determination of beta-blockers, narcotic analgesics and stimulants in urine by high-performance liquid-chromatography with column-switching*, J. Chromatogr. B 664 (1995) 341–346.
- [27] J. Nawrocki, *The silanol group and its role in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29–71.
-

- [28] U.D. Neue, K. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, *The combined effect of silanols and the reversed-phase ligand on the retention of positively charged analytes*, J. Chromatogr. A 1063 (2005) 35–45.
- [29] H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, *Reversed phase chromatography: the mystery of surface silanols*, Chromatographia 62 (2005) S19–S29.
- [30] D.V. McCalley, *The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 858–880.
- [31] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar-organic versus aqueous-organic mobile phases for the screening of β -blockers*, Anal. Chim. Acta 454 (2002) 109–123.
- [32] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Improvement of peak shape and separation performance of β -blockers in conventional reversed-phase columns using solvent modifiers*, J. Chromatogr. Sci. 41 (2003) 350–358.
- [33] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786–1798.
- [34] J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, M.J. Ruiz Ángel, *The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 398–407.
- [35] J.J. Fernández Navarro, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C_{18} stationary phases*, J. Chromatogr. A 1232 (2012) 166–175.

CAPÍTULO 6

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR CON BRIJ-35
UTILIZANDO ELUCIÓN ISOCRÁTICA Y EN GRADIENTE**

6.1. Summary

Polyoxyethylene(23)lauryl ether ($C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_{23}OH$, known as Brij-35) is a non-ionic surfactant, which has been considered as an alternative to the extensively used in micellar liquid chromatography (MLC) anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS, or lauryl sulphate, $C_{12}H_{25}SO_4^- Na^+$), for the analysis of drugs and other types of compounds. Brij-35 is the most suitable non-ionic surfactant for MLC, owing to its commercial availability, high purity, low cost, low toxicity, high cloud temperature and low background absorbance. However, it has had minor use in MLC, due to its alleged larger adsorption on C_{18} and C_8 stationary phases and smaller efficiencies. In this work, we gather several results obtained in our laboratory with several β -blockers, sulphonamides and flavonoids, concerning the use of Brij-35 as modifier in MLC. The less polar character of Brij-35 increases the retention of polar compounds and the polyoxyethylene chain with its end hydroxyl group allows hydrogen-bond interactions with some analytes, especially phenolic compounds. This results in the possibility of using pure aqueous solutions of Brij-35 as mobile phases (solutions of water and detergent), which is an interesting “green” strategy, in an effort to minimise pollution and wastes, increasing thus sustainability. The work includes the examination of the performance of isocratic and gradient elution with pure aqueous solutions of Brij-35, and with hybrid mobile phases containing this surfactant and a small amount of acetonitrile to reduce the retention and improve the peak profiles. The effect of both modifiers and the temperature on the retention and peak profile of several types of analytes is examined in detail.

6.2. Introducción

En 1980, Armstrong y Henry sugirieron por primera vez la posibilidad de utilizar disoluciones que contienen surfactantes por encima de la CMC, con fines separativos [1]. La técnica adoptó el nombre de cromatografía líquida micelar (MLC) [2,3]. En MLC, no sólo se ve modificada la fase estacionaria por la adsorción de monómeros de surfactante (hasta lograr su saturación), sino que los monómeros de surfactante que quedan en exceso en la fase móvil se asocian formando micelas. La existencia de surfactante en estructuras organizadas en ambas fases permite el establecimiento de nuevas e intensas interacciones y la posibilidad de modular mejor el comportamiento cromatográfico de los solutos analizados, ampliando las posibilidades de separación. En MLC, el comportamiento de retención (fuerza eluyente y selectividad) puede ser muy distinto al observado en RPLC acuo-orgánica, incluso tras la adición de un disolvente orgánico.

Algunas de las cualidades de la MLC se detallaron en las primeras descripciones de la técnica: su coste relativamente bajo y baja toxicidad, junto con la facilidad de operación. Otras cualidades se han ido revelando a lo largo de su desarrollo: la inyección directa de fluidos fisiológicos [4,5], la alta reproducibilidad de los tiempos de retención, y su predicción exacta a través de la obtención de modelos, lo que facilita enormemente la optimización de las condiciones de separación [6–8], así como la posibilidad de analizar solutos en un amplio intervalo de polaridades utilizando elución isocrática, en tiempos de análisis suficientemente cortos, realizando una única inyección de la muestra [9]. Sin embargo, la elución en gradiente puede ser útil en algunas aplicaciones. A pesar de ello, tras los estudios publicados por Dorsey y Khaledi [10–13], que describieron la posibilidad y utilidad del uso de

gradientes en MLC para acelerar la elución de compuestos fuertemente retenidos, se han publicado tan sólo un número muy reducido de procedimientos que utilizan elución en gradiente en MLC (véase el Capítulo 4).

Aunque pueden utilizarse surfactantes de diversa naturaleza (con grupos no iónicos o iónicos en el extremo de la cadena) para la preparación de fases móviles en MLC, en la mayoría de los artículos publicados se hace uso del surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS, $C_{12}H_{25}SO_4^- Na^+$), seguido por el surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, *cetyltrimethylammonium bromide*, $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3^+ Br^-$) [2,3]. El SDS posee algunas características muy favorables que explican su éxito: se halla disponible comercialmente con una elevada pureza, disuelve de manera eficaz las proteínas en las matrices biológicas, y además, existen extensos estudios sobre la dinámica de formación de micelas de SDS, mucho más numerosos que para otros surfactantes. Estas características, junto con un hábito de uso, han relegado la exploración de las posibilidades ofrecidas por otros surfactantes. Así, el uso de surfactantes no iónicos en MLC es un campo muy poco explorado, que se ha centrado principalmente en el polioxietilen(23)lauril éter ($C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_{23}OH$, conocido como Brij-35).

Borgerding y Hinze fueron los primeros en estudiar la viabilidad, ventajas y limitaciones del Brij-35 en MLC [14]. Estos mismos investigadores realizaron otros estudios sobre el mecanismo de retención de la serie homóloga de los alquilbencenos, utilizando fases móviles micelares de Brij-35 [15], y la modificación de la fase estacionaria por este surfactante [16]. Por su parte, Cline Love y Fett encontraron que Brij-35 era el surfactante óptimo para analizar fármacos en muestras de orina con inyección directa [17]. Sin

embargo, a pesar de los resultados prometedores de estos primeros estudios, el interés en el uso analítico de Brij-35 en MLC decayó. Unos años más tarde, se publicaron dos estudios en los que se mostró el cambio en la selectividad, respecto a la encontrada con SDS y CTAB, al separar un grupo de 15 derivados de benceno y naftaleno con Brij-35 en la fase móvil [18], y un procedimiento para analizar Al(III) y Fe(II) en muestras de suero como complejos con desferroxiamina, mediante su elución con Brij-35 0.005 M a pH neutro [19]. Son más recientes otros procedimientos analíticos en MLC con Brij-35 para determinar carbamatos en pesticidas [20], y mezclas de varios ésteres de los ácidos benzoico y *p*-hidroxibenzoico en muestras de cosméticos y alimentos [21]. Se ha publicado también una aplicación particularmente interesante que utiliza Brij-35 y una columna ciano, para la determinación de colesterol y sus metabolitos en muestras de alimentos, utilizando un método enzimático en la etapa de detección [22]. En esa aplicación, la compatibilidad del reactor enzimático con el Brij-35 evitó el frecuente (y caro) reemplazo de la enzima, debido a la desnaturalización producida por su contacto con el disolvente orgánico utilizado en las fases móviles acuo-orgánicas en RPLC.

Recientemente, se ha puesto a punto en nuestro laboratorio un procedimiento para el análisis de antidepresivos tricíclicos con fases móviles puramente micelares de Brij-35 (i.e., disoluciones acuosas del surfactante) [23,24]. También se ha realizado un estudio sobre el efecto de la temperatura sobre la elución isocrática de varios flavonoides con fases móviles puramente micelares de Brij-35, observándose un aumento significativo de la eficacia al incrementarse la temperatura de la columna, que a 80°C se acerca a la alcanzada en RPLC acuo-orgánico [25]. Se ha sugerido el uso de micelas mixtas de Brij-35 y SDS para mejorar la separación de compuestos orgánicos en preparaciones farmacéuticas [26,27], cumarinas [28] y alcaloides [29].

Por otro lado, el Brij-35 también ha llamado mucho la atención en el área de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, *quantitative retention-activity relationships*). La capacidad de un sistema en MLC con Brij-35 para imitar procesos de bioreparto ha demostrado ser muy útil para describir el comportamiento biológico de diversos tipos de fármacos, a lo que se ha denominado cromatografía micelar de bioreparto [30–32].

En este trabajo, se presenta una visión global de las posibilidades del Brij-35 en MLC. Se discute el tipo de compuestos que pueden analizarse con este surfactante y las condiciones experimentales de trabajo necesarias. Se muestra el comportamiento cromatográfico de tres conjuntos de compuestos con distintas polaridades y estructuras, utilizando elución isocrática y diversos tipos de gradiente, así como disoluciones acuosas de Brij-35 en ausencia y presencia de disolvente orgánico.

6.3. Parte experimental

6.3.1. Reactivos, columna e instrumentación

Se analizaron los siguientes compuestos: tres β -bloqueantes (pindolol, oxprenolol y propranolol), seis sulfonamidas (sulfaquinoxalina, sulfisoxazol, sulfamerazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol y sulfametazina), y tres flavonoides (fisetina, crisina y quercetina), todos de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU) (Tablas 6.1 y 6.2). Los compuestos se disolvieron en una pequeña cantidad de acetonitrilo, y se diluyeron con agua. La concentración de las disoluciones inyectadas fue 10 $\mu\text{g/mL}$ para los β -bloqueantes y las sulfonamidas, y 50 $\mu\text{g/mL}$ para los flavonoides.

Se prepararon fases móviles con Brij-35 de Sigma (99% de pureza), y/o acetonitrilo de Scharlau (Sentmenat, Barcelona), tamponadas a pH 3 con dihidrógenofosfato sódico anhidro 0.01 M de Fluka (Steinheim, Alemania). Para realizar las separaciones, se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (125 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula) de Agilent (Waldbronn, Alemania). Otros detalles pueden consultarse en el Capítulo 3.

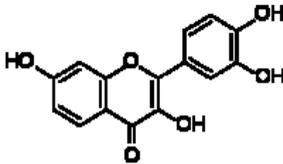
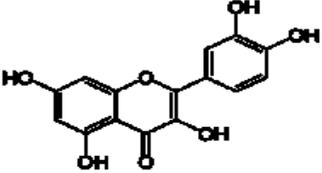
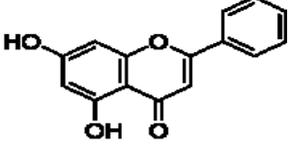
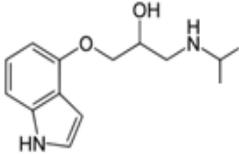
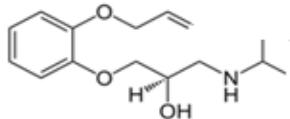
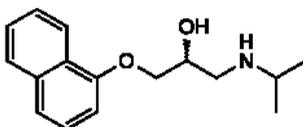
Se hizo uso de un cromatógrafo líquido de Agilent, equipado con los siguientes módulos: una bomba cuaternaria (HP 1200) que operaba a 1 mL/min, un automuestreador (HP 1100) con viales de 2 mL, un controlador de temperatura (HP 1100), y un detector UV visible (HP 1100) en el que se fijó la longitud de onda de medida a 254 nm. El sistema se gobernó con una OpenLAB CDS LC ChemStation (Agilent B.04.03).

Tabla 6.1. Estructuras, constantes de disociación (pK_a) y coeficientes de reparto octanol-agua ($\log P_{o/w}$) para las sulfonamidas estudiadas.

Compuesto	Estructura	pK_a^a	$\log P_{o/w}^a$
Sulfamerazina		2.01, 6.99	0.52
Sulfametazina		2.04, 6.99	0.65
Sulfisoxazol		2.17, 5.8	0.73
Sulfametoxazol		1.97, 6.16	0.79
Sulfadimetoxina		1.95, 6.91	1.26
Sulfaquinoxalina		5.5	1.55

^a Los valores de $\log P_{o/w}$ se obtuvieron de <http://www.chemicalize.org/> y los de pK_a de Chemaxon en <http://www.drugbank.ca/>

Tabla 6.2. Estructuras, constantes de disociación (pK_a) y coeficientes de reparto octanol-agua ($\log P_{o/w}$) para los flavonoides y β -bloqueantes estudiados.

Compuesto	Estructura	pK_a^a	$\log P_{o/w}^a$
Fisetina		–	1.81
Quercetina		6.44	2.16
Crisina		–	3.01
Pindolol		9.67, 14.09	1.69
Oxprenolol		9.67, 14.09	2.17
Propranolol		9.67, 14.09	2.58

^a Los valores de $\log P_{o/w}$ se obtuvieron de <http://www.chemicalize.org/> y los de pK_a de Chemaxon en <http://www.drugbank.ca/>

6.3.2. Procedimiento

En elución isocrática, se trabajó tanto en el modo micelar como en el modo micelar-orgánico. Se ensayaron como fases móviles disoluciones acuosas de Brij-35 en ausencia de acetonitrilo en el intervalo de concentraciones 0.01–0.05 M (0.05 M es aproximadamente la solubilidad del Brij-35 en agua). También se estudió el comportamiento obtenido con siete fases móviles híbridas de Brij-35 y acetonitrilo, conteniendo la misma concentración de Brij-35 (0.01 M) y concentraciones variables de acetonitrilo en el intervalo 0–50% v/v. Se realizaron otras medidas con fases móviles que contenían Brij-35 0.020 M y 30% v/v de acetonitrilo, Brij-35 0.030 M y 20% v/v de acetonitrilo, y Brij-35 0.040 M y 40% v/v de acetonitrilo.

Se construyeron cuatro tipos de gradiente, en todos los casos lineales:

- (i) gradientes de Brij-35 en ausencia de disolvente orgánico,
- (ii) gradientes de disolvente orgánico manteniendo constante la concentración de Brij-35,
- (iii) gradientes simultáneos de Brij-35 y acetonitrilo, en los que se incrementó la concentración de ambos componentes,
- (iv) gradientes simultáneos de Brij-35 y acetonitrilo, en los que se incrementó la concentración de acetonitrilo y se disminuyó la de Brij-35.

Se utilizó siempre Brij-35 0.01 M como disolvente A. Como disolvente B se utilizó Brij-35 0.05 M para el gradiente (i), Brij-35 0.01 M y 50% v/v de acetonitrilo para el gradiente (ii), Brij-35 0.05 M y 50% v/v de acetonitrilo para el gradiente (iii), y 50% v/v de acetonitrilo para el gradiente (iv). Los cromatogramas obtenidos con los programas de gradiente en los que se varió la

concentración de Brij-35, en ausencia de acetonitrilo, se obtuvieron a dos temperaturas: 25 y 50°C.

En todos los casos se realizaron medidas duplicadas. El tiempo muerto ($t_0 = 1.10 \pm 0.04$ min), en presencia del surfactante, se midió a partir de la primera perturbación de la línea base. El tiempo de retardo (*dwell time*) se estableció en 0.89 min.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Comentarios sobre la capacidad del Brij-35 como modificador en MLC

El Brij-35, al igual que el SDS, posee una cadena alquílica de 12 carbonos, pero difiere en el grupo terminal. Al añadir Brij-35 a una fase móvil en RPLC, la cadena alquílica del surfactante se asocia a la cadena alquílica enlazada a la fase estacionaria, modificando sus propiedades. El extremo polar hidrofílico de la molécula de Brij-35 (la cadena de polioxietileno con el grupo hidroxilo terminal) se orienta lejos de la superficie de la fase estacionaria formando una especie de "pluma" (Figura 6.1). Esto incrementa la polaridad de la fase estacionaria, que se mantiene neutra.

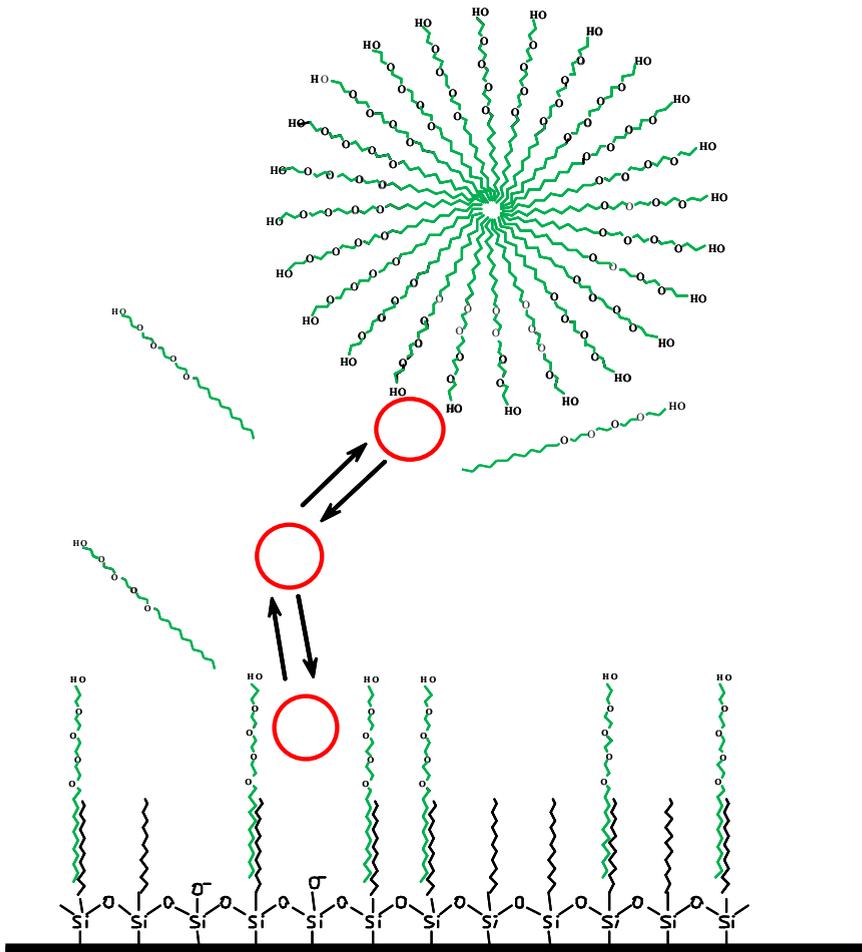


Figura 6.1. Representación esquemática de un sistema cromatográfico con una fase móvil puramente micelar de Brij-35.

Los monómeros del surfactante interactúan también con compuestos polares o moderadamente polares por formación de puentes de hidrógeno entre el oxhidrilo terminal de la cadena de polioxietilenglicol del Brij-35 asociado a la fase estacionaria y grupos oxhidrilo (y en ocasiones, grupos amino) suficientemente expuestos en los analitos. El comportamiento observado con Brij-35 también se explica por la formación en la fase móvil de grandes micelas que contienen un núcleo apolar de dodecilo y una superficie relativamente polar con cadenas de polioxietilenglicol, que proporcionan sitios hidrofóbicos e hidrofílicos de interacción, similares a los que experimentan los solutos en la fase estacionaria modificada por el surfactante.

De acuerdo a Borgerding et al., la adsorción de Brij-35 en la fase estacionaria continúa en gran medida, una vez superada su CMC (9.0×10^{-5} M) [16]. En las condiciones experimentales habituales (concentración de surfactante en el intervalo 0.005–0.05 M), la fase estacionaria se halla saturada con los monómeros del surfactante. Puesto que la concentración inferior del surfactante en el intervalo de trabajo se halla muy por encima de la CMC, la formación de micelas también está garantizada. Por otro lado, la concentración superior del surfactante viene determinada por su solubilidad y la viscosidad de la fase móvil resultante.

Los estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, junto con algunos publicados por otros autores, parecen indicar que el uso de fases móviles de Brij-35 puramente micelares es adecuado para la determinación de compuestos de polaridad intermedia o relativamente baja, o para compuestos altamente polares que interactúan con el grupo oxhidrilo terminal del surfactante por formación de puentes de hidrógeno, como es el caso de la

imipramina y nortriptilina [24], flavonoides [25], oxazepam y diazepam [31], y arbutina e hidroquinona [33].

Para estudiar las posibilidades del Brij-35 como modificador en MLC, se seleccionaron tres conjuntos de compuestos de prueba que cubrían un amplio intervalo de polaridades y estructuras: tres β -bloqueantes, seis sulfonamidas y tres flavonoides (Tablas 6.1 y 6.2). Entre estos compuestos, el grupo de los β -bloqueantes (con una polaridad similar a la de los flavonoides), ofreció la menor retención. Así, con Brij-35 0.01 M a pH 3 el pindolol eluyó cerca del tiempo muerto y los tiempos de retención para oxprenolol y propranolol fueron 2.7 y 11.8 min, respectivamente. Al parecer, la polaridad relativamente elevada de los β -bloqueantes y la posición de sus grupos oxhidrilo no permiten que se establezcan interacciones suficientemente fuertes con la fase estacionaria modificada con el Brij-35. Sin embargo, oxprenolol y propranolol (los β -bloqueantes menos polares) podrían analizarse con una fase móvil puramente micelar de Brij-35, de concentración baja (la retención de estos β -bloqueantes disminuyó significativamente para Brij-35 0.02 M) [23].

Como se muestra a continuación, la retención de los flavonoides en MLC con Brij-35, y en menor medida, la de las sulfonamidas, es muy superior a la de los β -bloqueantes, lo que es probablemente debido a la formación de puentes hidrógeno entre los grupos oxhidrilo y amino de estos compuestos con el grupo oxhidrilo terminal del Brij-35. Probablemente, la formación de enlaces de hidrógeno internos entre los grupos hidroxilo y amino adyacentes en los β -bloqueantes no permita la interacción con el grupo hidroxilo del Brij-35. A este respecto, se debe indicar que en un trabajo anterior [25], la interacción de los flavonoides con la fase estacionaria recubierta por Brij-35, y por consiguiente, el comportamiento de retención, se correlacionó con el

número y posición de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos de los flavonoides.

Debido a que la retención de las sulfonamidas y los flavonoides estudiados no es excesivamente elevada, en ambos casos es posible eluir los compuestos (con tiempos de análisis razonables), utilizando fases móviles puramente micelares de Brij-35 de concentración elevada, o con fases móviles híbridas conteniendo una concentración baja de Brij-35 y acetonitrilo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos con los conjuntos de sulfonamidas y flavonoides, utilizando elución isocrática y en gradiente.

6.4.2. Comportamiento cromatográfico de las sulfonamidas y flavonoides utilizando MLC con Brij-35

a) Elución isocrática

Se realizaron dos series de experiencias en elución isocrática con fases móviles puramente micelares de Brij-35 en el intervalo 0.01–0.05 M, y con fases móviles que contenían Bri-35 0.01 M y cantidades variables de acetonitrilo en el intervalo 5–50% v/v. Al incrementarse la concentración de Brij-35, los tiempos de retención de sulfonamidas y flavonoides disminuyeron. Utilizando Brij-35 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 M en ausencia de acetonitrilo, los tiempos de retención para el compuesto más retenido fueron de 63.5, 29.8, 19.9, 15.0 y 12.2 min, respectivamente, para el conjunto de sulfonamidas (tiempos correspondientes a sulfaquinoxalina), y 118.5, 53.8, 35.1, 25.9 y 20.8 min para el conjunto de flavonoides (correspondiente a crisina). Sin embargo, se observó un efecto nocivo: un apreciable ensanchamiento de los picos cromatográficos.

Utilizando fases móviles híbridas de Brij-35 y acetonitrilo, en las que se incrementó la concentración de acetonitrilo, y se mantuvo constante la concentración de Brij-35 (0.01 M), también disminuyeron los tiempos de retención (Figura 6.2). Así, en presencia de acetonitrilo 5, 10, 20, 30, 40 y 50% v/v, los tiempos de retención para sulfaquinoxalina fueron 48.8, 35.2, 16.0, 7.1, 3.7 y 2.4 min y para crisina, 99.8, 82.0, 55.2, 31.2, 13.2 y 6.2 min. En comparación con las experiencias realizadas con las fases móviles puramente micelares, la anchura de los picos se redujo para todos los compuestos al incrementar la concentración de acetonitrilo.

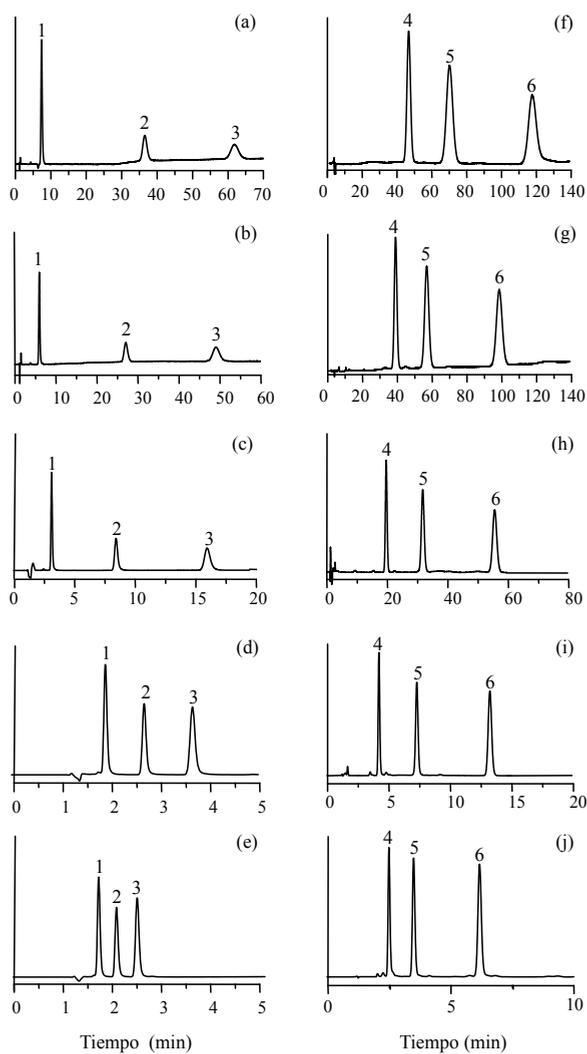


Figura 6.2. Cromatogramas en elución isocrática para tres sulfonamidas (a–e), y tres flavonoides (f–j), obtenidos con una fase móvil de Brij-35 0.01 M y diferentes concentraciones de acetonitrilo (v/v): (a,f) 0%, (b,g) 5%, (c,h) 20%, (d,i) 40%, y (e,j) 50%. Compuestos: (1) sulfamerazina, (2) sulfisoxazol, (3) sulfaquinoxalina, (4) fisetina, (5) quercetina, y (6) crisina.

De acuerdo a la bibliografía [16], el ensanchamiento de los picos observado con fases móviles puramente micelares se debe al aumento del grosor del recubrimiento de Brij-35 sobre la fase estacionaria, lo que ralentiza la velocidad de los equilibrios de distribución. El disolvente orgánico añadido a la fase móvil micelar, especialmente a altas concentraciones (se alcanzaron concentraciones de hasta un 50% v/v de acetonitrilo), desorbe el surfactante de la fase estacionaria, incrementando la eficacia, y finalmente destruye las micelas en la fase móvil (Figura 6.1). A altas concentraciones de acetonitrilo, al no existir micelas, la modalidad cromatográfica ya no es MLC, sino la denominada cromatografía líquida submicelar (HSLC, *high submicellar liquid chromatography*). En HSLC, la fase estacionaria se halla recubierta por una estrecha capa de surfactante, mientras que la fase móvil contiene monómeros de surfactante en alta concentración [34].

Por otro lado, al comparar los comportamientos cromatográficos utilizando fases móviles puramente micelares de Brij-35 0.01 M y mezclas acuo-orgánicas, se observa que las primeras pueden reducir o aumentar los tiempos de retención, dependiendo de la interacción de los solutos con el surfactante. Sin embargo, la selectividad se deteriora: en ausencia del surfactante, las seis sulfonamidas estudiadas se separaron hasta la línea base, mientras que en presencia de Brij-35, los tiempos de retención de sulfametacina/sulfamerazina, por un lado, y sulfametoxazol/sulfixosazol, por el otro, fueron muy similares.

b) Elución en gradiente

A continuación se exploró la posibilidad de utilizar gradientes con eluyentes que contienen Brij-35, de la forma descrita en la Sección 6.3.2. La aparición de una línea base con pendiente positiva es usual cuando se trabaja en RPLC convencional (acu-orgánica) en el modo gradiente [35]. Cuando se aplican gradientes de Brij-35, la pendiente de la línea base es bastante más acusada, mientras que cuando se trabaja manteniendo constante la concentración de Brij-35 y se aplica un gradiente de acetonitrilo, la pendiente es menos pronunciada y negativa. También se observa una pendiente negativa al aplicar un gradiente en el que disminuye la concentración de surfactante y se incrementa la de disolvente orgánico.

La Figura 6.3 muestra algunos cromatogramas obtenidos en diferentes condiciones, empleando elución en gradiente con Brij-35 y acetonitrilo, tras la corrección de la línea base. Debe señalarse la apreciable disminución de la anchura de los picos para las sulfonamidas y los flavonoides, respecto a la elución isocrática, especialmente para los gradientes de acetonitrilo manteniendo constante o disminuyendo la concentración de Brij-35 (Figuras 6.2c,e,h y j).

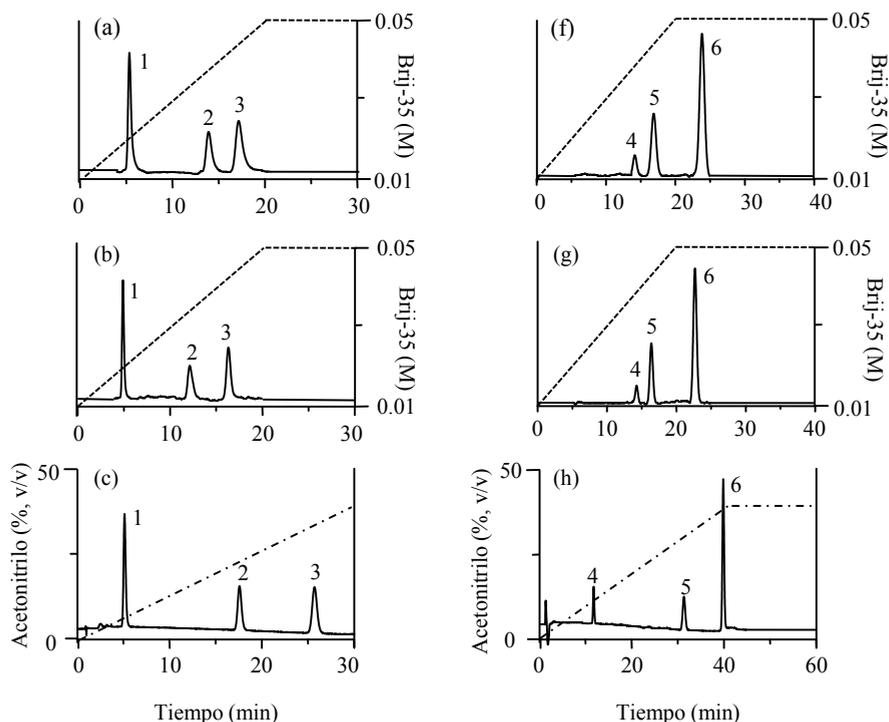


Figura 6.3. Cromatogramas obtenidos a dos temperaturas para un conjunto de tres sulfonamidas (a–e) y tres flavonoides (f–j), aplicando diferentes tipos de gradiente (se proporciona el intervalo de concentración del gradiente, el tiempo del gradiente y la temperatura). Gradientes de Brij-35:

(a,f) 0.01–0.05 M, $t_G = 20$ min, 25°C, y (b,g) 0.01–0.05 M, $t_G = 20$ min, 50°C. Gradientes de acetonitrilo: (c,h) manteniendo constante la concentración de Brij-35 (0.01 M), 0–40% v/v, $t_G = 40$ min, (d,i) aumentando simultáneamente la concentración de acetonitrilo (0–30% v/v) y de Brij-35 (0.01–0.034 M), $t_G = 30$ min, y (e,j) aumentando la concentración de acetonitrilo (0–50% v/v) y disminuyendo la de Brij-35 (0.01–0.002 M), $t_G = 25$ min. En cada cromatograma se representan los programas de gradiente: gradiente de acetonitrilo (-.-) y gradiente de Brij-35 (---). Consúltense la identidad de los picos en la Figura 6.2.

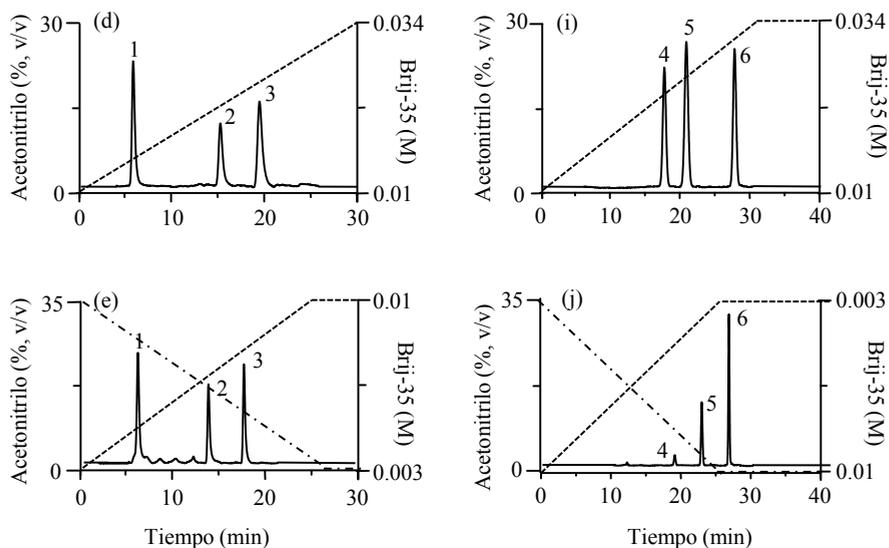


Figura 6.3 (continuación).

Por otro lado, al comparar los cromatogramas obtenidos al aplicar gradientes en los que se incrementa la concentración de Brij-35, se observa que la reducción de la anchura de los picos es menor cuando se incrementa simultáneamente la concentración de acetonitrilo (compárense las Figuras 6.3a, d, f e i). Por último, al comparar los tiempos de retención de las seis sulfonamidas estudiadas, se observó que para los gradientes en los que se incrementa simultáneamente la concentración de Brij-35 y acetonitrilo, los picos de sulfametoxazol y sulfadimetoxina se adelantan a los de sulfixosazol y sulfaquinoxalina, al incrementarse las pendientes de los gradientes.

6.4.3 Descripción de la retención

La observación de los cromatogramas (uno a uno) proporciona una idea de cuál es el comportamiento cromatográfico de los solutos al variar las condiciones experimentales. Sin embargo, para obtener una visión general de la tendencia de comportamiento y conocerlo con detalle, es mucho más práctico extraer la información relevante (i.e., tiempos de retención y semianchuras de pico) de algunos cromatogramas correspondientes a un diseño experimental, y estructurarla en unos gráficos. En esta sección y en la siguiente, se muestran diversos gráficos que indican las tendencias observadas para la retención y perfil de los picos de los compuestos estudiados, al variar la concentración de Brij-35 y acetonitrilo, tanto en elución isocrática como en gradiente.

a) Elución isocrática

En la Figura 6.4, se representa la retención (expresada como el logaritmo del factor de retención, $\ln k$) de algunos de los compuestos de prueba, eluidos con fases móviles de acetonitrilo en presencia de Brij-35 0.01 M (Figuras 6.4a,c) y en su ausencia (Figuras 6.4b,d), para los conjuntos de sulfonamidas y flavonoides, en función de la concentración de modificador, φ . En todos los casos, la tendencia de las líneas de los gráficos se puede describir mediante un polinomio:

$$\ln k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (6.1)$$

donde c_0 , c_1 y c_2 son parámetros de ajuste.

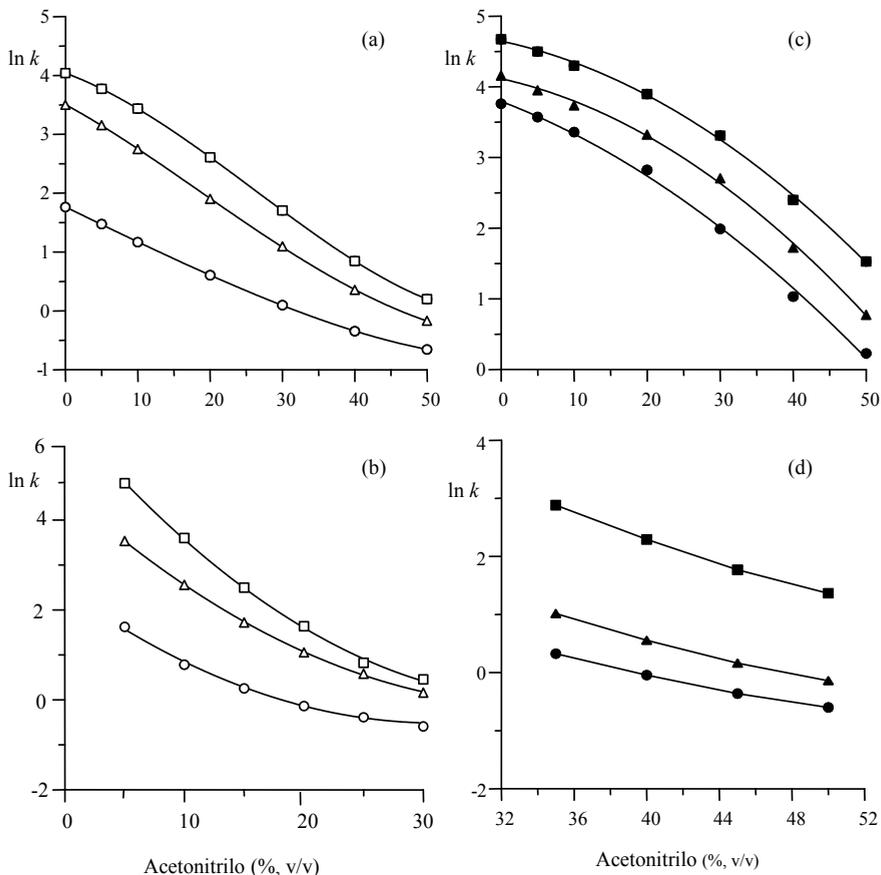


Figura 6.4. Gráficos de retención, expresada como $\ln k$, para la elución isocrática a diferentes concentraciones de acetonitrilo, en presencia (a,c) y ausencia (b,d) de Brij-35, para las sulfonamidas (a,b) y los flavonoides (c,d). Compuestos: sulfamerazina (○), sulfisoxazol (△), sulfaquinoxalina (□), fisetina (●), quercetina (▲) y crisina (■).

Es posible predecir el factor de retención para cualquier concentración de acetonitrilo a partir de la Ecuación (6.1), una vez ajustada con los datos de un diseño experimental. Llama la atención que la tendencia cóncava de los gráficos en medios acuo-orgánicos (Figuras 6.4b,d) se modifica significativamente cuando existe Brij-35 en la fase móvil, dando lugar a gráficos sigmoidales (para las sulfonamidas, Figura 6.4a), o convexos (para los flavonoides, Figura 6.4c). En ausencia de Brij-35, los factores de retención a concentraciones inferiores a las representadas son muy elevados. Para ambos conjuntos de compuestos, en presencia de Brij-35, la fuerza eluyente fue relativamente baja (i.e., la pendiente de la curva es pequeña) con las primeras adiciones de acetonitrilo, lo que se puede explicar al menos parcialmente por la estabilización del disolvente orgánico por las micelas presentes en la fase móvil. Al añadir más disolvente orgánico, la fuerza eluyente es similar a la observada en el medio acuo-orgánico (al menos para las sulfonamidas), debido al exceso de disolvente orgánico y a la ausencia de micelas del surfactante.

Por su parte, en MLC, el comportamiento de retención al variar la concentración del surfactante ($[M]$) se suele describir mediante el inverso del factor de retención en función de $[M]$, que conduce a una sencilla representación lineal [6]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}}{K_{AS}} [M] \quad (6.2)$$

La Ecuación (6.2) proporciona información sobre la intensidad de las interacciones entre el soluto y el surfactante en la fase estacionaria o móvil: K_{AS} y K_{AM} son las constantes de asociación soluto-fase estacionaria y soluto-micela, respectivamente. Las Figuras 6.5a y c describen el comportamiento en fases móviles puramente micelares. En las Figuras 6.5b y

d, con propósitos comparativos, se ha representado la retención de los compuestos estudiados (esta vez expresándola como $1/k$), al variar la concentración de acetonitrilo en una fase móvil que contiene Brij-35 0.01 M.

Se puede observar que las líneas rectas obtenidas para las sulfonamidas sulfisoxazol y sulfaquinoxalina, y para los tres flavonoides, pasan por el origen de coordenadas o cerca de él (también las de las sulfonamidas sulfametoxina y sulfadimetoxina, cuyo comportamiento no se muestra). Esto indica que la interacción de los solutos con la fase estacionaria es muy intensa (i.e., el valor de K_{AS} es muy elevado). La interacción de las sulfonamidas menos retenidas (sulfamerazina y sulfametazina) es mucho más débil. Debe comentarse que estos compuestos son más polares y ambos contienen un anillo pirimidín-2-il.

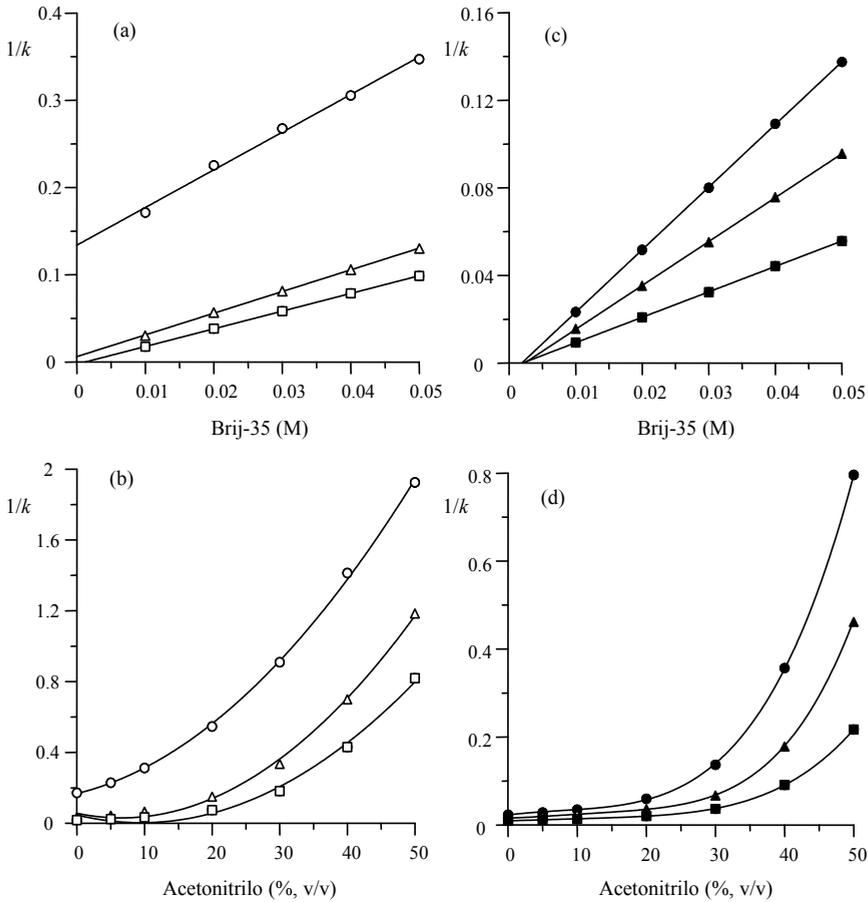


Figura 6.5. Gráficos de retención, expresada como $1/k$, para la elución isocrática a diferentes concentraciones de Brij-35 (a,c) y acetonitrilo (b,d). Consúltese la identidad de los picos en la Figura 6.4.

b) Elución en gradiente

En elución en gradiente, el número de variables a considerar es mayor que en elución isocrática. Éstas son al menos las concentraciones inicial y final del modificador, y la pendiente o el tiempo del gradiente (t_G) [36–38]. De ahí que se puedan realizar varios tipos de representaciones para describir la retención. En este trabajo, para ilustrar el comportamiento de retención al aplicar gradientes, se ha optado por representar el cambio en el factor de retención frente a la pendiente del gradiente, m , para un determinado intervalo de modificador. El valor $m = 0$ se corresponde con la elución isocrática utilizando una fase móvil que sólo contiene Brij-35 0.01 M.

Las Figuras 6.6a y c muestran la variación del factor de retención para las sulfonamidas y los flavonoides, respectivamente, cuando se aplican gradientes de Brij-35 en el intervalo 0.01–0.05 M, y tiempos de gradiente de 40 ($m = 0.001$) y 20 ($m = 0.002$) min. Las Figuras 6.6b y d se han obtenido con los datos de una sulfonamida (sulfadimetoxina) y un flavonoide (fisetina), respectivamente, eluidas con diversos tipos de gradientes, en los que se incrementa la concentración de acetonitrilo y la de Brij-35 se mantiene constante, se aumenta o disminuye. Aunque el comportamiento de las sulfonamidas y los flavonoides es distinto, para ambos tipos de compuestos, las mayores variaciones se producen al pasar del modo isocrático ($m = 0$) a gradientes de acetonitrilo con $m = 0.1$. En el caso de los flavonoides, los cambios en la retención son poco apreciables por encima de $m = 0.5$.

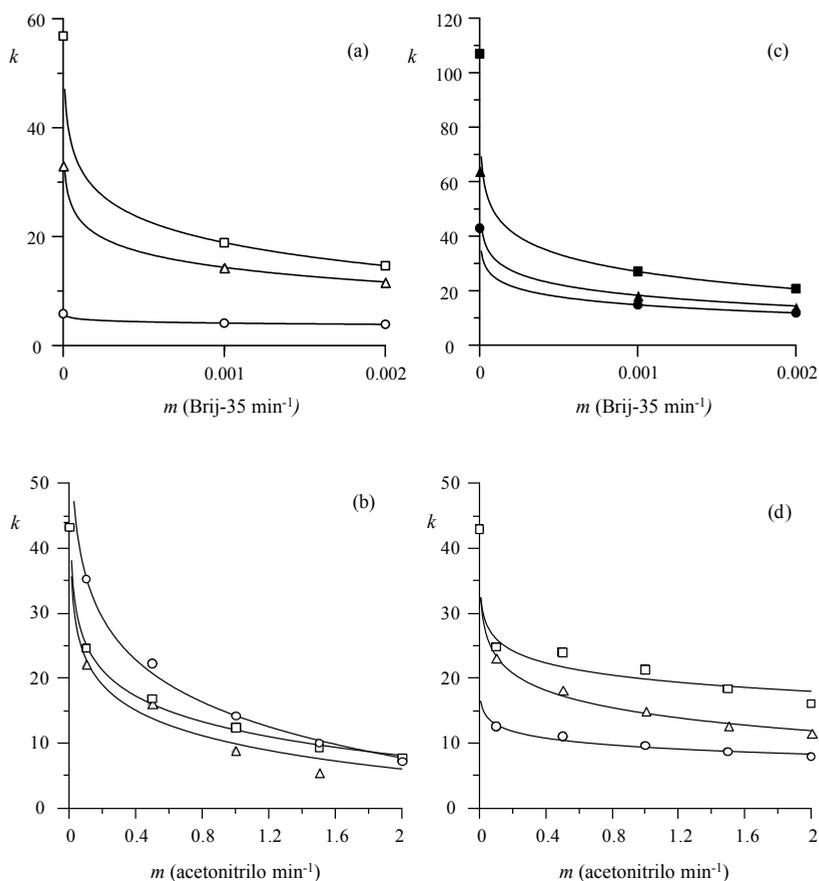


Figura 6.6. Gráficos de retención, expresados como k versus la pendiente del gradiente m , para: (a,c) Gradientes a 25°C donde la concentración de Brij-35 se incrementó en el intervalo 0.01–0.05 M, (b,d) gradientes donde la concentración de acetonitrilo se incrementó en el intervalo 0–40% v/v y la concentración de Brij-35 se mantuvo constante a 0.01 M (○), se incrementó en el intervalo 0.01–0.05 M (Δ) o disminuyó en el intervalo 0.05–0.01 M (□). Compuestos: (a) sulfamerazina (○), sulfisoxazol (Δ), sulfaquinoxalina (□), (b) sulfadimetoxina, (c) fisetina (●), quercetina (▲) y crisina (■), y (d) fisetina. En todos los casos, los puntos sobre el eje Y corresponden a elución isocrática con Brij-35 0.01 M.

6.4.4 Descripción del perfil de pico

a) Elución isocrática

Los gráficos que representan las semianchuras de pico frente al tiempo de retención, a los que se ha denominado gráficos de semianchura [39,40], permiten conocer los cambios que se producen en la anchura y asimetría de los picos al eluir los solutos dentro de una columna cromatográfica. Los modelos que describen los gráficos son parabólicos:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (6.3)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (6.4)$$

aunque, como se verá, en intervalos suficientemente estrechos pueden asimilarse a la ecuación de una recta.

Las Figuras 6.7 y 6.8 muestran los gráficos de semianchura para el conjunto de sulfonamidas y flavonoides, en elución isocrática, al variar la concentración de Brij-35 y acetonitrilo, respectivamente. En todos los casos, los gráficos muestran tendencias de comportamiento claras.

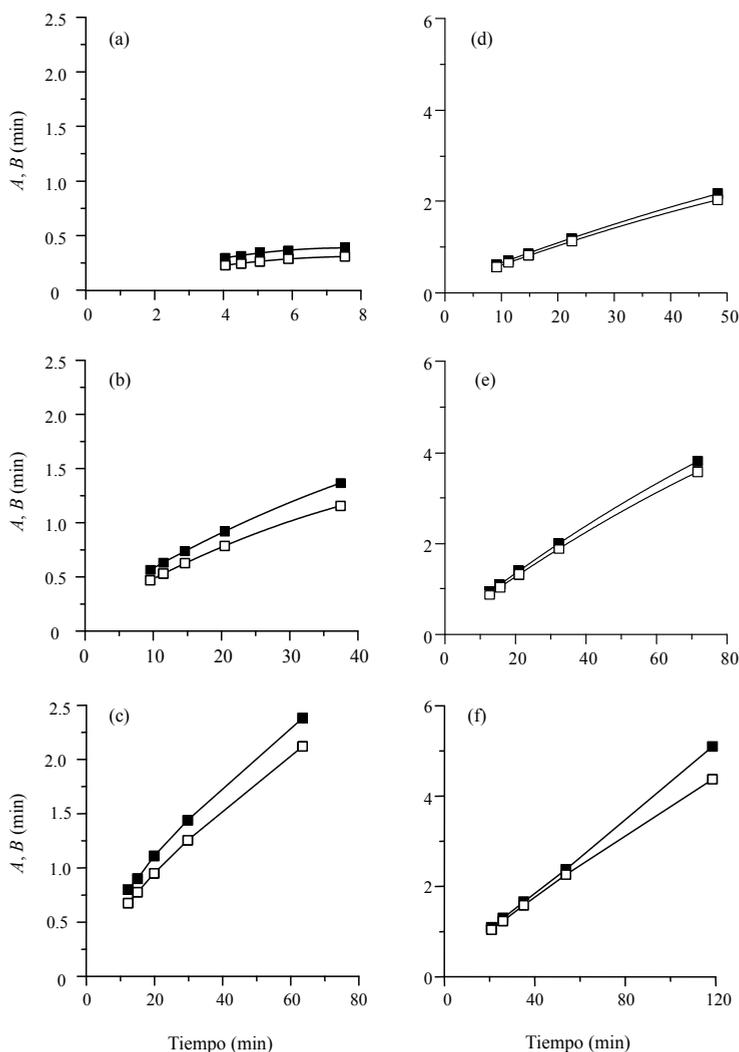


Figura 6.7. Gráficos de semianchura de pico en elución isocrática variando la concentración de Brij-35. Los datos representados corresponden a las siguientes concentraciones de Brij-35: 0.01 (extremo superior de retención), 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 M (extremo inferior). Compuestos: (a) sulfamerazina, (b) sulfisoxazol, (c) sulfaquinoxalina, (d) fisetina, (e) quercetina, y (f) crisina. Semianchura izquierda (A , \square) y semianchura derecha (B , \blacksquare).

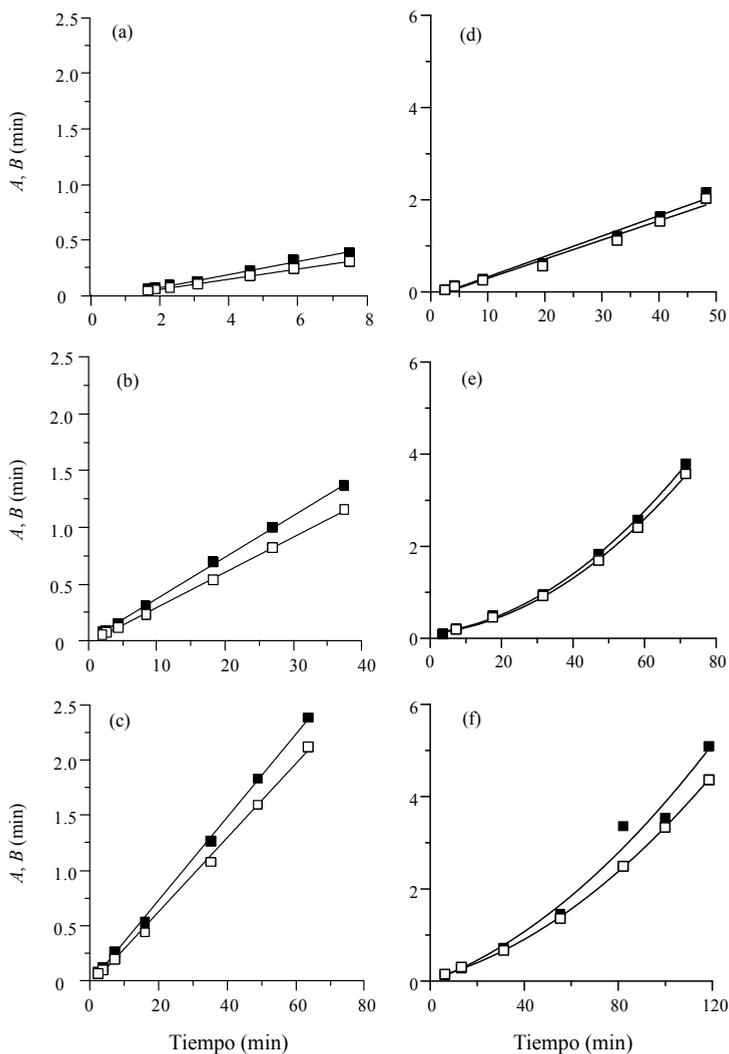


Figura 6.8. Gráficos de semianchura de pico en elución isocrática variando la concentración de acetonitrilo y manteniendo fija la concentración de Brij-35 (0.01 M). Los datos representados corresponden a las siguientes concentraciones de acetonitrilo (v/v): 5% (extremo superior de retención), 10%, 20%, 30%, 40% y 50% (extremo inferior). Para otros detalles, consúltese la Figura 6.7.

Para todos los compuestos, la pendiente de la línea que representa la semianchura derecha (B) es sólo ligeramente mayor, indicando que los picos

de las sulfonamidas y los flavonoides son prácticamente simétricos para todas las condiciones del diseño experimental. Por otro lado, los gráficos correspondientes a la variación de Brij-35 son líneas rectas (o prácticamente rectas) para los flavonoides, y convexas para las sulfonamidas. Por su parte, el cambio en la concentración de acetonitrilo linealiza el comportamiento de las sulfonamidas y da lugar a variaciones cóncavas para los flavonoides.

Por lo tanto, para los flavonoides, la disminución de las anchuras de los picos es mayor para las primeras adiciones del surfactante y disolvente orgánico (debe tenerse en cuenta que una concentración creciente de los modificadores disminuye la retención). Para valorar estos resultados, se debe considerar que el intervalo de variación en estas experiencias fue de 0.01 a 0.05 M para el Brij-35, y de 0.96 M a 9.57 M para el acetonitrilo (que se corresponde con el intervalo 5–50% v/v).

b) Elución en gradiente

De acuerdo a Jandera y Churáček [41], la anchura de un pico al aplicar un gradiente se corresponde aproximadamente con la anchura de un pico en elución isocrática, si el soluto eluyera utilizando la composición del gradiente cuando el máximo del pico del soluto alcanza la salida de la columna. Por lo tanto, las Ecuaciones (6.3) y (6.4) son también válidas para describir el perfil de los picos en elución en gradiente, siempre que se conozca el tiempo de retención instantáneo a la salida de la columna. En la Figura 6.9, se comparan las semianchuras en los modos isocrático y de gradiente para los dos conjuntos de compuestos de prueba. Nótese que se ha utilizado el tiempo de retención en gradiente para construir los gráficos. Puesto que, como se ha comentado, los

picos son sólo ligeramente asimétricos en las fases móviles de Brij-35, se ha preferido en esta ocasión representar la anchura frente al tiempo de retención.

Los gráficos de las Figuras 6.9a y d corresponden a la elución isocrática para las sulfonamidas (se han representado los valores de semianchura para las seis sulfonamidas incluidas en este estudio) y los flavonoides, respectivamente. Como se observa, el comportamiento es perfectamente lineal para las sulfonamidas, mientras que los flavonoides muestran una dispersión apreciable, lo que de acuerdo a un estudio anterior debe explicarse por las diferencias en el comportamiento cinético de interacción de los flavonoides con la fase estacionaria modificada con Brij-35, lo que depende de la posición de los sustituyentes oxhidrilo en los anillos bencénicos de los flavonoides [25]. Por su parte, el alineamiento perfecto observado para las sulfonamidas en la Figura 6.9a indica que la cinética de interacción de los seis compuestos con la fase estacionaria modificada es similar.

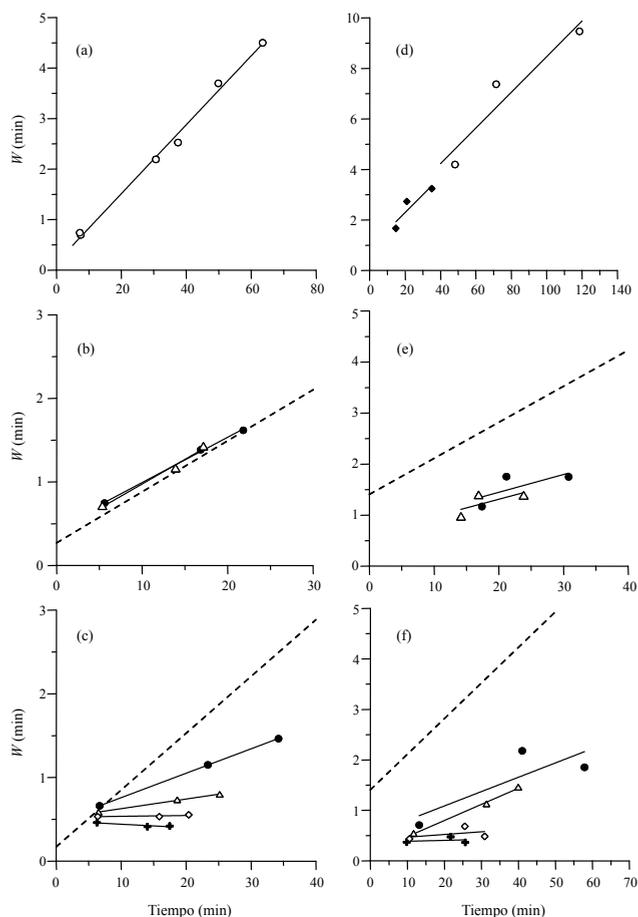


Figura 6.9. Gráficos de anchura de pico correspondientes a diversos programas de gradiente (m) para: (a,d) elución isocrática ($m = 0$), utilizando Brij-35 0.01 M (\circ) y 0.03 M (\blacklozenge); (b,e) gradiente de Brij-35 con $m = 0.001$ (\bullet) y 0.002 (Δ); y (c,f) gradiente de acetonitrilo manteniendo constante la concentración de surfactante (0.01 M) con $m = 0.5$ (\bullet), 1.0 (Δ), 1.5 (\diamond) y 2.0 ($+$). En (b, c, e y f), la línea punteada (- -) representa el comportamiento en elución isocrática con Brij-35 0.01 M. Compuestos: (a) sulfamerazina, sulfametazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina, (b,c) sulfamerazina, sulfisoxazol y sulfaquinoxalina, y (d-f) fisetina, quercetina y crisina.

Por otra parte, la ordenada en el origen de las rectas mostradas en la Figura 6.9 es significativamente distinta de cero (especialmente para los flavonoides), lo que indica que los picos poseen una anchura apreciable en las proximidades del tiempo muerto. Con las fases móviles acuo-orgánicas, los picos que eluyen cerca del tiempo muerto son mucho más estrechos (véase la línea a trazos inferior en la Figura 6.10d, que virtualmente pasa por el origen). Este comportamiento puede interpretarse debido a que el Brij-35 se asocia al material PEEK de los tubos que unen el inyector con la columna, y el soluto de alguna forma interacciona con él previamente a la entrada en la columna. Ésta también debe ser la razón del mayor valor de los tiempos de retención de los solutos menos retenidos en presencia de Brij-35. El efecto se observa también con el surfactante SDS, pero es más acusado con Brij-35.

Para evaluar el efecto observado con diversos gradientes, se ha representado en línea de trazos el comportamiento para la fase móvil isocrática de Brij-35 0.01 M, en los gráficos de las Figuras 6.9b,c,e,f y 6.10 (en estas figuras, sólo se han representado los datos para sulfameracina, sulfisoxazol y sulfaquinoxalina, junto a los de los tres flavonoides). Según se observa, al aplicar un gradiente de Brij-35 (Figuras 6.9b,e), para las sulfonamidas las anchuras de los picos fueron similares (o algo mayores) a las obtenidas en elución isocrática con Brij-35 0.01 M, mientras que para los flavonoides disminuyeron apreciablemente.

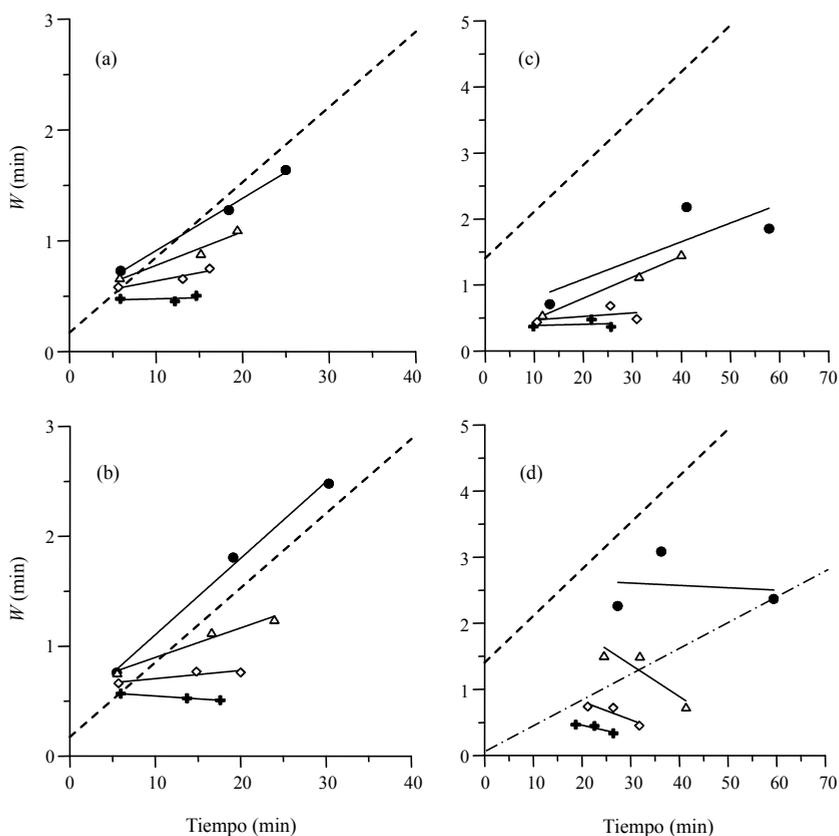


Figura 6.10. Gráficos de anchura de pico para: (a,c) gradientes en los que el Brij-35 y el acetonitrilo se incrementan simultáneamente, y (b,d) gradientes en los que el acetonitrilo se incrementa y el Brij-35 disminuye. Pendientes de los gradientes de acetonitrilo: $m = 0.5$ (\bullet), 1.0 (Δ), 1.5 (\diamond) y 2.0 ($+$). Pendientes para los gradientes de Brij-35: (a,c) $m = 4 \times 10^{-4}$ (\bullet), 8×10^{-4} (Δ), 1.2×10^{-3} (\diamond) y 1.6×10^{-3} ($+$), y (b,d) $m = -1 \times 10^{-4}$ (\bullet), -2×10^{-4} (Δ), -3×10^{-4} (\diamond) y -4×10^{-4} ($+$). La línea discontinua (- - -) representa el comportamiento en elución isocrática con Brij-35 0.01 M. En (d), se representa (-.-.-) el comportamiento en isocrático con una fase móvil acuo-orgánica conteniendo 28% v/v de acetonitrilo. Compuestos: (a,b) sulfamerazina, sulfisoxazol y sulfaquinoxalina, y (c,d) fisetina, quercetina y crisina.

Por su parte, al aplicar un gradiente de acetonitrilo (Figuras 6.9c,f), manteniendo constante la concentración del surfactante, se observaron disminuciones significativas en la anchura de los picos cromatográficos, mayores al aumentar la pendiente del gradiente (la velocidad de cambio de la concentración de acetonitrilo). Conclusiones similares se obtienen para los gradientes simultáneos de Brij-35 y acetonitrilo (Figura 6.10). De nuevo se observa el comportamiento perfectamente lineal con las sulfonamidas, mientras que los flavonoides muestran una dispersión importante. Debe resaltarse también el enorme efecto de la pendiente del gradiente sobre el perfil de los flavonoides eluidos al utilizar gradientes en los que se disminuye la concentración de Brij-35 y se incrementa la de acetonitrilo.

6.5. Conclusiones

Este trabajo posee el objetivo global de explorar las posibilidades del Brij-35 como modificador en MLC en elución isocrática y en gradiente. Para observar el comportamiento de un sistema cromatográfico que utiliza fases móviles con Brij-35, en cuanto a la retención y el perfil de los picos que se obtienen, se han trazado diversos gráficos que muestran las tendencias de comportamiento para dos familias de compuestos con distinto intervalo de polaridad y estructura. Estos gráficos muestran las tendencias de comportamiento más claramente que el examen directo de los cromatogramas.

Los resultados obtenidos muestran dos estrategias interesantes en MLC con Brij-35: el trabajo con eluyentes que contengan únicamente Brij-35 en elución isocrática y en gradiente, lo que representa un tipo de "cromatografía verde" (cromatografía con agua y detergente), y la elución con gradientes de acetonitrilo, manteniendo constante la concentración de Brij-35. La posibilidad

de utilizar fases móviles puramente micelares de Brij-35 contrasta con el empleo de SDS en MLC, que requiere casi siempre la adición de un disolvente orgánico. Con SDS, sólo compuestos muy polares (como algunas tiazidas) pueden ser eluidos con una fase móvil puramente micelar de SDS [42]. Por otro lado, trabajando con eluyentes puramente micelares, la temperatura es otra variable a considerar, puesto que disminuye los tiempos de análisis y especialmente la anchura de los picos [25].

Respecto a la segunda estrategia (incremento en la concentración de acetonitrilo, fijando la concentración de Brij-35), lo más sobresaliente es la reducción importante de las anchuras de los picos en elución isocrática, y en mayor medida en elución en gradiente. Las elevadas eficacias permiten incrementos importantes en la resolución. Además, el Brij-35 ofrece una selectividad particular y afecta a la retención global. Esta estrategia es especialmente interesante para el análisis de fármacos en líquidos fisiológicos. En este caso, la muestra se podría inyectar en un medio puramente micelar de Brij-35, y una vez eluidas las proteínas de la muestra, se aplicaría un gradiente de acetonitrilo para aumentar la fuerza eluyente lo que permitiría tiempos de retención cortos para todos los analitos [43], tal como se ha mostrado en el Capítulo 4. La posibilidad de modelizar los comportamientos facilita enormemente la puesta a punto de estas metodologías.

6.6. Referencias

- [1] D.W. Armstrong, S.J. Henry, *Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons via HPLC*, J. Liq. Chromatogr. 3 (1980) 657–662.
- [2] A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Separation Science Series (editada por J. Cazes), Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [3] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *New insights and recent developments in micellar liquid chromatography*, Sep. Purif. Rev. 38 (2000) 45–96.
- [4] E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández, M.C. García Álvarez-Coque, *On the direct injection of urine samples in micellar liquid chromatography*, Quim. Anal. 12 (1993) 167–172.
- [5] M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Direct injection of physiological fluids in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. B 736 (1999) 1–18.
- [6] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 780 (1997) 129–148.
- [7] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Global treatment of chromatographic data with MICHROM*, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 187–196.
- [8] J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *A three-factor optimisation strategy for micellar liquid chromatography*, Chromatographia 51 (2000) 101–110.
- [9] M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography: Suitable technique for screening analysis*, J. Chromatogr. A 947 (2002) 31–45.
- [10] J.S. Landy, J.G. Dorsey, *Rapid gradient capabilities of micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. Sci. 22 (1984) 68–70.

-
- [11] J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, J.S. Landy, J.L. Lin, *Gradient elution micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr, 316 (1984) 183–191.
- [12] L.S. Madamba-Tan, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *Gradient elution in micellar liquid chromatography. Part I: Micelle concentration gradient*, J. Chromatogr. A 683 (1994) 321–334.
- [13] L.S. Madamba, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *Gradient elution in micellar liquid chromatography. Part II: Organic modifier gradients*, J. Chromatogr. A 683 (1984) 335–345.
- [14] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, *Characterization and evaluation of the use of non-ionic polyoxyethylene(23)dodecanol [Brij-35] micellar mobile phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Anal. Chem. 57 (1985) 2183–2190.
- [15] M.F. Borgerding, F.H. Quina, W.L. Hinze, J. Bowermaster, H.M. McNair, *Investigation of the retention mechanism in non-ionic micellar liquid chromatography using an alkylbenzene homologous series*, Anal. Chem. 60 (1988) 2520–2527.
- [16] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp Jr., W.C. Hamlin Jr., *Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem. 61 (1989) 1353–1358.
- [17] L.J. Cline-Love, J.J. Fett, *Optimization of selectivity in MLC procedures for the determination of drugs in urine by direct injection*, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 323–333.
- [18] M.L. Marina, O. Jiménez, M.A. García, S. Vera, *Study of the separation selectivity of a group of benzene and naphthalene derivatives in micellar liquid chromatography*, Microchem. J. 53 (1996) 215–224.
- [19] P. Menéndez Fraga, A. Blanco González, A. Sanz Medel, J.B. Cannata Andia, *Micellar versus reversed-phase liquid chromatography for the determination of desferrioxamine and its chelates with aluminium and iron in uremic serum*, Talanta 45 (1997) 25–33.
-

- [20] M. Gil Agustí, L. Álvarez Rodríguez, L. Monferrer Pons, D. Bose, A. Durgbanshi, J. Esteve Romero, *Chromatographic determination of carbaryl and other carbamates in formulations and water using Brij-35*, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1721–1734.
- [21] N. Memon, M. Iqbal Bhangar, M.Y. Khuhawer, *Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography*, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 635–638.
- [22] A. Berthod, S. Tomer, J.G. Dorsey, *Polyoxyethylene alkyl ether non-ionic surfactants; physicochemical properties and use for cholesterol determination in food*, *Talanta* 55 (2001) 69–83.
- [23] M.C. García Álvarez-Coque, M.J. Ruiz Ángel, *Comparison of non-ionic and anionic surfactants as mobile phase additives in RPLC analysis of basic drugs*, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 623–630.
- [24] J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Reversed-phase liquid chromatography without organic solvent for determination of tricyclic antidepressants*, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1303–1309.
- [25] J.J. Baeza Baeza, Y. Dávila, J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, *Measurement of the elution strength and peak shape enhancement at increasing modifier concentration and temperature in RPLC*, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2973–2984.
- [26] T.A. Biemer, *Simultaneous analysis of acetaminophen, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a cold tablet using an isocratic, mixed micellar HPLC mobile phase*, *J. Chromatogr.* 410 (1987) 206–210.
- [27] M.R. Hadjmohammadi, P. Ebrahimi, *Optimization of the separation of anticonvulsant agents in mixed micellar liquid chromatography by experimental design and regression models*, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 141–148.
- [28] P. Ebrahimi, M.R. Hadjmohammadi, *Simultaneous optimization of resolution and analysis time in mixed micellar liquid chromatography of*

- coumarins by use of a utility function*, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 851–858.
- [29] J. Sun, J. Mao, X. Liu, Y. Wang, Y. Sun, Z. He, *Separation and mechanism elucidation for six structure-like matrine-type alkaloids by micellar liquid chromatography*, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2043–2050.
- [30] L. Escuder Gilabert, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *Quantitative retention-structure and retention-activity relationship studies of local anesthetics by micellar liquid chromatography*, *Anal. Chem.* 70 (1998) 28–34.
- [31] M. Molero Monfort, Y. Martín, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport*, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 1–11.
- [32] M. Molero Monfort, Y. Martín, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *Role of hydrophobicity on the monoamine receptor binding affinities of central nervous system drugs: A quantitative retention-activity relationships analysis using biopartitioning micellar chromatography*, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 185–198.
- [33] W. Thogchai, B. Liawruangrath, *Micellar liquid chromatographic determination of arbutin and hydroquinone in medicinal plant extracts and commercial cosmetic products*, *Int. J. Cosmetic Sci.* 35 (2013) 257–263.
- [34] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *High submicellar liquid chromatography*, *Sep. Purif. Rev.* 43 (2014) 124–154.
- [35] J.W. Dolan, *Gradient elution, Part V: Baseline drift problems*, *LC GC North America* 31 (2013) 538, 540, 542, 543.
- [36] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [37] J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 28–35.

- [38] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Some insights on the description of gradient elution in reversed phase-liquid chromatography*, J. Sep. Sci. 37 (2014) 2269–2277.
- [39] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786–1798.
- [40] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Half-width plots, a simple tool to predict peak shape, reveal column kinetics and characterise chromatographic columns in liquid chromatography: State of the art and new results*, J. Chromatogr. A 1314 (2013) 142–153.
- [41] P. Jandera, J. Churáček, *Gradient elution in liquid chromatography: II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography-theoretical considerations*, J. Chromatogr. 91 (1974) 223–235.
- [42] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *Liquid chromatographic determination of some thiazide diuretics in pharmaceuticals with a sodium dodecyl sulfate mobile phase*, Analyst 123 (1998) 301–306
- [43] J. Rodenas Montano, C. Ortiz Bolsico, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Optimisation of gradient elution of organic solvent in micellar liquid chromatography using Drylab: Screening of β -blockers in urine samples*, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 31–41.

CAPÍTULO 7

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSOS LÍQUIDOS
IÓNICOS DE IMIDAZOLIO COMO ADITIVOS EN
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE FASE INVERSA PARA LA
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BÁSICOS**

7.1. Summary

In reversed-phase liquid chromatography in the absence of additives, cationic basic compounds give rise to broad and asymmetrical peaks as a result of ionic interactions with residual free silanols on silica-based stationary phases (typically C₁₈ or C₈). Ionic liquids (ILs), added to the mobile phase, have been suggested as alternatives to amines to block the activity of silanols. However, the dual character of ILs should be considered: both cation and anion may be adsorbed on the stationary phase, thereby creating a double asymmetrical layer positively or negatively charged, depending on the relative adsorption of both ions. In this work, a study of the performance of six imidazolium-based ILs (the chlorides and tetrafluoroborates of 1-ethyl-, 1-butyl- and 1-hexyl-3-methylimidazolium) as modifiers of the chromatographic behaviour of a group of 10 β -blockers is performed, and compared with triethylamine and dimethyloctylamine. The changes in the nature of the chromatographic system, at increasing concentration of the additives, were followed based on the changes in the retention and peak shape of the β -blockers. The study revealed that those additives able to protect the silanols by direct interaction are less efficient, while those which mask the effect by coating the stationary phase dramatically improve the peak shape and reduce the retention with respect to aqueous-organic mobile phases in the absence of additive. Also, the multiple interactions that ILs and amines experience inside the chromatographic system indicate that the suppressing potency should be measured based on the shape of chromatographic peaks and not on the changes in retention. The ILs 1-hexyl-3-methyl-imidazolium chloride and tetrafluoroborate offered the most interesting features for the separation of the basic drugs.

7.2. Introducción

Los líquidos iónicos son sales constituidas por un catión orgánico voluminoso, tal como alquil-imidazolio, piridinio, amonio o fosfonio, y una variedad de aniones orgánicos, tales como triflato, dicianamida, acetato, trifluoroacetato, trifluorometilsulfato, o inorgánicos como bromuro, cloruro, nitrato, perclorato, cloroaluminato, tetrafluoroborato o hexafluorofosfato [1–6]. En general, estos compuestos se caracterizan por poseer un punto de fusión bajo, habitualmente inferior a 100°C, y en muchos casos, incluso por debajo de la temperatura ambiente, por lo que a temperaturas próximas a 25°C se encuentran en estado líquido.

Por su naturaleza, los líquidos iónicos pueden considerarse como sales o como disolventes. Como disolventes, poseen una naturaleza no molecular con una serie de características interesantes: baja volatilidad e inflamabilidad, una supuesta baja toxicidad y una elevada estabilidad térmica [1,5-10]. Precisamente, estas propiedades son las que han determinado que los líquidos iónicos sean conocidos como disolventes "verdes" y, aunque no existen estudios concluyentes [8–10], lo cierto es que desde la década de los 90 se han considerado como una alternativa seria para reemplazar a los disolventes orgánicos contaminantes utilizados en los laboratorios, lo que se ha conseguido en muchas ocasiones con éxito.

En Química Analítica, los líquidos iónicos se utilizan en cromatografía de gases, electroforesis capilar y cromatografía líquida. En cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), se introducen en la fase móvil como aditivos (i.e., sales) para bloquear la actividad de los grupos silanol (o silanoles) presentes en las fases estacionarias alquil-enlazadas tradicionales (C₁₈ o C₈) [11–23]. En RPLC, los solutos se separan principalmente en base al establecimiento de interacciones hidrofóbicas con la

capa alquil-enlazada de la fase estacionaria, en combinación con la fuerza solubilizadora del disolvente orgánico en la fase móvil. En ausencia de aditivos, si los solutos poseen carga positiva, se establecen interacciones adicionales de intercambio iónico con los silanoles residuales en el empaquetamiento de sílice, dando lugar a incrementos en la retención. Estas interacciones se caracterizan además por una cinética lenta, lo que produce picos anchos y asimétricos [24–28]. Dado que el pH habitual de la fase móvil en RPLC, con columnas convencionales, suele ajustarse entre 3 y 7, la mayoría de compuestos que poseen carácter básico se encuentran protonados al pH de trabajo, y por lo tanto, se ven afectados de forma significativa por los silanoles residuales. El interés en el estudio del efecto enmascarante de los silanoles en RPLC se debe, en gran parte, al hecho de que numerosos compuestos de interés farmacéutico poseen grupos de nitrógeno básicos en su estructura, lo que dificulta el desarrollo de métodos para su análisis.

El diseño de estrategias orientadas a eliminar o minimizar en la medida de lo posible el efecto de los silanoles residuales sobre los compuestos catiónicos, en RPLC, es un tema de interés para los cromatografistas, al que se ha dedicado mucho esfuerzo en las últimas décadas. Una de las soluciones propuestas se ha dirigido hacia el diseño y posterior comercialización de columnas manufacturadas con sílice "ultrapura", junto a la mejora en la tecnología empleada en los empaquetamientos. Con las columnas desactivadas, la influencia de los silanoles residuales sobre la retención de los compuestos básicos es menos pronunciada, pero no se elimina completamente, puesto que siguen obteniéndose picos anchos con colas, incluso utilizando las columnas más modernas.

Una práctica muy eficaz para enmascarar el efecto de los silanoles es la adición de reactivos a la fase móvil (a los que se denomina "aditivos"), que son adsorbidos sobre la fase estacionaria, modificando sus propiedades. Experimentalmente, esta estrategia es sencilla de aplicar, ya que no requiere el uso de equipamientos o columnas con características especiales, sino que basta con añadir a la fase móvil acuo-orgánica tamponada una pequeña cantidad del enmascarante seleccionado. Entre los aditivos que se han utilizado para enmascarar los silanoles residuales, se encuentran las aminas, especialmente las terciarias de gran volumen. A pH ácido, éstas se encuentran cargadas positivamente, e interaccionan por atracción electrostática con los silanoles de la fase estacionaria cargados negativamente (Figura 7.1a). La parte hidrofóbica de la molécula puede también asociarse a las cadenas alquílicas enlazadas a la fase estacionaria de sílice, quedando los grupos amonio orientados hacia la parte exterior de la superficie. De esta forma, queda bloqueado el acceso a los grupos silanol, pero a cambio, la fase estacionaria puede quedar cargada positivamente, con lo que repele los compuestos básicos protonados, los cuales, a menos que su polaridad sea muy baja, eluyen a tiempos muy cortos, en ocasiones próximos al volumen muerto.

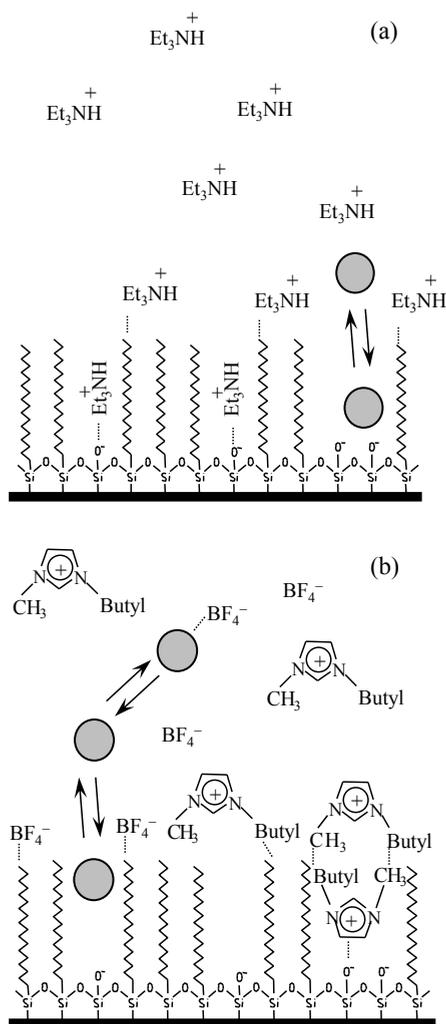


Figura 7.1. Representación simplificada de un sistema cromatográfico que contiene: (a) trietilamina (TEA), y (b) tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIM·BF₄). Se muestra la fase estacionaria con las cadenas C₁₈, a las que se asocian algunas moléculas del aditivo, así como moléculas libres del mismo.

El efecto reductor de los tiempos de retención se puede invertir mediante la adición a la fase móvil de aditivos aniónicos que sean capaces de adsorberse en mayor o menor medida sobre la fase estacionaria, de modo que ésta quede cargada negativamente. De esta forma, la retención de un compuesto catiónico sería la consecuencia de la combinación de un mecanismo mixto que comprende atracción electrostática con el anión adsorbido, reparto hidrofóbico y formación de pares iónicos con el anión en la fase móvil. El efecto neto es un aumento de la retención hasta alcanzar la saturación de la fase estacionaria, momento a partir del cual, en lugar de aumentar, disminuye progresivamente debido al desplazamiento del analito adsorbido por el contraión del aditivo o a la formación de pares iónicos entre el analito y el contraión en la fase móvil. Los aniones utilizados en RPLC suelen tener poca carga deslocalizada, elevada polarizabilidad y un grado de hidratación bajo. Entre ellos destacan PF_6^- , ClO_4^- , BF_4^- y Cl^- [29].

Entre los aditivos añadidos a la fase móvil, un caso particular lo constituye el surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulphate*), que se utiliza combinado con diferentes disolventes orgánicos (acetonitrilo, propanol, butanol, etc.) [30,31]. El SDS mejora significativamente la forma de los picos en el caso de compuestos de naturaleza básica. Sin embargo, se producen tiempos de retención demasiado largos, debido a la fuerte atracción de los solutos catiónicos al surfactante aniónico adsorbido. Esto requiere, con frecuencia, el uso de un disolvente fuerte, tal como butanol o pentanol, para lograr tiempos de análisis adecuados.

El mecanismo de retención de los líquidos iónicos es más complejo, en comparación a las aminas y al surfactante aniónico SDS, debido a su carácter dual [32]: ambos catión y anión en el líquido iónico pueden presentar afinidad

por la fase estacionaria, de modo que se crea una doble capa asimétrica cargada positiva o negativamente, dependiendo de la adsorción relativa del catión y del anión (Figura 7.1b).

En trabajos previos del grupo investigador [33,34], se realizó un estudio de la supresión del efecto silanol por parte de los líquidos iónicos de imidazolio, basado en la modelización de los cambios de retención y forma de los picos al incrementarse la concentración de los líquidos iónicos en la fase móvil. En ese estudio, se comparó el efecto de los líquidos iónicos asociados a los aniones tetrafluoroborato (BF_4^-) y hexafluorofosfato (PF_6^-) con el observado para trietilamina y SDS. Puesto que la supresión del efecto silanol de los cationes imidazolio parece ser dominante respecto a la del anión asociado, en este trabajo hemos extendido la investigación a los líquidos iónicos asociados al anión cloruro, que presenta una baja o nula afinidad por la fase estacionaria. Además, los resultados se comparan con los obtenidos con dos aminas de distinto tamaño (trietilamina y dimetiloctilamina), con el fin de profundizar en el conocimiento del comportamiento de los líquidos iónicos como supresores del efecto silanol.

7.3. Parte experimental

7.3.1. Reactivos

El estudio se realizó con los siguientes β -bloqueantes: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid), atenolol, carteolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol y timolol (todos adquiridos a Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) (Tabla 7.1). Se trata de compuestos que poseen un carácter básico, con una constante de disociación ácido-base $\text{p}K_a = 9-10$, por lo que al pH de trabajo (alrededor de 3) se encuentran totalmente protonados,

mostrando una carga positiva. Las disoluciones madre de los fármacos (con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$) se prepararon disolviendo los compuestos en unos pocos mililitros de acetonitrilo (Scharlau, Barcelona), con ayuda de un baño de ultrasonidos de Elmasonic (Singen, Alemania), y dilución con agua. Estas disoluciones permanecieron estables durante al menos dos meses a 4°C. Las disoluciones madre se diluyeron con agua antes de su inyección en el cromatógrafo a una concentración final de 20 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó uracilo (Acros Organics, Geel, Bélgica) como marcador del tiempo muerto.

Las fases móviles utilizadas a lo largo del trabajo contenían acetonitrilo (Scharlab) y uno de los siguientes líquidos iónicos: cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM·Cl), cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIM·Cl), cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIM·Cl), tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM·BF₄), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIM·BF₄) y tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIM·BF₄) (Sigma). Con fines comparativos, se prepararon también fases móviles que contenían trietilamina (TEA) y *N,N*-dimetiloctilamina (DMOA) (Sigma).

Tabla 7.1. Estructuras, constantes de disociación y coeficientes de reparto octanol-agua de los compuestos estudiados.

Compuesto	Estructura	pK_a^a	$\log P_{o/w}^b$	Compuesto	Estructura	pK_a^a	$\log P_{o/w}^b$
Acebutolol		9.12	1.83	Metoprolol		9.18	1.90
Atenolol		9.17	0.25	Nadolol		9.4	1.17
Carteolol		ND	1.42	Pindolol		9.21	1.91
Celiprolol		9.12	1.98	Oxprenolol		9.13	2.30
Esmolol		9.17	2.00	Timolol		8.86	1.98

^a Calculados con ACD/pK database 4.06 de Advanced Chemistry Development Corporation. ND: No determinado. ^b [35].

En todos los casos, las fases móviles se tamponaron a pH 3 con dihidrógenofosfato sódico 0.01 M (Sigma) y HCl. En base a estudios previos [33,34], se seleccionó como referencia una fase móvil que contenía una concentración fija de acetonitrilo del 15% v/v. A continuación, se añadió trietilamina o los líquidos iónicos EMIM·Cl, BMIM·Cl, HMIM·Cl, BMIM·BF₄ y HMIM·BF₄ a las siguientes concentraciones: 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 M. Alternativamente, se añadió el líquido iónico EMIM·BF₄ a las concentraciones 0.005, 0.01, 0.02 y 0.03 M, y DMOA a las concentraciones 0.00125, 0.0025, 0.005 y 0.01 M. Las concentraciones mínimas y máximas de estos aditivos en la fase móvil se seleccionaron de modo que se obtuviera suficiente retención para los β -bloqueantes más polares, y que ésta no fuera excesiva para los más apolares. Otros detalles pueden consultarse en el Capítulo 3.

7.3.2. Instrumentación y columna

Se utilizó un cromatógrafo de Agilent (Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba cuaternaria (Serie 1260), un muestreador automático (Serie 1200), un compartimento de columnas termostatzado (Serie 1100) a 25°C, un detector de fila de diodos, y una estación de control y adquisición de datos HPChemStation (Agilent, B.02.01). El tratamiento matemático se realizó con Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, EE.UU.). Los β -bloqueantes se detectaron a una longitud de onda de 254 nm, a excepción del timolol, para el que se utilizó 300 nm.

La columna cromatográfica fue una Kromasil C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) con las siguientes características: 150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μ m, carga de carbono del 20%, área superficial de 340 m²/g, y tamaño de poro de 100 Å. La columna se

conectó a una pre-columna similar de 30 mm de longitud. El caudal de fase móvil se fijó a 1 mL/min y se realizaron inyecciones duplicadas utilizando un volumen de inyección de 20 μ L.

7.4. Resultados y discusión

Aunque se han publicado varios artículos que tratan el tema de la mejora de la separación cromatográfica de los compuestos básicos mediante la adición de líquidos iónicos a la fase móvil, todavía no existen conclusiones firmes acerca de qué directrices deben considerarse para elegir el líquido iónico más adecuado en cada caso concreto. Por otra parte, no siempre que se proponen nuevos líquidos iónicos o se aplican los más habituales a nuevos compuestos, se profundiza en el estudio de los mecanismos de retención que tienen lugar, o se efectúan comparaciones respecto a los resultados obtenidos con otros tipos de aditivos o aplicando otras soluciones (e.g., fases estacionarias especialmente diseñadas). A continuación, se muestra el efecto de diversos líquidos iónicos que contienen el catión imidazolio sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos de un grupo de compuestos básicos.

Por otro lado, en trabajos previos realizados por el grupo de investigación, se ha hecho amplio uso de un grupo de β -bloqueantes como compuestos de prueba. Los β -bloqueantes son fármacos utilizados en el tratamiento de diversos trastornos cardiacos, existiendo un amplio conjunto de estos compuestos comercializados. Los β -bloqueantes poseen al menos un anillo aromático unido a una cadena alquílica lateral, que posee como grupo funcional un hidroxilo secundario y una amina (Tabla 7.1) [35,36]. Su marcado carácter básico e intervalo de polaridades, desde alta a intermedia, han sido de gran utilidad en el estudio del proceso separativo de los

compuestos básicos en el interior de las columnas de RPLC y para poner de manifiesto la mejora del perfil de los picos cromatográficos, al añadir aditivos a las fases móviles acuo-orgánicas. En los estudios que aquí se presentan, se ha utilizado un grupo de 10 β -bloqueantes como compuestos de prueba.

7.4.1. Efecto de las aminas sobre la separación de los β -bloqueantes

Las aminas protonadas han sido utilizadas tradicionalmente como aditivos en las fases móviles acuo-orgánicas, para la separación de compuestos básicos. Así, en primer lugar, se comprobó su efecto sobre el comportamiento cromatográfico al utilizar una columna Kromasil C₁₈. Las Figuras 7.2a y b representan los factores de retención del conjunto de β -bloqueantes cuando se eluyen con fases móviles que contienen acetonitrilo y TEA o DMOA, respectivamente. Los gráficos muestran que los cambios en la retención a concentraciones crecientes de TEA son pequeños, sin aparecer una tendencia clara.

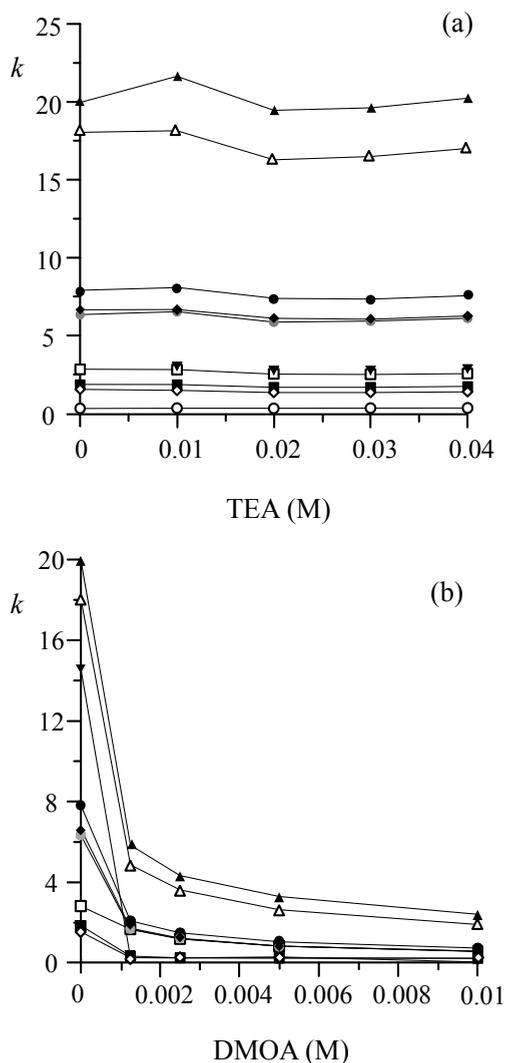


Figura 7.2. Variación de la retención de los β -bloqueantes, utilizando fases móviles acuo-orgánicas conteniendo 15% de acetonitrilo y concentraciones crecientes de: (a) TEA y (b) DMOA. Solutos: (◆) acebutolol, (○) atenolol, (◇) carteolol, (△) celiprolol, (▼) esmolol (●), metoprolol (■) nadolol, (▲) oxprenolol, (□) pindolol, y (●) timolol.

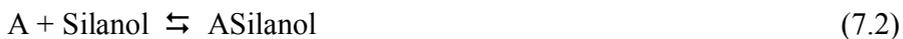
Por otro lado, la adición de una cantidad relativamente baja de DMOA (dentro de un intervalo de concentración estrecho entre 0.00125 y 0.01 M) produce a una reducción significativa de la retención de los β -bloqueantes, especialmente cuando la concentración de DMOA se halla por debajo de 0.002 M y para los β -bloqueantes más polares (celiprolol y oxprenolol).

No se han encontrado datos acerca de la cantidad de TEA^+ y DMOA^+ que se adsorbe sobre una fase estacionaria C_{18} , pero en un trabajo previo con líquidos iónicos de imidazolio [32] se encontró que la cantidad adsorbida de estos aditivos se incrementaba con la hidrofobicidad de la cadena alquílica del catión imidazolio, o con su concentración en la fase móvil. De acuerdo a este resultado, cabe esperar que la cantidad de DMOA^+ adsorbida sobre la fase estacionaria sea mayor que la de TEA^+ .

En trabajos pioneros llevados a cabo en los años 80 por Horváth et al. [37,38], se propuso un modelo para evaluar la potencia supresora de los grupos silanol por parte de aditivos amínicos, en base a la retención de un conjunto de solutos básicos. En ausencia de aditivo, la retención se describe mediante:

$$k_0 = k_1 + k_2 \quad (7.1)$$

donde k_0 es el factor de retención en ausencia de aditivo, y k_1 y k_2 las contribuciones hidrofóbica y silanofílica a la retención, respectivamente. Los silanoles (con un carácter aniónico) incrementan la retención de los grupos catiónicos. Cuando se añade un aditivo catiónico competidor a la fase móvil, se establece un equilibrio secundario con los grupos silanol:



por lo que el factor de retención en presencia de aditivo disminuye según:

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A [A]} \quad (7.3)$$

donde k es el factor de retención a una cierta concentración del aditivo, K_A supuestamente es la constante del equilibrio de asociación entre el silanol y el catión enmascarante, y $[A]$ la concentración molar del aditivo. Si se restan las Ecuaciones (7.1) y (7.3) para aislar la contribución silanofílica a la retención, se obtiene:

$$k_0 - k = k_2 - \frac{k_2}{1 + K_A [A]} = \frac{k_2 K_A [A]}{1 + K_A [A]} \quad (7.4)$$

La Ecuación (7.4) puede reordenarse para obtener la expresión conocida como ecuación de Horváth:

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2} \quad (7.5)$$

La constante de asociación K_A se ha utilizado para medir la habilidad de los aditivos para bloquear los grupos silanol, y puede obtenerse a partir de la regresión de $[A]/(k_0 - k)$ frente a $[A]$. En vista del comportamiento de retención observado con fases móviles que contienen TEA^+ (la retención no mostró una tendencia clara, y puede considerarse como prácticamente constante), no fue posible evaluar la potencia supresora de los silanoles (estimada como K_A) para este aditivo, usando la columna Kromasil C_{18} . Sin embargo, puede estimarse para DMOA^+ , que da lugar a una disminución significativa en la retención. Los valores de K_A obtenidos para cada β -bloqueante eluidos con fases móviles en presencia de DMOA^+ , y su vaor medio se recoge en la Tabla 7.2.

En trabajos anteriores del grupo investigador, se observó un comportamiento diferente para TEA^+ utilizando un conjunto de β -bloqueantes y una columna

Spherisorb ODS-2, para la cual la accesibilidad de los solutos básicos a los silanoles es más sencilla [39]. Con esta columna, la retención disminuyó sistemáticamente cuando la concentración de TEA⁺ se incrementó. En otro estudio, en el que se empleó una columna Kromasil C₁₈ envejecida, la retención de un grupo de β-bloqueantes disminuyó moderadamente con la primera adición de TEA⁺ (por debajo de 0.01 M), siendo prácticamente constante al seguir incrementando la concentración de TEA⁺ en la fase móvil [33].

7.4.2. Efecto de los líquidos iónicos de imidazolio sobre la separación de los β-bloqueantes

a) Efecto del catión

Tal como se ha indicado, los líquidos iónicos son considerados en la bibliografía como una alternativa seria a los aditivos amínicos en RPLC. Sin embargo, es frecuente seleccionar a estos reactivos sin tener en cuenta que el anión asociado a los mismos puede adsorberse sobre la fase estacionaria de forma moderada o intensa, afectando al comportamiento cromatográfico. También es posible que el anión interactúe con los solutos en la fase móvil, dando lugar a la formación de pares iónicos. Por lo tanto, el comportamiento de retención observado debe atribuirse al efecto combinado del catión y del anión.

Tabla 7.2. Potencia supresora de los silanoles libres, medida como K_A , para los compuestos básicos estudiados eluidos en presencia de DMOA y diversos líquidos iónicos de imidazolio.

	DMOA	BMIM·Cl	HMIM·Cl	BMIM·BF ₄	HMIM·BF ₄
Acebutolol	2645	147	1840	304	288
Atenolol	3461	–	–	–	–
Carteolol	1912	523	2455	125	667
Celiprolol	2990	171	1045	75	220
Esmolol	2287	239	1143	56	225
Metoprolol	2722	114	1475	61	276
Nadolol	–	120	–	66	500
Oxprenolol	2745	85	1176	42	226
Pindolol	4714	–	1919	–	–
Timolol	2388	86	1841	28	250
Valor medio	2875±820	185±145	1610±485	95±90	330±165

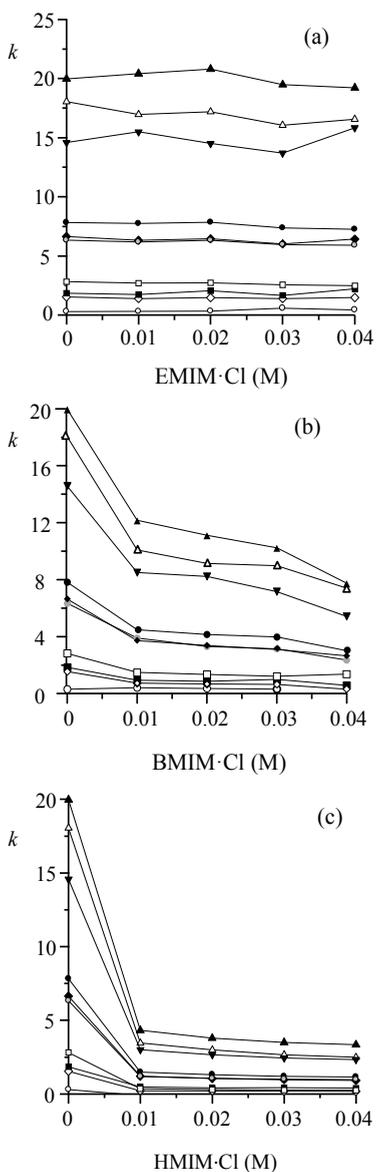


Figura 7.3. Variación de la retención de los β -bloqueantes utilizando fases móviles acuosas conteniendo 15% de acetonitrilo y concentraciones crecientes de: (a) EMIM·Cl, (b) BMIM·Cl y (c) HMIM·Cl. La identidad de los solutos se proporciona en la Figura 7.2.

Sólo en el caso en el que los aniones no muestren adsorción, el comportamiento debería ser similar al de las aminas voluminosas, como TEA⁺ y DMOA⁺. Con objeto de comprobar este último punto, se seleccionaron tres líquidos iónicos asociados al anión Cl⁻, constituidos por cationes imidazolio con cadenas laterales de hidrofobicidad creciente: EMIM⁺, BMIM⁺ y HMIM⁺. En disolución acuosa, el Cl⁻ se halla fuertemente hidratado y presenta una afinidad baja por la fase estacionaria. Utilizando una columna convencional Kromasil C₁₈ y una fase móvil conteniendo una concentración de acetonitrilo del 30% y NaCl 0.05 M, se encontró que la cantidad de Cl⁻ adsorbido era inferior a 2.5 μmol [32], por lo que se puede considerar que este anión no interviene en la separación cromatográfica, quedando así aislado el efecto del catión imidazolio.

En las Figuras 7.3a–c, se muestra el comportamiento de retención del conjunto de β-bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen los tres líquidos iónicos EMIM·Cl, BMIM·Cl y HMIM·Cl. Los resultados se comparan con los obtenidos con una fase móvil acuo-orgánica similar en ausencia de los aditivos. Como se observa, el mayor efecto se obtiene utilizando cationes de imidazolio con una cadena lateral larga (i.e. cationes de mayor tamaño). Los cambios fueron mínimos para EMIM·Cl.

Lo más destacable es que el ambiente de separación al añadir los líquidos iónicos es similar al encontrado al añadir TEA⁺ y DMOA⁺ (compárense las Figuras 7.2 y 7.3), lo que se puede deber a la combinación de interacciones:

- (i) La neutralización de los silanoles libres aniónicos por los cationes de amonio o de imidazolio, que dificulta la atracción electrostática de los compuestos básicos catiónicos hacia los silanoles,
- (ii) la asociación de los cationes de los aditivos a la fase estacionaria, que adquiere carga positiva por lo que repele a los solutos básicos catiónicos, y
- (iii) la repulsión de los solutos catiónicos de la fase móvil por la presencia del catión del aditivo en exceso.

Las interacciones (i) e (ii) parecen ser las principales responsables del comportamiento observado con los líquidos iónicos que contienen el ion cloruro, ya que la retención disminuye. Sin embargo, la interacción (iii) contrarresta a las interacciones (i) y (ii), reduciendo su efecto. Esto puede explicar el comportamiento de TEA^+ y $\text{EMIM}\cdot\text{Cl}$, para los que la retención del conjunto de los solutos básicos apenas varía.

Como se ha comentado con anterioridad, la Ecuación (7.5) se desarrolló para estimar la potencia supresora de los grupos silanol (supuestamente representada mediante K_A), por parte de los aditivos amínicos. Recientemente, esta ecuación se ha utilizado para calcular K_A para diferentes líquidos iónicos formados por un anión que se adsorbe significativamente [20,33,34,40]. En este capítulo, la Ecuación (7.5) se ha aplicado a $\text{BMIM}\cdot\text{Cl}$ y $\text{HMIM}\cdot\text{Cl}$, pero no fue posible calcular K_A para $\text{EMIM}\cdot\text{Cl}$ (que posee el catión más pequeño), debido a que no produce cambios significativos en la retención. Los valores estimados de K_A para diversos líquidos iónicos y DMOA se encuentran en la Tabla 7.2. Se puede observar que los valores más altos de K_A corresponden a DMOA, seguidos por los valores obtenidos con $\text{HMIM}\cdot\text{Cl}$.

Estos resultados muestran que la reducción de la retención con respecto a las fases móviles que no contienen aditivos depende del tamaño del catión del aditivo empleado, más que de su naturaleza. Se ha especulado sobre el hecho de que los aditivos de menor tamaño participan en un proceso de reparto con las cadenas alquil-enlazadas de la fase estacionaria [41,42], lo que les permite acceder directamente a los grupos silanol a los que se ven atraídos por atracción electrostática (justamente esta suposición es descrita por la Ecuación (7.5)). Por su parte, los aditivos más voluminosos no permiten el acceso de los solutos catiónicos a los silanoles residuales mediante su adsorción sobre la fase estacionaria, que queda recubierta con una capa del aditivo. Este efecto se ha estudiado con detalle para el surfactante aniónico SDS [43]. Este último mecanismo debería ser más eficaz para cationes de mayor tamaño. Efectivamente, la mayor reducción en la retención sugiere que las interacciones son más intensas. Por lo tanto, la Ecuación (7.5) se debe utilizar con precaución, ya que no sólo mide la interacción directa con los silanoles (i.e., su neutralización), sino también la intensa repulsión entre el catión del aditivo adsorbido y los solutos básicos catiónicos.

b) Influencia de los aniones de los líquidos iónicos con afinidad por la fase estacionaria

A continuación, se comprobó el comportamiento cromatográfico de los β -bloqueantes, en presencia de los cationes de imidazolio EMIM⁺, BMIM⁺ y HMIM⁺, cuando éstos están asociados a tetrafluoroborato (BF₄⁻), que es un anión con una afinidad significativa por la fase estacionaria. En concreto, este anión muestra una adsorción moderada sobre una fase estacionaria Kromasil C₁₈ (se adsorbe 15 μ mol utilizando una fase móvil conteniendo un 30%

acetonitrilo y NaBF_4 0.05 M) [32]. El anión adsorbido debería afectar a la retención, especialmente mediante la atracción de los solutos catiónicos hacia la fase estacionaria.

Debe indicarse que, en trabajos previos del grupo de investigación, se había estudiado el efecto de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ y $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ para eluir β -bloqueantes, comparándolo con el de líquidos iónicos que contienen los mismos cationes de imidazolio y un anión que muestra una elevada afinidad por la fase alquil-enlazada (hexafluorofosfato, PF_6^-) [22,33,34]. El trabajo mostrado en este capítulo complementa esos estudios. También se ha incluido $\text{EMIM}\cdot\text{BF}_4$ en las investigaciones.

Las Figuras 7.4a–c muestran el cambio en la retención de los β -bloqueantes al incrementarse la concentración de los tetrafluoroboratos de imidazolio. En el intervalo de concentración examinado, sólo utilizando $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$, la retención de los compuestos básicos siguió el comportamiento esperado considerando ambas interacciones (i) y (ii) descritas en la sección anterior: su disminución gradual al incrementarse la concentración del líquido iónico en la fase móvil. Por lo tanto, la interacción de HMIM^+ con la fase estacionaria prevalece sobre el efecto de BF_4^- asociado a las cadenas alquílicas de la fase C_{18} , lo que crea un ambiente de separación no muy distinto al observado con DMOA, $\text{BMIM}\cdot\text{Cl}$ y $\text{HMIM}\cdot\text{Cl}$. Es de destacar que el comportamiento de retención en presencia de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ fue similar al obtenido con TEA.

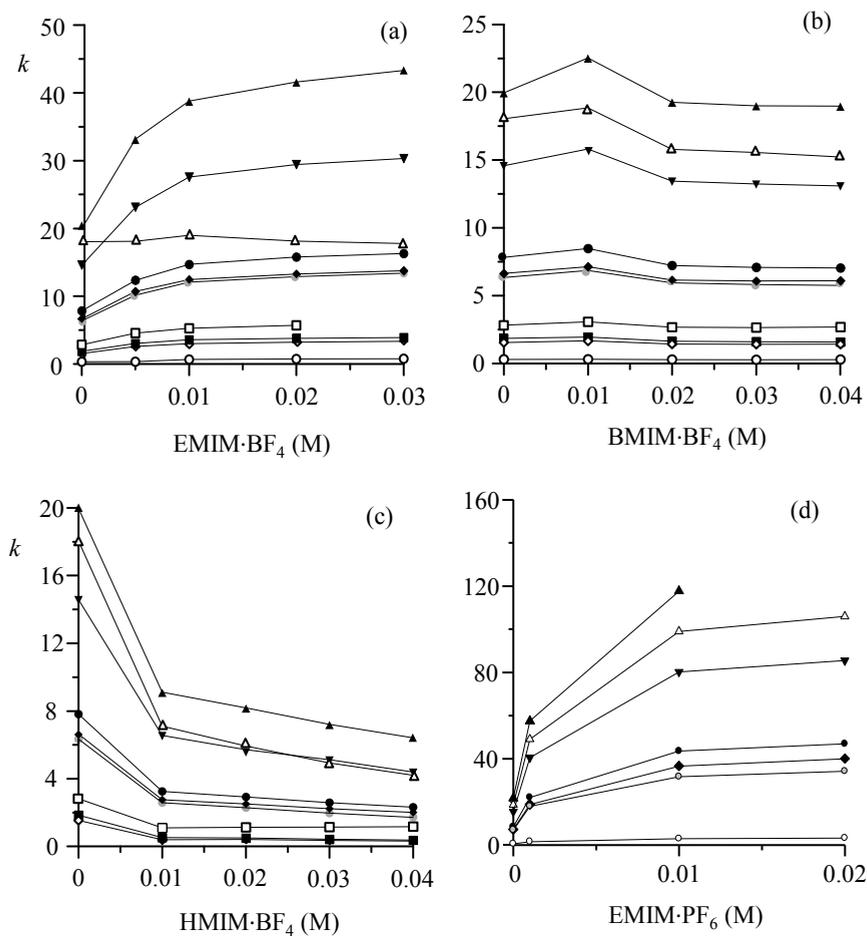


Figura 7.4. Variación de la retención de los β -bloqueantes utilizando fases móviles acuosas que contienen 15% de acetonitrilo y concentraciones crecientes de: (a) EMIM·BF₄, (b) BMIM·BF₄, (c) HMIM·BF₄ y (d) EMIM·PF₆. La identidad de los solutos se proporciona en la Figura 7.2.

El EMIM·BF₄ muestra una absorción UV importante a la longitud de onda de trabajo, lo que imposibilitó el uso de una concentración ≥ 0.04 M, por lo que el intervalo de concentraciones estudiado para este líquido iónico varió tan sólo entre 0.005 y 0.03 M. Por otro lado, el comportamiento con EMIM·BF₄ fue distinto al observado con los otros dos tetrafluoroboratos (BMIM·BF₄ y HMIM·BF₄): la retención de los β -bloqueantes se incrementó respecto a la obtenida con las fases móviles acuo-orgánicas en ausencia de aditivo, al incrementarse la concentración del aditivo, para a continuación decrecer el ritmo de aumento y previsiblemente disminuir finalmente la retención. Este comportamiento sugiere que el mecanismo de retención en presencia de EMIM·BF₄ depende de su concentración en la fase móvil. Mientras la cantidad adsorbida del líquido iónico no alcanza la máxima capacidad de la fase estacionaria, la interacción de los solutos catiónicos con el anión BF₄⁻ adsorbido parece ser más importante que la interacción con el catión imidazolio (EMIM⁺). Una vez alcanzada la saturación de la columna, bien la repulsión por parte de la fase estacionaria cargada positivamente por la adsorción del ion imidazolio, o la formación de pares iónicos con el anión presente en la fase móvil parece más importante, lo que reduce la retención.

Un comportamiento similar (pero más intenso) se ha observado con los β -bloqueantes eluidos con líquidos iónicos de imidazolio asociados al anión hexafluorofosfato (PF₆⁻) [32]. Esto se muestra en la Figura 7.4d para EMIM·PF₆, correspondiente a un trabajo anterior [33]. La elevada afinidad del anión PF₆⁻ por la fase estacionaria ha sido señalada como la principal responsable del comportamiento observado. Puesto que la retención de los β -bloqueantes es superior a la obtenida en ausencia del líquido iónico en un amplio intervalo de concentraciones ($k > k_0$), no fue posible estimar la constante

K_A mediante la Ecuación (7.5) para EMIM·BF₄ y EMIM·PF₆. El estudio de estos aditivos muestra claramente que la llamada potencia supresora K_A no mide únicamente la neutralización de los silanoles residuales. Los cambios en la retención responden a varias interacciones, que pueden hallarse más o menos relacionadas con la protección eficaz de los grupos silanoles de la fase estacionaria.

La Tabla 7.2 muestra los valores estimados para K_A , en presencia de BMIM·BF₄ y HMIM·BF₄. Tal como sucede para los cloruros de los cationes de imidazolio, el valor de K_A es mayor para HMIM⁺. Por otro lado, la comparación de los valores para los líquidos iónicos de tetrafluoroborato y cloruro indica que BMIM⁺ y HMIM⁺ son más efectivos en la reducción de la retención cuando están asociados al cloruro, debido a la reducida afinidad de este anión por la fase estacionaria.

7.4.3. Forma de los picos cromatográficos en presencia de aditivos catiónicos

Cabe recordar, que los analitos catiónicos presentan una cinética de interacción lenta con los silanoles residuales libres de la fase estacionaria. De ahí la formación de picos cromatográficos anchos y asimétricos. Si se disminuye la accesibilidad de los solutos catiónicos a los silanoles libres se obtienen picos de mejores características.

A continuación, se muestra el efecto sobre la forma de los picos del conjunto de β -bloqueantes cuando se añaden a la fase móvil los diferentes aditivos estudiados en este trabajo. Este estudio se ha realizado a partir de los mismos

cromatogramas utilizados en las secciones anteriores y se ve asistido por los denominados gráficos de semianchura.

Como se ha comentado en el Capítulo 6, la representación gráfica de las semianchuras de pico delantera (A) y posterior (B), medidas al 10% de la altura, frente al tiempo de retención, es la mejor forma de obtener una visión global de los cambios que se producen en la anchura y asimetría de los picos dentro de una columna cromatográfica [44,45]. Su construcción es muy sencilla (Figuras 7.5 a 7.7) y cada rama del gráfico se puede representar mediante las siguientes ecuaciones:

$$A = m_A t_R + A_0 \quad (7.6)$$

$$B = m_B t_R + B_0 \quad (7.7)$$

donde m_A y m_B son las pendientes de las correlaciones lineales para las semianchuras delantera y posterior, respectivamente, y A_0 y B_0 las correspondientes ordenadas en el origen (que representan el componente extra-columnar al ensanchamiento). Las Ecuaciones (7.6) y (7.7) permiten predecir las semianchuras de los picos eluidos a distintos tiempos de retención, y proporcionan parámetros útiles para caracterizar la columna. El estudio del efecto de los aditivos catiónicos sobre la forma de los picos se realizó en base a la construcción de gráficos globales, es decir, considerando todos los compuestos de prueba y todas las fases móviles utilizadas para cada aditivo, en las que se varía la concentración de éste.

La Figura 7.5a muestra los gráficos de semianchura obtenidos para una fase móvil en ausencia de cualquier aditivo (15% acetonitrilo). Las Figuras 7.5b–c, 7.6 y 7.7 muestran los gráficos globales obtenidos en presencia de las aminas y de los líquidos iónicos asociados a cloruro y tetrafluoroborato, respectivamente.

Aunque los puntos de los gráficos muestran una cierta dispersión, las correlaciones permiten obtener conclusiones claras.

En ausencia de aditivo (Figura 7.5a), se observa que la pendiente de la semianchura derecha (B) es significativamente mayor que la de la semianchura izquierda (A), lo que indica que los picos son asimétricos (presentando colas) debido a un equilibrio de interacción lento entre los solutos y la columna. Tras la adición de cualquiera de los aditivos estudiados, el ángulo entre los segmentos lineales para ambas semianchuras se reduce (los picos mejoran significativamente su simetría), especialmente para DMOA (Figura 7.5c), BMIM·Cl (Figura 7.6b), HMIM·Cl (Figura 7.6c), BMIM·BF₄ (Figuras 7.7b), y HMIM·BF₄ (Figuras 7.7c), lo que sugiere que estos aditivos son capaces de evitar eficazmente el acceso de los β -bloqueantes a los grupos silanol libres de la fase estacionaria (incluso para TEA, EMIM·Cl, EMIM·BF₄ y BMIM·BF₄, para los que la retención de los compuestos de prueba no disminuye, al menos significativamente).

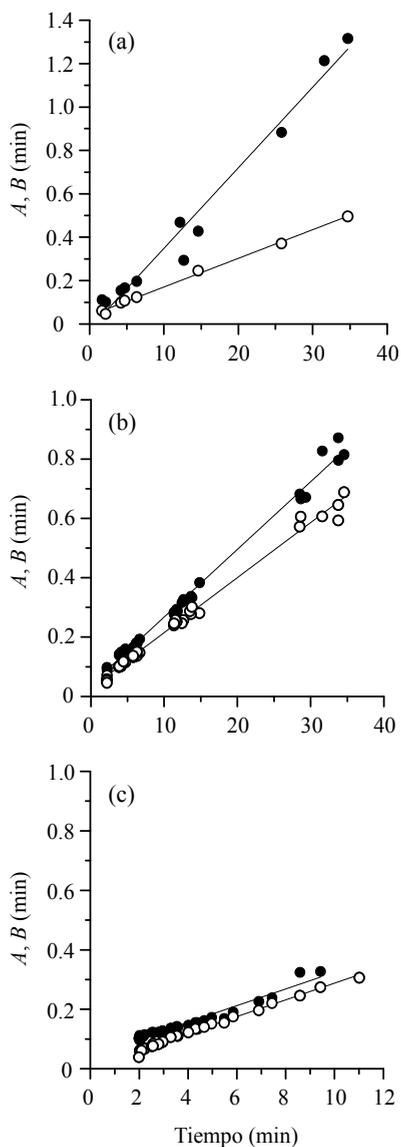


Figura 7.5. Gráfico de semianchuras (A (○) y B (●)), incluyendo todos los datos obtenidos con todos los compuestos de prueba, eluidos con el conjunto completo de fases móviles de los diseños experimentales. La concentración de acetonitrilo fue 15% para todas las experiencias.: (a) sin aditivo, (b) TEA, y (c) DMOA.

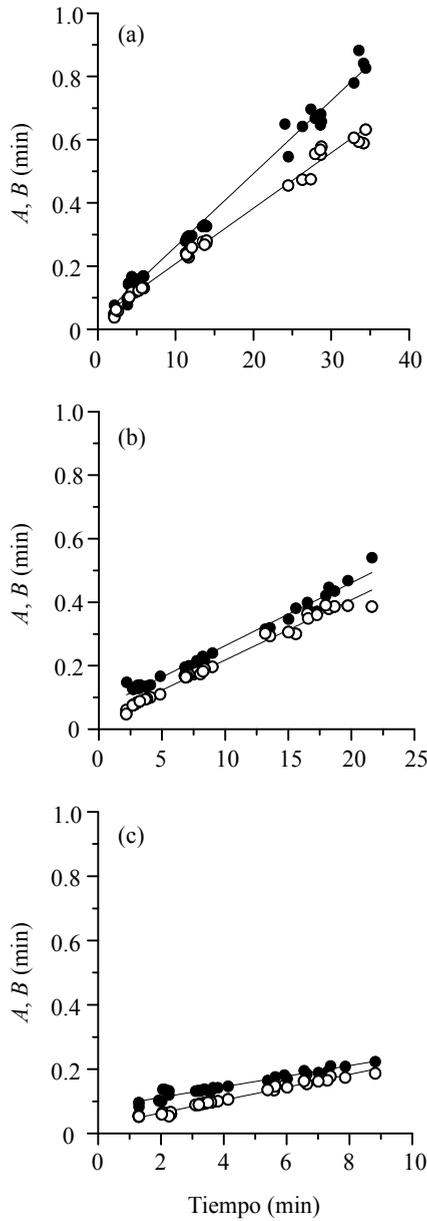


Figura 7.6. Gráfico de semianchuras para: (a) EMIM·Cl, (b) BMIM·Cl, y (c) HMIM·Cl. Otros detalles pueden consultarse en la Figura 7.5

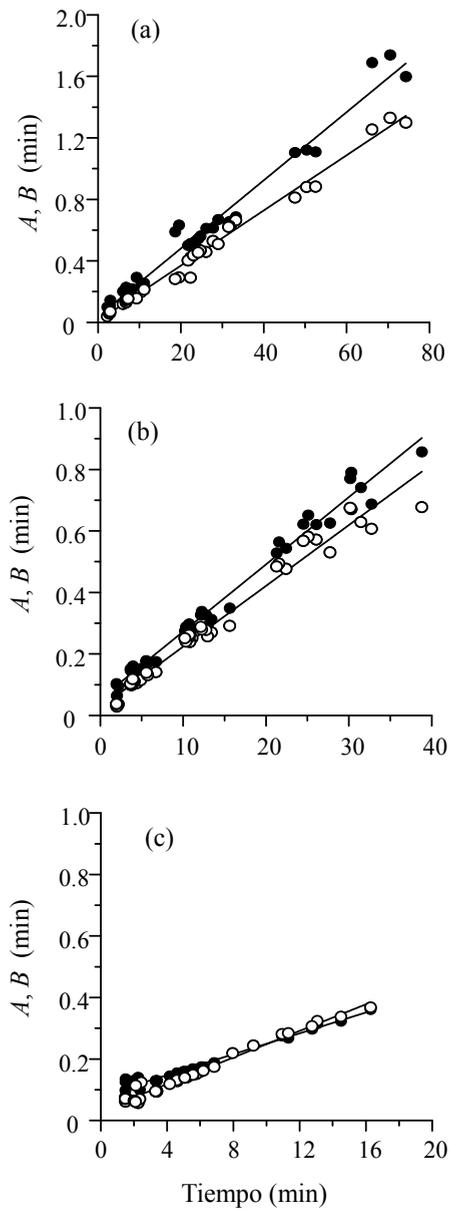


Figura 7.7. Gráfico de semianchuras para: (a) EMIM·BF₄, (b) BMIM·BF₄, y (c) HMIM·BF₄. Otros detalles pueden consultarse en la Figura 7.5.

Los parámetros extraídos de los gráficos de semianchura se muestran en la Tabla 7.3. De acuerdo a ellos, BMIM·Cl, HMIM·Cl y HMIM·BF₄ producen los menores ensanchamientos de pico. Por su parte, DMOA y BMIM·Cl dan lugar a los picos más simétricos (con relaciones m_B/m_A próxima a la unidad). Destaca el hecho de que los cationes de menor tamaño (TEA y EMIM⁺) producen picos más asimétricos.

Tabla 7.3. Parámetros de ajuste de los gráficos de semianchura: valor de la pendiente para la semianchura izquierda y derecha (m_A y m_B), suma de las pendientes (que caracteriza el ensanchamiento de los picos cromatográficos al aumentar el tiempo de retención) y relación entre las pendientes (que indica la asimetría de los picos a tiempos de retención elevados).

Aditivo	m_A	m_B	$m_A + m_B$	m_B / m_A
Sin aditivo	0.013	0.038	0.051	2.9
TEA	0.019	0.023	0.041	1.2
DMOA	0.028	0.028	0.056	1.0
EMIM·Cl	0.017	0.023	0.041	1.3
BMIM·Cl	0.019	0.019	0.039	1.0
HMIM·Cl	0.020	0.016	0.036	0.8
EMIM·BF ₄	0.018	0.022	0.040	1.2
BMIM·BF ₄	0.020	0.022	0.042	1.1
HMIM·BF ₄	0.022	0.017	0.039	0.8

7.5. Conclusiones

En este capítulo, se recogen diversos estudios realizados con diferentes tipos de líquidos iónicos, asociados a aniones con afinidad diversa a la fase estacionaria, en el que se compara su comportamiento con el obtenido con las aminas TEA y DMOA. Todos estos aditivos catiónicos son capaces de bloquear la actividad de los silanoles residuales libres de las columnas cromatográficas de base sílice, como muestra la mejora en la forma de los picos cromatográficos. En la bibliografía, se puede encontrar una extensa investigación sobre el uso de este tipo de aditivos para mejorar la separación de los compuestos básicos. Sin embargo, hay ciertos aspectos no tenidos en cuenta o equívocos. Este trabajo complementa estudios anteriores sobre el papel del catión y anión de los líquidos iónicos para suprimir la actividad de los silanoles.

Es evidente que el mecanismo de protección de los líquidos iónicos y aminas se ve fuertemente influido por el tamaño del catión del aditivo. Los cationes de mayor tamaño enmascaran más eficazmente el efecto silanol (i.e., originan picos mejor formados). Para los mejores aditivos, la intensidad del efecto es similar al observado con el surfactante aniónico SDS [30,31], que no interacciona directamente con los silanoles por atracción electrostática, sino que bloquea su actividad debido al recubrimiento de la superficie de la fase estacionaria, formando una doble capa con carga neta negativa. El establecimiento de diferentes formas de interacción de los líquidos iónicos con la fase estacionaria, que incluye la neutralización directa de los silanoles, y la repulsión y atracción de los solutos básicos catiónicos con el catión y el anión del aditivo, respectivamente en ambas fases estacionaria y móvil, así como la formación de pares iónicos en la fase móvil, indica que el comportamiento de retención no ofrece una indicación correcta de la potencia supresora

(representada por la constante K_A en la Ecuación (7.5)). Lo mismo ocurre con los aditivos en los que el anión asociado se adsorbe débilmente sobre la fase estacionaria, o para los aditivos de tamaño relativamente pequeño como TEA y EMIM⁺: los cambios en la retención no revelan específicamente la supresión del efecto silanol.

Cabe señalar que K_A se obtiene a partir de los datos de retención para solutos individuales. Si se mide la fuerza de las interacciones entre el catión en el aditivo y los silanoles, se debería obtener un valor similar para diversos solutos. Sin embargo, los valores de K_A calculados mostraron una cierta dispersión para los diferentes β -bloqueantes, que puede explicarse por las contribuciones particulares para cada compuesto básico a la retención (además de la diferente exactitud en la medida de los tiempos de retención). ¿Qué mide entonces la constante K_A en la Ecuación (7.5)? Sólo se puede decir que es un parámetro relacionado con la capacidad del aditivo para reducir la retención de los solutos catiónicos, debido a diversas interacciones de atracción y repulsión con los solutos catiónicos.

En consecuencia, la supresión de la actividad de los silanoles libres debe evaluarse a través de los parámetros de forma de pico, tales como su anchura y asimetría. Entre los supresores de la actividad silanofílica estudiados en este trabajo, los aditivos de menor tamaño (TEA, EMIM·Cl y EMIM·BF₄) aparecen como los más deficientes, mientras que los de mayor tamaño, con una mayor adsorción sobre la fase estacionaria alquil-enlazada, mejoran considerablemente la forma de los picos cromatográficos que se obtienen con fases móviles acuo-orgánicas en ausencia de aditivo. Entre los líquidos iónicos estudiados, HMIM·Cl y HMIM·BF₄ presentan las características más interesantes para la separación de los compuestos básicos: una baja velocidad de ensanchamiento

de los picos cromatográficos por unidad de tiempo de retención, combinada con una menor retención.

Aunque este trabajo se ha centrado en el comportamiento de los líquidos iónicos como aditivos, también muestra resultados interesantes para las aminas. Se ha demostrado que DMOA es un supresor de los silanoles muy efectivo, con un rendimiento similar al de los líquidos iónicos más eficaces: aunque se obtienen anchuras de pico ligeramente mayores a las obtenidas con HMIM·Cl y HMIM·BF₄, los picos cromatográficos son altamente simétricos. En un trabajo previo, se encontró un comportamiento similar con SDS [30,31,33].

En nuestra opinión, el comportamiento cromatográfico de los compuestos básicos en presencia de aminas merece un estudio más amplio, utilizando las herramientas que se presentan en este trabajo. Además, debe estudiarse más a fondo la implicación real de los efectos sobre la retención y la forma de los picos de los aditivos sobre la resolución.

7.6. Referencias

- [1] C.F. Poole, *Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids*, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 49–82.
- [2] J. Liu, J.A. Jönsson, G. Jiang, *Application of ionic liquids in Analytical Chemistry*, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 20–27.
- [3] M.P. Marszałł, R. Kaliszan, *Application of ionic liquids in liquid chromatography*, Crit. Rev. Anal. Chem. 37 (2007) 127–140.
- [4] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, *Ionic liquids in separation techniques*, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 6–18.
- [5] Z. Tan, J. Liu, L. Pang, *Advances in analytical chemistry using the unique properties of ionic liquids*, Trends Anal. Chem. 39 (2013) 218–227.
- [6] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, *Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives*, Anal. Chem. 86 (2014) 262–285.
- [7] T. Welton, *Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis*, Chem. Rev. 99 (1999) 2071–2084.
- [8] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, *Toxicity of ionic liquids*, Clean 35 (2007) 42–48.
- [9] G. Cevasco, C. Chiappe, *Are ionic liquids a proper solution to current environmental challenges?*, Green Chem. 16 (2014) 2375–2385.
- [10] M.A. Abraham, L. Moens (editores), *Clean solvents: Alternative media for chemical reactions and processing*, ACS Symposium Series 819, American Chemical Society, Washington DC, 2002.
- [11] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1007 (2003) 39–45.
- [12] W. Zhang, L. He, Y.L. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Anal. Lett. 36 (2003) 827–838.

- [13] X. Xiao, L. Zhao, L. Xia, S. Jiang, *Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography. Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids*, Anal. Chim. Acta 519 (2004) 207–211.
- [14] R. Kaliszan, M.P. Marszałł, M.J. Markuszewski, T. Bączek, J. Pernak, *Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids*, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 263–271.
- [15] M.P. Marszałł, T. Bączek, R. Kaliszan, *Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids*, Anal. Chim. Acta 547 (2005) 172–178.
- [16] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod, *Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers*, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 202–208.
- [17] A.V. Herrera Herrera, J. Hernández Borges, M.A. Rodríguez Delgado, *Ionic liquids as mobile phase additives for the high-performance liquid chromatographic analysis of fluoroquinolone antibiotics in water samples*, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 1439–1446.
- [18] A. Martín Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Ionic liquids as desorption solvents and memory effect suppressors in heterocyclic aromatic amines determination by SPME-HPLC fluorescence*, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 937–946.
- [19] A. Martín Calero, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods*, Talanta 79 (2009) 590–597.
- [20] A. Martín Calero, G. Tejral, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Suitability of ionic liquids as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV detection for the determination of heterocyclic aromatic amines*, J. Sep. Sci. 33 (2010) 182–190.

-
- [21] A. Petruczynik, *Effect of ionic liquid additives to mobile phase on separation and system efficiency for HPLC of selected alkaloids on different stationary phases*, J. Chromatogr. Sci. 50 (2012) 287–293.
- [22] J.J. Fernández Navarro, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *1-Hexyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoro-borate: An efficient column enhancer for the separation of basic drugs by reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1258 (2012) 168–174.
- [23] Y. Tang, A. Sun, R. Liu, Y. Zhang, *Simultaneous determination of fangchinoline and tetrandrine in Stephania tetrandra S. Moore by using 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the RP-HPLC mobile phase additives*, Anal. Chim. Acta 767 (2013) 148–154.
- [24] J. Nawrocki, *The silanol group and its role in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29–71.
- [25] M. Reta, P.W. Carr, *Comparative study of divalent metals and amines as silanol-blocking agents in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 855 (1999) 121–127.
- [26] U.D. Neue, K. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, *The combined effect of silanols and the reversed-phase ligand on the retention of positively charged analytes*, J. Chromatogr. A 1063 (2005) 35–45.
- [27] H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, *Reversed phase chromatography: The mystery of surface silanols*, Chromatographia 62 (2005) S19–S29.
- [28] D.V. McCalley, *The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 858–880.
- [29] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, *Secondary chemical equilibria in reversed-phase liquid chromatography*, en: Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation (editado por, S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd), Elsevier, Amsterdam, 2013, págs. 87–104.
- [30] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of*
-

- basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786–1798.
- [31] M.J. Ruiz Ángel, S. Pous Torres, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Performance of different C₁₈ columns in reversed-phase liquid chromatography with hydro-organic and micellar-organic mobile phases*, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 76–82.
- [32] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Huguet, *Nonmolecular solvents in separation methods: dual nature of room temperature ionic liquids*, Anal. Chem. 77 (2005) 4071–4080.
- [33] J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, M.J. Ruiz Ángel, *The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 398–407.
- [34] J.J. Fernández Navarro, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García-Alvarez-Coque, *Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C₁₈ stationary phases*, J. Chromatogr. A 1232 (2012) 166–175.
- [35] C.J. Drayton (Ed.), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [36] R. Mehvar, D.R. Brocks, *Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans*, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 4 (2001) 185–200.
- [37] A. Nahum, C. Horváth, *Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography*, J. Chromatogr. 203 (1981) 53–63.
- [38] K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, *Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking*, J. Chromatogr. 203 (1981) 65–84.
- [39] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Improvement of peak shape and separation performance of β -*

-
- blockers in conventional reversed-phase columns using solvent modifiers*, J. Chromatogr. Sci. 41 (2003) 350–358.
- [40] M.P. Marszał, T. Baczek, R. Kaliszan, *Evaluation of the silanol-suppressing potency of ionic liquids*, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1138–1145.
- [41] A. Vailaya, C. Horváth, *Retention in reversed-phase chromatography: Partition or adsorption?* J. Chromatogr. A 829 (1998) 1–27.
- [42] A. Soliven, S. Kayillo, R.A. Shalliker, *Reversed phase liquid chromatography*, in Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering (editado por J. Reedijk), Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [43] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographic efficiency in micellar liquid chromatography: should it be still a topic of concern?*, Sep. Purif. Rev. 42 (2013) 1–27.
- [44] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786–1798.
- [45] M.J. Ruiz Ángel, S. Pous Torres, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Performance of different C₁₈ columns in reversed-phase liquid chromatography with hydro-organic and micellar-organic mobile phases*, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 76–82.

CAPÍTULO 8

**COMPARACIÓN DE DOS SISTEMAS DE COLUMNAS
ACOPLADAS EN SERIE Y SOFTWARE DE OPTIMIZACIÓN
EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ISOCRÁTICA PARA
RESOLVER MEZCLAS COMPLEJAS**

8.1. Summary

Although there is a great deal of stationary phases having different selectivities (even practically orthogonal selectivities), these very rarely are taken as a factor to be optimised during method development. The chromatographer selects the stationary phase usually in a trial-and-error fashion (or based on the solute nature and expected interactions), and then optimises continuous factors as the mobile phase composition, pH, temperature and flow-rate. However, the optimisation of the stationary phase nature and column length (which are discrete factors) may be interesting. In this regard, the optimisation of the coupling of individual columns may yield separations that are not possible with a single column, based on the combined selectivities and the potential increase in plate count. The theory behind the use of serially-coupled columns is indeed rather simple, but its implementation may be troublesome. The most problematic factor is the connection of the serial columns, which ideally should not modify the result of the sum of behaviours of the columns. A proper serial connection of columns needs a zero-dead volume (ZDV) union and a system to link tightly the columns to each other. In this work, two different approaches to solve this problem are compared using isocratic elution, one consisting in the use of holders, which are screwed to maintain attached the columns linked by ZDV junctions, and the other using ZDV fingertight column couplers, which are screwed directly to the columns maintaining them tightly attached without the need of column holders. The advantages and problems associated to these approaches are described, and information on the accuracy in the prediction of retention times, peak widths and asymmetries are given for the combined columns. Guidelines to prepare software to make reliable predictions are also presented.

8.2. Introducción

Desde su aparición en la década de los 70, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*) se ha convertido en la técnica de separación más importante en la mayoría de laboratorios de análisis. Esto se debe, principalmente, a su versatilidad, facilidad de uso, compatibilidad con las muestras, así como a la selectividad y el poder de resolución del proceso cromatográfico. La capacidad separativa de la HPLC depende de la selectividad de la combinación fase estacionaria/fase móvil, así como de la eficacia de la columna cromatográfica.

La práctica habitual, para obtener una resolución adecuada, es seleccionar mediante ensayos de prueba y error, o en base a la naturaleza de los solutos y a las interacciones esperadas, en primer lugar, la naturaleza de la fase estacionaria y la longitud de la columna (que son factores discretos), y a continuación, optimizar los factores asociados a la fase móvil, como la concentración del modificador orgánico, el pH, la temperatura y el caudal de fase móvil (que son factores continuos) [1–5]. También se ha sugerido la optimización de la naturaleza de la fase estacionaria. En este sentido, resulta particularmente interesante la combinación de diferentes mecanismos compatibles. La idea de utilizar diversas fases estacionarias en una separación puede implementarse derivatizando las partículas en una columna con diferentes ligandos (soportes químicamente mixtos), o rellenando la columna con partículas de naturaleza diferente en distintas cantidades (soportes físicamente mixtos) [6–9]. También se pueden utilizar columnas de distintas longitudes acopladas en serie, cada una de ellas conteniendo una fase estacionaria distinta [7,10–12]. No es fácil predecir la retención de los solutos en los soportes mixtos utilizando una función lineal de la composición de la

fase estacionaria, debido a la interacción que se establece entre las diferentes fases estacionarias. Por el contrario, la separación en las columnas acopladas en serie de diferentes longitudes es aditiva y, por lo tanto, fácilmente predecible [7,10].

Existen dos razones para utilizar columnas acopladas en serie en lugar de la práctica usual que hace uso de columnas individuales: (i) la combinación de la selectividad de las columnas individuales mejora las expectativas de separación, con respecto a la separación ofrecida por cada una de las columnas individuales, y (ii) el incremento en el número de platos teóricos incrementa la capacidad separativa. La idea es muy atractiva y posee un gran potencial. Por lo tanto, el reducido número de artículos que han aplicado esta estrategia resulta sorprendente [10–19], teniendo en cuenta la gran cantidad de fases estacionarias comercializadas con diferentes selectividades que pueden combinarse. El escaso éxito de las columnas acopladas podría deberse a que, a pesar de que la teoría que describe este tipo de sistemas multi-columna es relativamente simple, el acoplamiento directo de las columnas de HPLC sin pérdida de eficacia es todavía un gran reto. Sin embargo, en la última década se han abierto nuevas posibilidades con el desarrollo de los denominados conectores de volumen muerto nulo (ZDV, *zero dead volume*).

Aunque existían artículos publicados sobre el uso de columnas acopladas en serie, como los de Issaq y Gutiérrez [7], y Lukulay y McGuffin [10] (este último incluyendo un método para optimizar la longitud de la columna y la composición de la fase móvil para los sistemas multi-columna), el nuevo sistema de columnas acopladas desarrollado bajo una patente en 2005 [11,20] (comercializado por Bischoff Chromatography como una herramienta prometedora para la optimización de la separación) ha reavivado recientemente

la atención. La patente desarrollada propone la conexión de segmentos de acero inoxidable de diferentes longitudes, rellenos con fases estacionarias de distinta naturaleza. La conexión entre las columnas se realiza a través de uniones ZDV y los segmentos de columna se insertan en carcasas de poliéter-éter-cetona (PEEK, *polyether ether ketone*) para mantenerlos firmemente unidos entre sí. El sistema de montaje se comercializó con el nombre "columnas POPLink" (el acrónimo POP proviene de "optimización de fase", *phase optimisation*). Para hacer el sistema más accesible a los usuarios, se proporciona un software ("POPLink Software Optimizer"), que selecciona la combinación óptima de la naturaleza y la longitud de los segmentos de columna, para una composición de fase móvil y condiciones de operación pre-seleccionadas [13,20,21]. El software se basa en el método PRISMA, desarrollado previamente para la optimización del disolvente [22,23], y basado en la clasificación de disolventes de Snyder [24] y en el prisma de fuerza eluyente propuesto por Kirkland y Glajch para mezclas de varios disolventes [25]. Los autores bautizaron el método de optimización de la columna con el nombre "SOS-LC" (optimización de la selectividad de la fase estacionaria en cromatografía líquida, *stationary phase optimized selectivity liquid chromatography*), o "POPLC" (optimización de la fase estacionaria en cromatografía líquida, *phase optimized liquid chromatography*) [13].

Varios autores han utilizado las columnas POPLink para desarrollar aplicaciones, en elución isocrática o en gradiente, para varios analitos: flavonoides y pesticidas [11], esteroides [15], oligopéptidos [18], explosivos nitro-aromáticos [26], hormonas tiroideas sintéticas [27], y productos de degradación de membranas electrolíticas poliméricas [28]. También se han desarrollado métodos en gradiente para esteroides [16,17,19], sulfonamidas

[19], y los productos de degradación de las membranas electrolíticas poliméricas [28].

El objetivo inicial de este trabajo era el desarrollo de un procedimiento de *screening* para sulfonamidas, que es un tipo importante de agentes antimicrobianos. Hace algunos años, el grupo de investigación había utilizado una columna Hypersil ODS para analizar estos fármacos, y tras la optimización de la composición de la fase móvil, sólo 10–11 sulfonamidas pudieron ser resueltas [29]. Recientemente, pensamos que las columnas acopladas en serie podrían incrementar el espacio de separación y dar lugar a la resolución de mezclas de sulfonamidas más complejas. Con este propósito, utilizamos dos sistemas de acoplamiento distintos: el sistema POPLink, y columnas de otros fabricantes acopladas en serie con conectores ZDV que no requieren el uso de las carcasas PEEK del sistema POPLink. En este capítulo, se muestra la comparación de estos dos sistemas utilizando elución isocrática. También se proporcionan directrices para desarrollar predicciones fiables del perfil de los picos cromatográficos, con motivos de optimización de la resolución.

8.3. Parte experimental

8.3.1. Reactivos

Se utilizaron 15 sulfonamidas como compuestos de prueba: sulfacetamida, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol y sulfisoxazol, todas adquiridas de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Las

disoluciones madre, que contenían 100 µg/mL de los fármacos, se prepararon disolviendo los compuestos en unos pocos mililitros de etanol de Scharlau (grado analítico, Barcelona), con la ayuda de un baño de ultrasonidos de Elmasonic (Singen, Alemania) y diluyendo con agua nanopura. Estas disoluciones se diluyeron de nuevo con agua hasta una concentración de 20 µg/mL, antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

La fase móvil contenía un 10% v/v de acetonitrilo de Scharlau (grado HPLC), dihidrógenofosfato anhidro sódico anhidro 0.01 M de Sigma (Roedermark, Alemania), y agua ultrapura. El pH se fijó a 3 con la ayuda de un tampón fosfato ajustado con HCl 0.01 M y NaOH 0.01 M de Scharlau. Otros detalles pueden consultarse en el Capítulo 3.

8.3.2. Instrumentación y sistemas de columnas acopladas

Se utilizó un sistema cromatográfico HPLC de Agilent (Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba isocrática (HP 1200), un muestreador automático con viales de 2 mL (HP 1100), un compartimento de columna termostatzado (HP 1100), y un detector de fila de diodos (HP 1200). El sistema cromatográfico se controló con una estación de datos LC ChemStation OpenLAB CDS de Agilent (versión B.04.03). La señal se monitorizó a 254 nm, longitud de onda próxima a la de los máximos de absorción de las sulfonamidas, y a la que el tampón exhibía una absorbancia despreciable. El caudal se fijó a 1 mL/min. Todas las medidas se realizaron a 25°C.

Las rutinas desarrolladas para llevar a cabo el tratamiento de los datos se prepararon con MATLAB 2010b de The MathWorks Inc. (Natick, MA).

Se hizo uso de dos sistemas diferentes de columnas acopladas en serie, uno de ellos (el sistema POPLink), fabricado por Bischoff Chromatography (Leonberg, Alemania), y un sistema construido en nuestro laboratorio con columnas de ACE (Aberdeen, Escocia, Reino Unido).



Figura 8.1. Sistema de acoplamiento de columnas POPLC.

El sistema de Bischoff consiste en un kit que contiene cinco conjuntos de columnas de acero inoxidable rellenas de partículas de $5\ \mu\text{m}$, con fases estacionarias distintas (Figura 8.1). Se disponía de columnas para cada tipo de fase estacionaria con longitudes de 1, 2, 4 y 8 cm y un diámetro interno de 3 mm. El acoplamiento de las columnas no se realiza con una unión ZDV adicional, sino que éstas se acoplan directamente. Debe indicarse que los extremos de las columnas están cubiertos con una rejilla. Cuando dos columnas se unen, las rejillas se presionan entre sí. Sin embargo, esta unión por presión no es capaz de mantener unidas firmemente las columnas, por lo que éstas se ensamblan dentro de una serie de carcasas de material PEEK, con

longitudes de 1 y 2 cm, que se atornillan entre sí para construir el sistema acoplado. De acuerdo al fabricante, el acoplamiento entre las columnas se realiza con un volumen muerto nulo.

Las fases estacionarias del sistema POPLink son: Prontosil C₁₈ SH2 (fase C₁₈ con carga de carbono máxima destinada a separar únicamente por interacciones hidrofóbicas, con un encapsado extremadamente estable y efectivo), C₁₈-EPS (fase C₁₈ con grupos polares de tipo amida, que ofrecen una máxima selectividad polar), Fenilo 2 (que permite una separación basada en interacciones π - π , con selectividad ortogonal a las fases C₁₈), Ciano (fase enlazada de ciano-propilo que ofrece una excelente selectividad polar, con un encapsado estable) y C₃₀ (selectividad a la forma de las moléculas, útil para el reconocimiento molecular en la separación de moléculas planas y no planas; sin encapsado).

Se construyó un segundo sistema de columnas acopladas con varias columnas ACE de acero inoxidable y conectores ZDV de material PEEK, todos ellos seleccionados de catálogo (Figura 8.2). Los conectores utilizados (generalmente comercializados para conectar la columna analítica a una columna protectora) se utilizaron para conectar columnas de diferentes longitudes, atornillándolos directamente a las columnas. Con este sistema, no es necesario utilizar ningún otro elemento para mantener estrechamente unidas las columnas, como es el caso del sistema POPLink de Bischoff. Las columnas ACE se comercializan en diferentes longitudes (e.g., 2, 3, 3.5, 5 y 7.5 cm), diámetros internos (e.g., 1, 2, 3, 4 y 4.6 mm), y tamaños de partícula (e.g., 3, 5 y 10 μ m). En el estudio desarrollado, se utilizaron columnas de diferentes longitudes de 4.6 mm de diámetro interno y rellenas de partículas de 5 μ m.

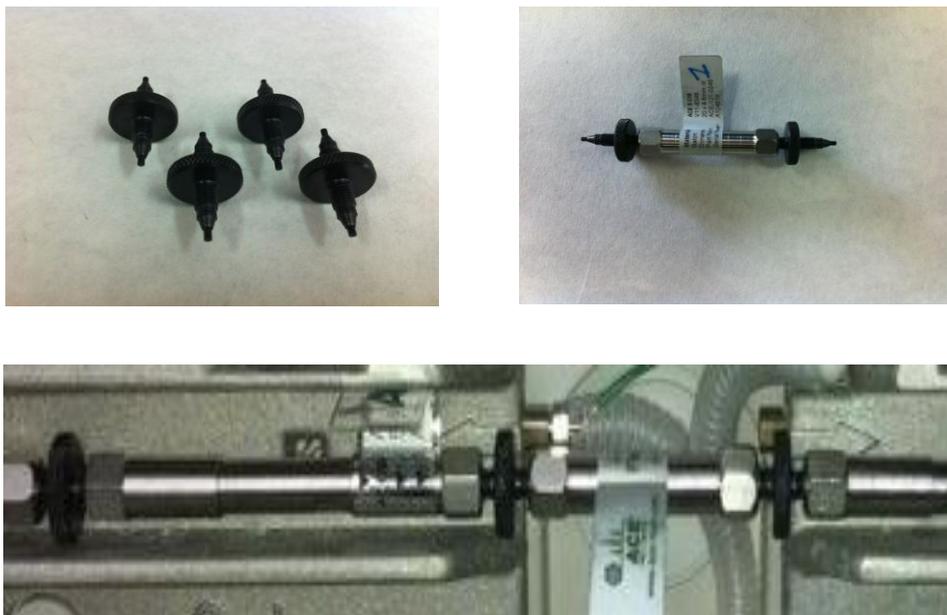


Figura 8.2. Sistema de acoplamiento desarrollado para este trabajo.

Las fases estacionarias ACE fueron las siguientes: ACE C₁₈ (separa mediante interacción hidrofóbica, preparada a partir de sílice de elevada pureza), ACE C₁₈-HL (ofrece mayor retención en comparación con la ACE C₁₈, debido a su gran área superficial y elevada carga de carbono de sus partículas), ACE AQ (fase C₁₈ con grupos funcionales polares integrados, resistente al denominado colapso de fase frente a fases móviles con un alto contenido en agua), ACE CN (fase ciano que incrementa la retención de los compuestos polares), y ACE Fenilo (fase fenilo cuya hidrofobicidad es intermedia entre las fases C₄ y C₈, y que ofrece una selectividad alternativa para los compuestos aromáticos, aminas y compuestos polares).

Se protegió ambos sistemas de columnas de la fase móvil con una pre-columna Nucleosil C₁₈ (3 cm × 4.6 mm, rellena de partículas de 5 μm) de

Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.), que se colocó justo antes del inyector para medir exclusivamente el comportamiento cromatográfico para la combinación de columnas. Se utilizó el mismo cromatógrafo y tubos de unión para todas las experiencias. Se midió el volumen extra-columnar reemplazando las columnas por una conexión ZDV, e inyectando 20 µg/mL de KBr de Acros Organics (Fair Lawn, NJ, EE.UU.), con detección a 210 nm ($t_{\text{ext}} = 0.137$ min).

8.4. Base teórica

8.4.1. Predicción de tiempos de retención para columnas acopladas en serie

El tiempo de retención para un soluto eluido utilizando columnas acopladas en serie es simplemente una combinación lineal de los tiempos de retención para cada columna, t_{Ri} :

$$t_{R_c} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n t_{R_i} \quad (8.1)$$

donde n es el índice de la columna y t_{ext} el tiempo de retención asociado al volumen extra-columnar. Cuando varias columnas se acoplan, el volumen extra-columnar incluye además de la contribución de los tubos externos, el volumen asociado a las conexiones entre las columnas, que pueden tener efectos importantes en el perfil de los picos cromatográficos, no siendo fácil su medida.

De forma estricta, el factor de retención para cada columna debe calcularse teniendo en cuenta el t_{ext} y el tiempo muerto para cada columna, t_{0i} . Para una columna aislada, el factor de retención se define como:

$$k_i = \frac{t_{R_i} - t_{0_i}}{t_{0_i} - t_{\text{ext}}} \quad (8.2)$$

cuyo valor debería ser el mismo para columnas de cualquier longitud, o para la combinación de varias columnas que contengan la misma fase estacionaria (siempre que no se añada un volumen muerto adicional entre las columnas acopladas). Debe tenerse en cuenta que la diferencia de tiempos en el numerador de la Ecuación (8.2) elimina la contribución extra-columnar, t_{ext} , presente en la medida experimental de ambos t_{Ri} y t_{0i} .

En las columnas acopladas, varios segmentos de columna conteniendo la misma fase estacionaria pueden ser combinados con otros segmentos conteniendo otras fases estacionarias y, por lo tanto, diferente selectividad. La longitud total del conjunto de columnas, L , será la suma de las longitudes de los segmentos acoplados, l_i :

$$L = \sum_{i=1}^n l_i \quad (8.3)$$

Para un segmento i , que contiene una cierta fase estacionaria, y teniendo en cuenta la Ecuación (8.2), la velocidad lineal de un soluto en elución isocrática viene dada por:

$$v_i = \frac{dl}{dt} = \frac{l_i}{t_{Ri}} = \frac{l_i}{t_{0i} (1 + k_i)} = \frac{u_0}{1 + k_i} \quad (8.4)$$

donde u_0 es la velocidad lineal de la fase móvil (que se supone constante). La velocidad lineal del soluto también debe ser la misma para todos los segmentos que contienen la misma fase estacionaria. Por lo tanto:

$$v_i = \frac{L}{t_R} \quad (8.5)$$

donde t_R es el tiempo de retención total para los segmentos que contienen la misma fase estacionaria, con una longitud total L . De la Ecuación (8.4):

$$t_{R_i} = \frac{1 + k_i}{u_0} l_i \quad (8.6)$$

Combinando las Ecuaciones (8.1) y (8.6), y teniendo en cuenta que $t_{0i} = l_i/u_0$:

$$t_R = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{u_0} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n t_{0i} + \sum_{i=1}^n t_{0i} k_i = t_0 + \sum_{i=1}^n t_{0i} k_i \quad (8.7)$$

Debe tenerse en cuenta que t_{0i} es el tiempo muerto dentro de un segmento (sin la contribución extra-columnar) y t_0 , el tiempo muerto del conjunto de columnas acopladas.

Alternativamente, la Ecuación (8.7) puede escribirse de la siguiente forma:

$$t_R = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \frac{L}{u_0} \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{L} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{L} = t_{\text{ext}} + (1 + k_c) \sum_{i=1}^n t_{0i} \quad (8.8)$$

donde k_c es el factor de retención de la combinación de columnas acopladas, que se obtiene mediante la suma de los factores de retención para cada segmento, ponderando los términos en función de las longitudes de los distintos segmentos. En las Ecuaciones (8.7) y (8.8), el término, $\sum_{i=1}^n t_{0i}$ es el tiempo muerto asociado al tránsito a través de las columnas acopladas, y sólo tiene en cuenta las contribuciones de cada segmento al conjunto de columnas. Debe tenerse en cuenta que la Ecuación (8.7) aísla la contribución de la retención de cada segmento a través de cada término $t_{0i} k_i$, mientras que la

Ecuación (8.8) supone una columna imaginaria con un factor de retención, k_c . Este último punto de vista (Ecuación (8.8)) es más simple, pero el mostrado en la Ecuación (8.7) posee la ventaja de individualizar el comportamiento de retención dentro de cada segmento, lo que es interesante para el seguimiento de los cambios en el perfil de los picos cromatográficos (véase la Sección 8.4.2), y también para la elución en gradiente utilizando columnas acopladas en serie, que se considera en los Capítulos 10 y 11.

8.4.2. Predicción del perfil de pico para columnas acopladas en serie

El perfil de los picos cromatográficos se caracteriza por su anchura y asimetría, que dependen de los valores de las semi-anchuras izquierda (A) y derecha (B). Debe recordarse que para picos simétricos, $A = B$. En cualquier caso, las semi-anchuras pueden predecirse fácilmente con buena exactitud para los solutos eluidos de columnas individuales. En elución isocrática, los modelos predictores son parabólicos [30]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (8.9)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (8.10)$$

donde t_R es el tiempo de retención, y a_{0-2} y b_{0-2} son coeficientes de ajuste, que dependen de la longitud de la columna. Los parámetros del modelo se pueden obtener mediante el ajuste de las semi-anchuras de los picos para un conjunto de solutos. Cabe mencionar que a menudo la parábola puede asimilarse a una línea recta [31].

Este enfoque puede extenderse a columnas conectadas en serie. Los valores de las semi-anchuras para columnas de cualquier longitud (A_i y B_i) se pueden obtener a partir de los valores predichos para una columna de referencia (A_r y

B_r), con una longitud seleccionada arbitrariamente (preferiblemente una columna larga). Dado que la anchura (o semi-anchuras) de un pico se incrementan con la raíz cuadrada de la longitud de la columna a través de la cual el soluto se desplaza [32], es posible predecir las semi-anchuras para segmentos de cualquier longitud conteniendo la misma fase estacionaria de la siguiente forma:

$$A_i = A_r \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (8.11)$$

$$B_i = B_r \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (8.12)$$

donde l_r es la longitud de la columna de referencia. Por otro lado, teniendo en cuenta que la contribución a la varianza total viene dada por la suma de las varianzas de las contribuciones independientes (lo que es sólo estrictamente cierto para los picos gaussianos), las siguientes aproximaciones son válida para los picos eluidos a partir de un conjunto de columnas acopladas:

$$A_c^2 = \sum_{i=1}^n A_i^2 \quad (8.13)$$

$$B_c^2 = \sum_{i=1}^n B_i^2 \quad (8.14)$$

$$(A + B)_c^2 = \sum_{i=1}^n (A_i + B_i)^2 \quad (8.15)$$

8.5. Resultados y discusión

8.5.1. Ventajas y limitaciones del acoplamiento de columnas en serie

En el análisis convencional mediante HPLC de mezclas complejas, haciendo uso de una única columna, a menudo no se logra la resolución completa. En este caso, la práctica habitual es probar otras columnas con fases estacionarias de otros fabricantes, en ocasiones mostrando diferentes mecanismos de separación. Sin embargo, en muchos casos, tampoco se tiene éxito en la separación utilizando las columnas disponibles. Por ello, no es sorprendente la búsqueda de nuevas soluciones, sin la necesidad de acudir a la ayuda de detectores más selectivos. La combinación de mecanismos de separación utilizando columnas en serie es una opción sencilla para incrementar las expectativas de éxito. En muchas situaciones (como se mostrará en el estudio que se muestra a continuación), la selectividad global de las columnas acopladas en serie es mejor que la de cada columna (fase estacionaria) utilizada por separado. El acoplamiento de columnas también reduce el tiempo de análisis, haciendo que este enfoque sea altamente competitivo frente a la elución en gradiente.

Utilizando columnas con diferentes fases estacionarias y longitudes, la selectividad puede ajustarse, en principio muy finamente. La combinación de columnas, independientemente de los mecanismos de separación, es posible, siempre y cuando todas ellas sean compatibles con la fase móvil de trabajo y las condiciones experimentales. Por otro lado, la selectividad de la combinación será sólo notablemente diferente si la selectividad de las fases estacionarias combinadas difiere suficientemente [13], pero incluso si éste no es el caso, también se observan cambios interesantes en el comportamiento.

El método implica un número de medidas para obtener los tiempos de retención y los parámetros del perfil de los picos (sólo la anchura, o la anchura y la asimetría) de cada soluto eluido de varias fases estacionarias en columnas de longitud seleccionada (las columnas de referencia). La longitud de las columnas de referencia se puede elegir de forma arbitraria y no debe ser necesariamente la misma para todas las fases estacionarias. Esta información permitirá el cálculo de los tiempos de retención para las combinaciones en serie de columnas de diferentes longitudes, y la predicción de la combinación óptima que ofrecerá la separación más favorable, en el menor tiempo posible de análisis. Las operaciones matemáticas para realizar las predicciones son más simples que en el caso de optimizar la composición de la fase móvil para una columna aislada. Puesto que los tiempos de retención son aditivos, el tiempo de retención total se obtiene simplemente como la suma de los tiempos de retención para cada segmento de columna (naturalmente, incluyendo el tiempo extra-columnar) (Ecuación (8.1)).

Por lo tanto, la teoría básica que explica el funcionamiento de las columnas acopladas en serie es bastante sencilla. El problema radica en cómo poner en práctica el sistema para obtener resultados exactos, lo que no parece tan sencillo. En primer lugar, la optimización del sistema de columnas acopladas puede considerar la longitud de las columnas como una variable continua. Sin embargo, las casas comerciales sólo comercializan unas longitudes determinadas. Otro punto a considerar es que el número de segmentos de columna que pueden conectarse depende del límite superior de la presión operativa del instrumento. Sin embargo, el factor más problemático radica en la propia conexión de las columnas en serie, que no debe modificar el resultado de la suma de los comportamientos de las columnas. Se supone que

no debe existir un volumen asociado a las conexiones entre las columnas, pero si éste no fuera el caso, su medida exacta no es fácil.

A continuación se discute la idoneidad de los dos sistemas de acoplamiento de columnas descritos en las secciones anteriores.

8.5.2. Robustez de los sistemas acopladores de columnas

a) Uso de carcasas de material PEEK para unir columnas en serie

Una construcción adecuada de un sistema de columnas acopladas en serie requiere conexiones ZDV y un mecanismo que mantenga los segmentos de columna firmemente unidos entre sí. Uno de estos sistemas, diseñado exclusivamente para esta aplicación, consiste en la introducción de segmentos de columnas de acero inoxidable en el interior de carcasas de material PEEK, que se atornillan entre sí para mantener las columnas unidas (Figura 8.1). En principio, este sistema podría funcionar, pero sufre de algunos problemas mecánicos y técnicos graves:

- (i) *Alineamiento de las columnas y conectores*: La elevada presión en el sistema cromatográfico obliga a unir fuertemente los segmentos de columna de acero inoxidable, con el fin de evitar fugas de fase móvil. Con este propósito, los segmentos de columna deben alinearse perfectamente. Las carcasas de material PEEK también deben alinearse perfectamente para poder atornillarse correctamente. Sin embargo, tras un uso continuado, es difícil desatornillar las carcasas, y al intentarlo pueden sufrir un grave deterioro, e incluso romperse (Figura 8.3).



Figura 8.3. Piezas deterioradas del sistema POPLink.

- (ii) *Tiempo de estabilización del sistema:* La estabilización de la línea base puede ser lenta, debido a problemas de fugas y/o de alineamiento de las piezas. El tiempo de estabilización puede abarcar hasta dos horas, con fluctuaciones de la presión de $\pm 50\%$. Tras este tiempo, las fluctuaciones pueden reducirse a menos del $\pm 5\%$ y entonces puede procederse a realizar las inyecciones. Cuando las carcasas se encajan correctamente (lo que se logra tras un periodo de entrenamiento), la presión puede estabilizarse tan rápidamente como cuando se trabaja con columnas convencionales (columnas aisladas).
- (iii) *Volumen extra-columnar no despreciable en las conexiones entre las columnas:* El volumen muerto entre los segmentos puede no ser despreciable. Aunque se hace uso de conexiones ZDV para acoplar las columnas, según se ha indicado, estas conexiones son insuficientes para mantener las columnas firmemente unidas. Por otro lado, es posible que debido a un atornillado imperfecto de las carcasas de material PEEK a causa de la inexperiencia del analista, las conexiones no sean

suficientemente firmes. Esto crea una pequeña cámara de mezcla en la unión entre las columnas, originando separaciones que dependen ligeramente del orden de los segmentos acoplados.

Veamos cómo afectan estas características al funcionamiento del sistema de columnas acopladas. En primer lugar, teóricamente, en elución isocrática, el orden de las columnas no debería afectar al tiempo de retención. La Tabla 8.1 ilustra el efecto del cambio del orden de las columnas observado en nuestro laboratorio. Cabe destacar que los autores de la patente del sistema POPLink señalaron en uno de sus artículos que "la exactitud de los tiempos de retención y las selectividades (medidas como el cociente de los tiempos de retención) depende ligeramente de la secuencia de las diferentes fases estacionarias" [13]. También indicaron que la razón de estas diferencias no estaba clara, pero en su opinión, "el proceso de separación en los extremos de las columnas puede diferir del que tiene lugar en otras partes de los segmentos de columna". Esto sugiere que el empacado de las columnas en el acoplamiento puede no ser lo suficientemente homogéneo. Tal vez, las uniones ZDV colocadas en los extremos de los segmentos dan lugar a diferencias en la densidad del empacado en estas zonas. Este efecto se agrava con el desgaste de las columnas. Por supuesto, la importancia de los cambios en los tiempos de retención con el orden de las columnas dependerá de la aplicación específica que se realice.

Tabla 8.1. Influencia del orden de las columnas sobre los tiempos de retención para varias combinaciones de fases estacionarias.

Compuestos	POPLC				ACE			
	Combinación 1 4 cm SH2 + 4 cm EPS + 4 cm CN	Combinación 2 6 cm EPS + 6 cm CN	Combinación 3 2 cm C18 + 5 cm Fenilo + 3.5 cm CN	Combinación 4 3 cm HL + 3 cm AQ 3 cm HL	Combinación 3 3.5 cm CN + 5 cm Fenilo + 2 cm C18	Combinación 3 3 cm HL + 3 cm AQ	Combinación 4 3 cm HL + 3 cm HL	
Sulfacetamida	2.75	2.62	2.33	2.22	4.13	4.14	2.56	2.56
Sulfacoloropiridazina	10.54	9.90	7.99	7.74	17.98	18.00	12.25	12.30
Sulfadiazina	3.20	2.98	2.55	2.48	4.91	4.91	3.17	3.17
Sulfadimetoxina	36.01	34.37	26.72	25.60	53.14	53.14	43.50	43.50
Sulfaguanidina	1.38	1.33	1.24	1.24	2.13	2.13	1.35	1.35
Sulfamerazina	4.05	3.87	3.04	2.90	6.62	6.62	4.62	4.63
Sulfametazina	5.25	4.94	3.70	3.47	8.82	8.82	6.51	6.51
Sulfametizol	7.17	6.84	5.51	5.16	11.43	11.43	7.87	7.87
Sulfametoxazol	13.00	12.49	10.18	9.54	20.88	20.88	15.07	15.10
Sulfamonometoxina	9.96	9.47	7.30	6.82	15.65	15.64	11.72	11.72
Sulfamilamida	1.65	1.60	1.45	1.38	2.55	2.55	1.60	1.57
Sulfapiridina	3.66	3.44	2.75	2.63	6.05	6.05	4.16	4.17
Sulfaquinoxalina	46.95	46.40	34.67	35.23	68.11	68.11	55.23	55.22
Sulfatiazol	3.84	3.69	3.12	3.02	6.54	6.56	4.15	4.14
Sulfisoxazol	17.99	18.08	14.51	13.20	27.04	27.05	19.46	19.46

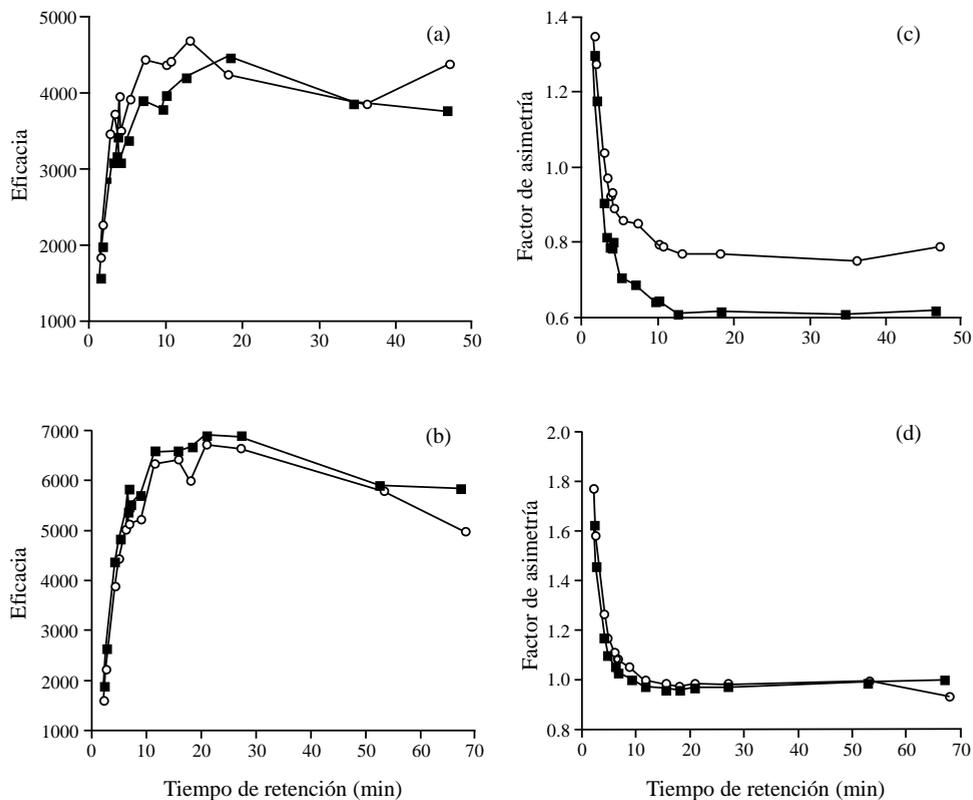


Figura 8.4. Influencia del orden de las columnas sobre la eficacia de los picos cromatográficos (calculada de acuerdo a Foley y Dorsey [33]), y asimetría de los picos (medida como grado de asimetría, B/A , donde A y B se han medido al 10% de la altura de los picos). (a y c) Combinaciones POPLink: (■) C_{18} -SH2 (4 cm) + C_{18} -EPS (4 cm) + Ciano (4 cm), and (○) Ciano (4 cm) + C_{18} -EPS (4 cm) + C_{18} -SH2 (4 cm), y (b y d) combinaciones de columnas ACE: (■) ACE C_{18} (2 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE CN (3.5 cm), y (○) ACE CN (3.5 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE C_{18} (2 cm). Fase móvil: 10% v/v de acetonitrilo.

También se estudió el efecto del orden de los segmentos de columna sobre el perfil de los picos cromatográficos. Los resultados se han representado en la Figura 8.4a y c, donde es evidente que el orden de las columnas en el sistema POPLink también afecta a la eficacia y grado de asimetría de los picos cromatográficos. Las conexiones no ideales del sistema POPLink pueden también explicar que los tiempos muertos no sean exactamente proporcionales a las longitudes de los segmentos. Así, para la fase estacionaria Prontosil C₁₈-SH2, el tiempo muerto medido en nuestro laboratorio, para columnas de 4 cm, 5 cm (formadas con segmentos de 4 y 1 cm), 8 cm, y 10 cm (formadas con segmentos de 8 y 2 cm), resultó ser $t_0 = 0.11, 0.20, 0.14, \text{ y } 0.27$, respectivamente. Por su parte, para la fase estacionaria Prontosil C₁₈-EPS y segmentos de 4 cm, 5 cm (4 + 1), 6 cm (4 + 2), 8 cm, 10 cm (8 + 2) y 12 cm (8 + 4): $t_0 = 0.086, 0.14, 0.16, 0.19, 0.34, \text{ y } 0.42$ min, respectivamente. Como se observa, el tiempo muerto para los segmentos acoplados (véase el ejemplo de 8 + 4 cm) es sensiblemente más alto que la suma de los valores para cada uno de los segmentos (8 y 4 cm).

b) Uso de conectores externos ZDV para unir las columnas

En primer lugar, pensamos que una posible solución de los problemas encontrados en el sistema POPLink era la sustitución de las carcasas de material PEEK por otras construidas con acero inoxidable, pero antes de proceder a esta solución, adoptamos una más simple. En los últimos años, hemos utilizado pequeños conectores de material PEEK de una sola pieza (Figura 8.2), comercializados por varios fabricantes, para unir directamente las columnas analíticas a las pre-columnas de protección. Puesto que el volumen muerto de estos conectores es prácticamente nulo (se trata de conectores

ZDV), la pérdida en la eficacia de las columnas es insignificante. Además, estas conexiones de material PEEK se atornillan muy fácilmente, y de forma completamente reproducible, a los extremos de las columnas. Por lo tanto, las columnas quedan firmemente unidas entre sí, sin la necesidad del uso de carcasas. El material PEEK de estos conectores es muy robusto, inerte y biocompatible con una amplia variedad de aplicaciones.

Así, la solución al acoplamiento de las columnas en serie estaba disponible en nuestro laboratorio. Pensamos en acoplar columnas de diversas longitudes y naturalezas con los conectores ZDV de material PEEK. Consideramos varios fabricantes, y finalmente adquirimos columnas de acero inoxidable y conectores de material PEEK de ACE Systems. Sin embargo, debe indicarse que los conectores de ACE y de otros fabricantes son compatibles con las columnas convencionales de cualquier otro fabricante. Por lo tanto, no hay necesidad de utilizar un sistema especialmente diseñado para acoplar columnas, ni la dependencia de un fabricante determinado.

Hemos encontrado que la unión de columnas cromatográficas con los conectores de material PEEK ofrece resultados altamente fiables, el trabajo es muy cómodo (el problema con el atornillado/desatornillado de las carcasas que mantienen unidas las columnas en el sistema POPLink no existe), y el sistema es muy robusto: hemos utilizado los mismos conectores PEEK durante meses sin observar ningún deterioro. Finalmente, el orden de las fases estacionarias no afecta a los tiempos de retención y a los parámetros que describen el perfil de los picos, como puede observarse en la Tabla 8.1 y Figuras 8.4b y d.

8.5.3. Directrices para construir un software de optimización

Como se ha indicado, la predicción de los tiempos de retención y de los perfiles de los picos cromatográficos, para las columnas acopladas en serie, requiere la medida previa de estos parámetros para cada soluto y fase estacionaria, a una longitud de columna y composición de la fase móvil seleccionadas. El número de medidas que deben realizarse es reducido, y la predicción de los tiempos de retención es muy simple y puede llevarse a cabo de acuerdo a las Ecuaciones (8.1) u (8.8). Cabe señalar que una vez que se han modelizado los parámetros de pico (tiempos de retención, y anchuras o semi-anchuras), las metodologías que se utilizan para predecir los perfiles de los picos y su resolución, y eventualmente optimizar la separación, son las mismas que las empleados para la optimización convencional de la composición de la fase móvil para una columna aislada. En cualquier caso, la complejidad varía dependiendo del enfoque aplicado y la exactitud requerida.

Nyiredy *et al.* desarrollaron un software de optimización, que se comercializa junto al sistema POPLink para facilitar su aplicación [11,13]. En este software, sólo se examina un nivel de disolvente orgánico que es previamente elegido por el analista atendiendo al tiempo de análisis total. La predicción de los tiempos de retención se basa en el método PRISMA, que los autores habían aplicado anteriormente para optimizar la composición de la fase móvil en cromatografía plana y HPLC [22,23]. En el caso de trabajar con tres fases estacionarias, la representación geométrica es un prisma, en el que la longitud de cada lado se corresponde con la "polaridad" de la fase estacionaria respectiva. El método utiliza el plano irregular superior del prisma (el triángulo en la cubierta superior) para optimizar las combinaciones. Naturalmente, se puede generalizar a más de tres fases estacionarias. El algoritmo en el software

desarrollado explora todas las combinaciones posibles de segmentos, teniendo en cuenta restricciones relacionadas con los valores máximos del tiempo de análisis y la longitud de la columna combinada. El software calcula los factores de retención de acuerdo a la Ecuación (8.8), y encuentra la combinación óptima de una manera convencional, maximizando la resolución de Snyder, R_s , para el par de picos crítico. Se construyen cromatogramas con picos gaussianos, que se dibujan de acuerdo a la eficacia del sistema de columnas acopladas, con el fin de mejorar las predicciones.

En base a la experiencia previa del grupo de investigación en el campo de la optimización cromatográfica, se desarrolló un enfoque diferente para optimizar la resolución para el sistema de columnas acopladas en serie. Se prefirió calcular los tiempos de retención para las combinaciones de segmentos de columna en base a la Ecuación (8.7). Además, se construyeron modelos para predecir las semi-anchuras izquierda y derecha (Ecuaciones (8.9) y (8.10), respectivamente), a fin de pronosticar para cada analito, la anchura y la asimetría de los picos a diferentes tiempos de retención. Esta información puede obtenerse a partir de las semi-anchuras de los picos de varios solutos eluidos con una única fase móvil, con la condición de que todos ellos experimenten la misma cinética de reparto. Las semi-anchuras para un segmento aislado de cualquier otra longitud se obtuvieron de acuerdo a las Ecuaciones (8.11) y (8.12). Por último, se calculó el grado de asimetría $(B/A)_c$ para todas las combinaciones posibles de los segmentos de columna, utilizando las Ecuaciones (8.13) y (8.14), para predecir A y B por separado y se predijo la anchura de la combinación de columnas $(A+B)_c$, utilizando la Ecuación (8.15).

Se calculó la resolución cromatográfica utilizando el concepto de pureza de pico, que es la fracción de pico no solapado [34,35]. Este valor oscila entre 0

(solapamiento completo) y 1 para la resolución hasta la línea base. La resolución global (P) se obtuvo como el producto de las purezas de pico para todos los solutos eluidos en un cromatograma. Por lo tanto, el intervalo de valores de pureza de pico global es también $0 \leq P \leq 1$. Obviamente, la medida de la resolución utilizando la pureza de pico requiere la predicción exacta del perfil de los picos para obtener el máximo aprovechamiento de este concepto.

8.5.4. Resolución y tiempo de análisis para las columnas individuales

Como se ha comentado, en este capítulo se comparan dos sistemas diferentes para conectar columnas en serie. Para predecir los tiempos de retención para combinaciones de columnas de cualquier longitud, y eventualmente, obtener la combinación que proporciona la máxima resolución, se obtuvieron para cada sulfonamida los tiempos de retención y los parámetros del perfil de los picos para columnas de longitudes seleccionadas conteniendo distintas fases estacionarias (columnas de referencia). Para el sistema POPLink, todas las medidas se realizaron utilizando columnas de 8 cm conteniendo C₁₈-SH2, C₁₈-EPS, Fenilo 2, Ciano y C₃₀. Para el sistema ACE, no se disponía en nuestro laboratorio de columnas de la misma longitud para cada una de las fases, por lo que las medidas se efectuaron con columnas de diferentes longitudes (que se indican entre paréntesis): ACE C₁₈ (9 cm, formada por dos segmentos de 2 cm y un segmento de 5 cm), ACE C₁₈-HL (3 cm), ACE AQ (5 cm), ACE CN (11 cm, formada por un segmento de 7.5 cm y un segmento de 3.5 cm), y ACE Fenilo (5 cm).

El método mostrado en este capítulo es muy simple y se basa en la selección arbitraria previa de la composición de la fase móvil. Nosotros escogimos una fase que contenía un 10% de acetonitrilo, que ofrecía una fuerza eluyente suficientemente baja para permitir una elevada capacidad pico. En primer lugar, se mostrará el comportamiento de cada columna con esta fase móvil. Las Figuras 8.5 y 8.6 muestran los cromatogramas de las columnas POPLink y ACE, respectivamente. Para una mejor comparación de los resultados, los cromatogramas que se muestran corresponden a predicciones para columnas de la misma longitud (12 cm).

Como se observa, para todas las columnas, dos o más solutos permanecen sin resolver. Para el sistema de POPLink, el valor de pureza de pico (resolución) se encuentra por debajo de $P = 0.01$ para todas las columnas, excepto para la columna Fenilo 2 para la que $P = 0.50$ (que supone también una resolución baja para el par crítico). Los tiempos de análisis oscilaron entre 10 y 70 min. Por lo general, los picos de sulfamerazina, sulfapiridina y sulfatiazol solapan, pero para algunas columnas otros solutos tampoco se resuelven. La selectividad varía entre las columnas, aunque con cambios menores en el orden de elución.

Para el sistema ACE, la resolución se encuentra también por debajo de $P = 0.01$ para todas las columnas, excepto para la columna C_{18} ACE, para la que $P = 0.43$. Los tiempos de análisis son generalmente mayores que para las columnas POPLink, y oscilan entre 22 y 160 min. Como en el sistema POPLink, sulfamerazina, sulfapiridina y sulfatiazol permanecen generalmente sin resolver, mientras que otros solutos muestran solapamientos de diversa magnitud.

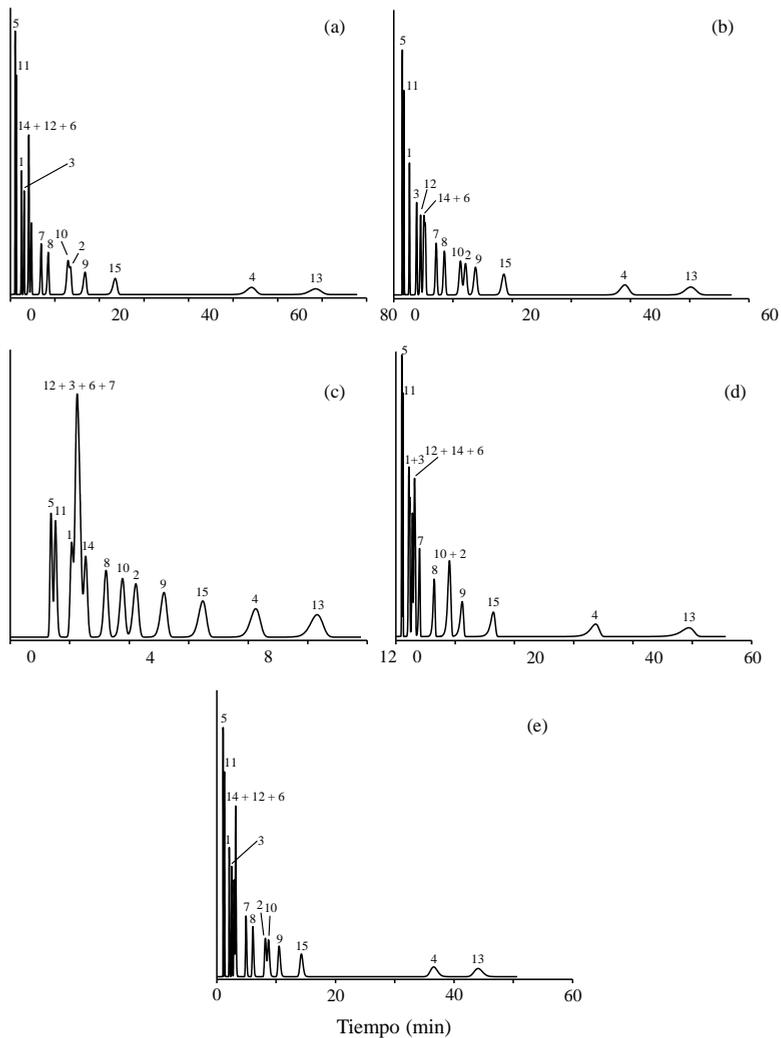


Figura 8.5. Cromatogramas simulados utilizando 10% v/v de acetonitrilo para separar el conjunto de 15 sulfonamidas mediante columnas POPLink de 12 cm: (a) C₁₈-SH2, (b) Fenilo 2, (c) Ciano, (d) C₁₈-EPS, y (e) C₃₀. Solutos: (1) sulfacetamida, (2) sulfacloropiridazina, (3) sulfadiazina, (4) sulfadimetoxina, (5) sulfaguanidina, (6) sulfamerazina, (7) sulfametazina, (8) sulfametizol, (9) sulfametoxazol, (10) sulfamonometoxina, (11) sulfanilamida, (12) sulfapiridina, (13) sulfaquinoxalina, (14) sulfatiazol, y (15) sulfisoxazol.

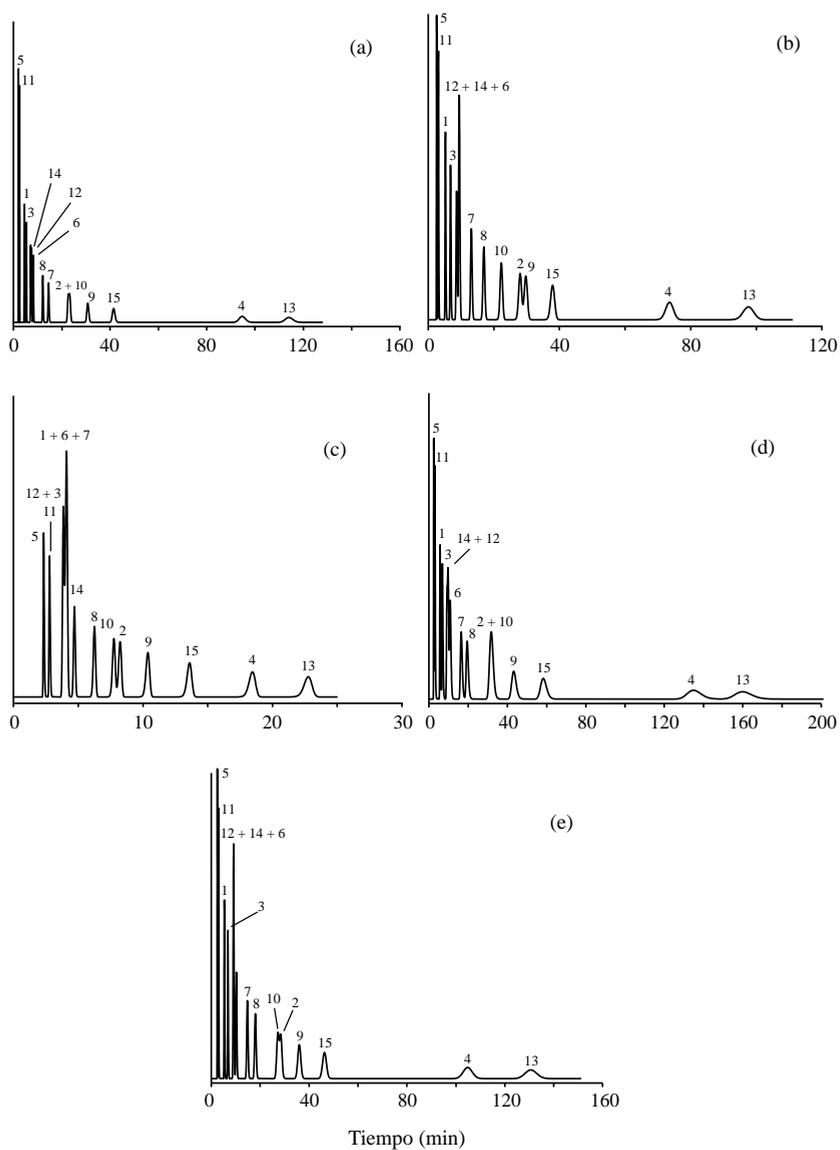


Figura 8.6. Cromatogramas simulados para columnas ACE de 12 cm: (a) ACE C₁₈, (b) ACE Fenilo, (c) ACE CN, (d) ACE C₁₈-HL, y (e) ACE AQ. Para otros detalles, véase la Figura 8.5.

En las columnas ACE, los cambios en la selectividad y en el orden de elución entre columnas son, por lo general, más importantes que para el sistema de POPLink. La selectividad para ACE C₁₈ y ACE C₁₈-HL es similar, pero la retención es mayor para la ACE C₁₈-HL. Esta diferencia de comportamiento puede ser interesante para ciertas separaciones, como se muestra a continuación. Debe indicarse que tampoco fue posible resolver completamente el conjunto de las 15 sulfonamidas con las columnas utilizadas aisladamente a otras composiciones de fase móvil, en el intervalo del 10 al 20% de acetonitrilo.

8.5.5. Predicción de cromatogramas para las columnas combinadas

Las Figuras 8.7 y 8.8 muestran cromatogramas para combinaciones de tres fases estacionarias, utilizando el sistema de columnas POPLink y ACE, respectivamente, utilizando una fase móvil conteniendo un 10% de acetonitrilo. Los cromatogramas experimentales (Figuras 8.7a y 8.8a) se comparan con los predichos usando el software desarrollado en nuestro laboratorio (Figuras 8.7b y 8.8b), que tiene en cuenta el perfil de los picos, y también de acuerdo con el software desarrollado para el sistema POPLink (Figuras 8.7c y 8.8c). Las diferencias observadas en la predicción de los tiempos de retención entre el software POPLink y el desarrollado para las columnas ACE son notorias. Debe observarse que sólo el software desarrollado en nuestro laboratorio reproduce con exactitud las asimetrías observadas en los cromatogramas experimentales.

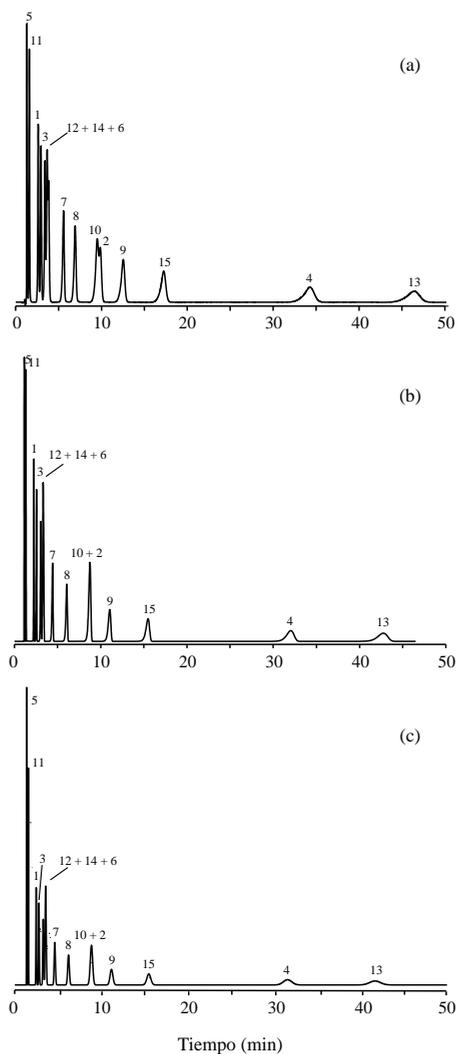


Figura 8.7. Cromatogramas para la combinación de columnas POPLink C₁₈-SH2 (4 cm) + C₁₈-EPS (4 cm) + Ciano (4 cm). Cromatogramas: (a) experimental, (b) predicho de acuerdo al software desarrollado para este trabajo, y (c) predicho de acuerdo al software desarrollado para el sistema POPLink. Las áreas en los cromatogramas predichos están normalizadas. Para otros detalles, véase la Figura 8.5.

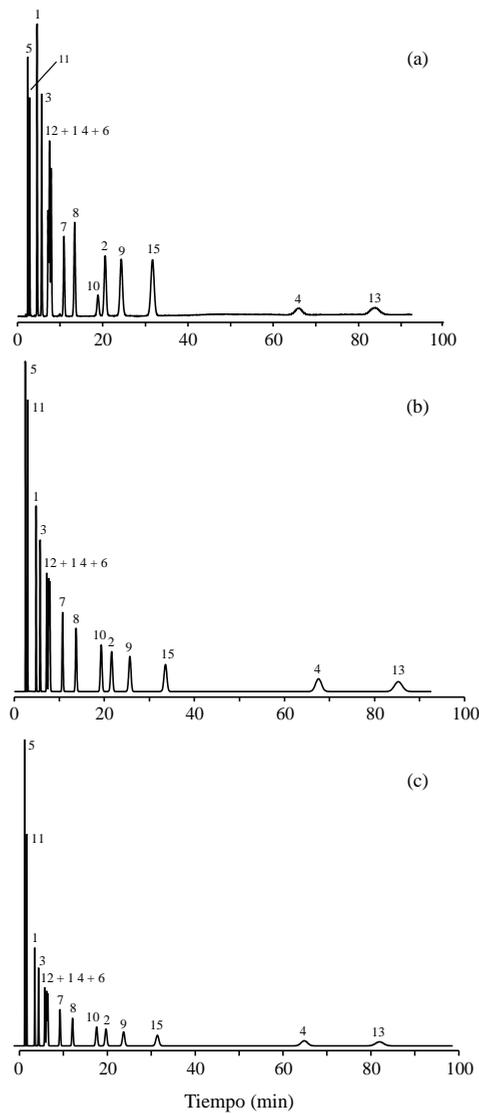


Figura 8.8. Cromatogramas para la combinación de columnas ACE C₁₈ (4 cm, dos segmentos de 2 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE CN (3.5 cm). Cromatograma: (a) experimental, (b) predicho de acuerdo al software desarrollado para este trabajo, y (c) predicho de acuerdo al software desarrollado para el sistema POPLink. Para otros detalles, véanse las Figuras 8.5 y 8.7.

A pesar de las aproximaciones (Ecuaciones (8.13)–(8.15)) adoptadas para predecir el perfil de los picos, la concordancia entre los cromatogramas experimentales y los predichos es altamente satisfactoria.

Utilizando el software desarrollado para este trabajo, las mejores predicciones para los cromatogramas de las Figuras 8.7 y 8.8 se obtuvieron para la combinación de columnas ACE, con errores relativos medios de $(1.1 \pm 0.7)\%$, frente a $(11.7 \pm 2.8)\%$ para el sistema POPLink. Las predicciones para este último sistema mejoraron cuando se realizaron con el software POPLink, disminuyendo hasta $(3.1 \pm 1.8)\%$. Sorprendentemente, el software POPLink empeoró significativamente las predicciones para las columnas ACE: $(29.7 \pm 17.3)\%$. Es interesante indicar que en ambos casos, la magnitud de los errores se correlacionó con el tiempo de retención. Se obtuvieron resultados similares con otras combinaciones para ambos sistemas.

Este tipo de resultados sugiere la existencia de un error proporcional en los tiempos de retención, que se puede asociar a diferencias en los volúmenes muertos utilizados en cada software. Probablemente, el software del sistema POPLink, además de la corrección debida a la longitud de la columna, incorpora algún tipo de factor aplicado al volumen muerto de cada segmento (que no está documentado). De hecho, hemos comprobado que si los volúmenes muertos corregidos por la longitud se incrementan en aproximadamente un 5–20% (dependiendo de la naturaleza de los segmentos de columna), las predicciones para las columnas POPLink proporcionadas por nuestro software son satisfactorias. Por lo tanto, aparentemente, se produce un incremento en el volumen muerto asociado a las conexiones entre las columnas en este sistema, que es tenido en cuenta por el software POPLink. Esta corrección no es necesaria para las columnas ACE, y en consecuencia, las

predicciones para estas columnas proporcionadas por el software de las POPLink no son correctas. Afortunadamente, estas inexactitudes no se traducen en errores en la predicción de la selectividad.

La Figura 8.9 muestra la combinación óptima para los dos sistemas de columnas acoplados en serie (POPLink y ACE), de acuerdo al software desarrollado en nuestro laboratorio, para un 10% de acetonitrilo y restringiendo la longitud máxima a 15 cm, la presión máxima a 275 bares y el tiempo de análisis máximo a 50 min, para reducir el volumen de cálculo. De las soluciones encontradas, se seleccionó la que resolvió la mezcla de 15 sulfonamidas en el mínimo tiempo posible. Como se observa, para el sistema ACE se consiguió la resolución total: ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (5 cm), con un valor de resolución $P = 0.991$ y tiempo de análisis de 27 min. Por su parte, con el sistema POPLink formado por la combinación de tres columnas: Fenilo 2 (1 cm) + Ciano (5 cm) + C₁₈-EPS (2 cm), el óptimo presentó un pequeño solapamiento para tres pares de picos, con $P = 0.871$ y tiempo de análisis de 17 min.

Finalmente, se comprobó que el uso de una fase móvil con una fuerza eluyente mayor, como 17% de acetonitrilo, disminuye el tiempo de análisis hasta 19 min para el sistema ACE, siendo la mejor combinación: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (1 cm) + ACE AQ (2 cm), con $P = 0.987$. Con el sistema ACE, la presión del sistema se situó siempre por debajo de los 100 bares.

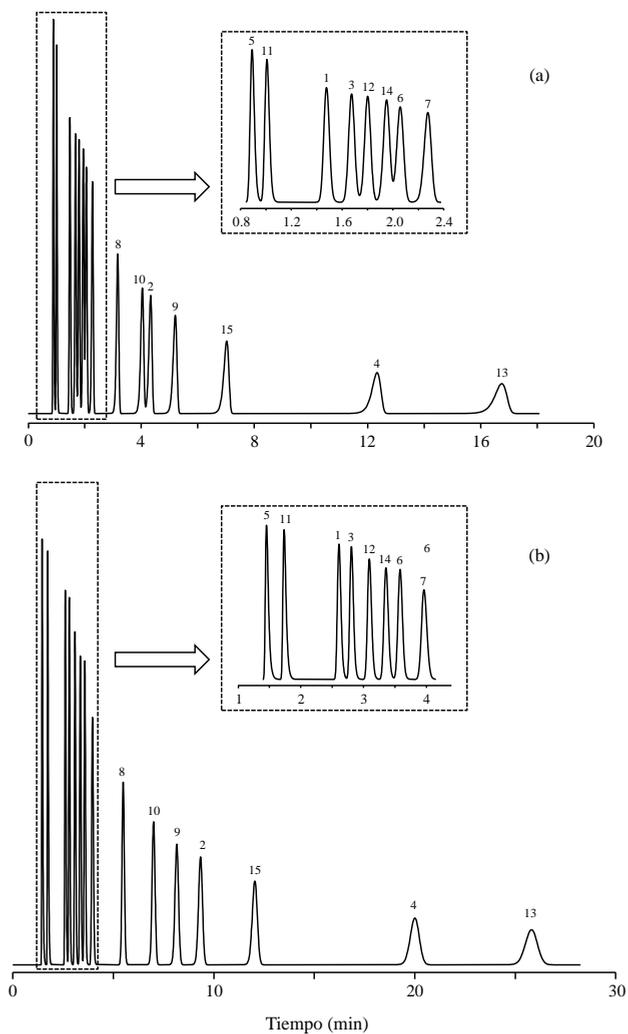


Figura 8.9. Cromatogramas óptimos para: (a) Sistema POPLink (Fenilo 2 (1 cm) + Ciano (5 cm) + C₁₈-EPS (2 cm)), y (b) sistema ACE (ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (5 cm)). Para predecir los cromatogramas se utilizó el software desarrollado para este estudio. Para otros detalles, véase la Figura 8.5.

8.5.6. *Perfiles de pico*

Es interesante indicar que todos los picos obtenidos con las columnas POPLink presentaron una deformación frontal, a excepción de la columna C₃₀ (Figura 8.5), siendo el valor del grado de asimetría (B/A) para el conjunto de sulfonamidas: C₁₈-EPS (0.58 ± 0.15), C₁₈-SH2 (0.76 ± 0.09), Fenilo 2 (0.90 ± 0.09), Ciano (0.94 ± 0.19), y C₃₀ (1.41 ± 0.16). El efecto frontal fue más notorio para la combinación de columnas. Así, para el cromatograma de la Figura 8.7a, $B/A = 0.73 \pm 0.24$.

Por el contrario, las columnas ACE ofrecieron picos gaussianos o con colas moderadas (los picos mostraron raramente deformación frontal). El grado de asimetría (B/A) fue: ACE CN (0.99 ± 0.20), ACE C₁₈ (1.11 ± 0.03), ACE Fenilo (1.13 ± 0.21), ACE AQ (1.15 ± 0.17), y ACE C₁₈-HL (1.55 ± 0.27). Se obtuvieron también picos prácticamente simétricos para las combinaciones de columna ACE, siendo $B/A = 1.14 \pm 0.24$ para el cromatograma de la Figura 8.8a.

La obtención de los gráficos de semi-anchura ayuda a evaluar el perfil de los picos. Las Figuras 8.10 y 8.11 representan estos gráficos para los cromatogramas de las Figuras 8.5 a 8.8, utilizando los datos obtenidos para el conjunto de las 15 sulfonamidas eluidas con el sistema POPLink y ACE, respectivamente. Como se observa, los puntos representados siguen una tendencia parabólica (Ecuaciones (8.9) y (8.10)), pero para algunas columnas la tendencia es casi lineal, con coeficientes de correlación $r^2 > 0.995$ y 0.999 para los sistemas POPLink y ACE, respectivamente, a excepción de la semi-anchura derecha para la columna ciano en ambos sistemas, con $r^2 = 0.893$ y 0.968 , respectivamente. Para las combinaciones de columnas, $r^2 > 0.995$ y 0.9993 , respectivamente.

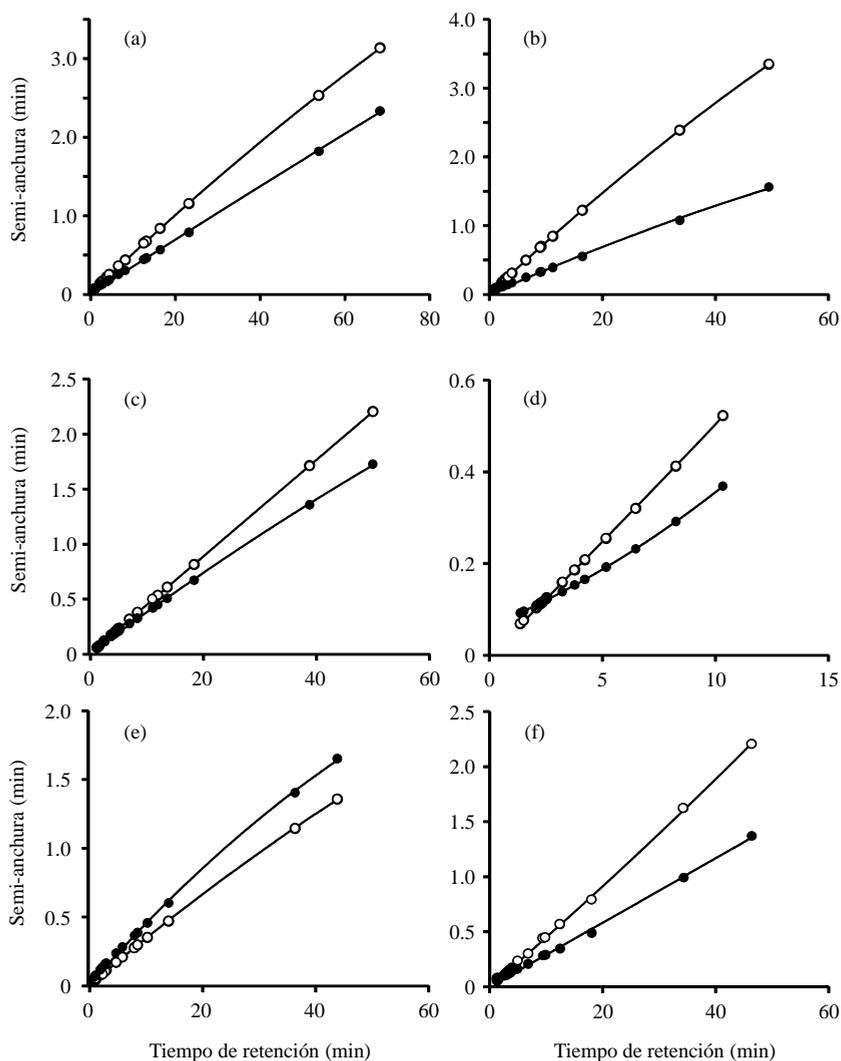


Figura 8.10. Gráficos de semi-anchura para columnas POPLink aisladas de 12 cm y una combinación de columnas: (a) C_{18} -SH2, (b) Fenilo 2, (c) Ciano, (d) C_{18} -EPS, (e) C_{30} , y (f) combinación de C_{18} -SH2 (4 cm) + C_{18} -EPS (4 cm) + Ciano (4 cm). Los datos experimentales corresponden al conjunto completo de 15 sulfonamidas, eluidas con un 10% de acetonitrilo. Semi-anchuras: derecha, B (●) e izquierda, A (○).

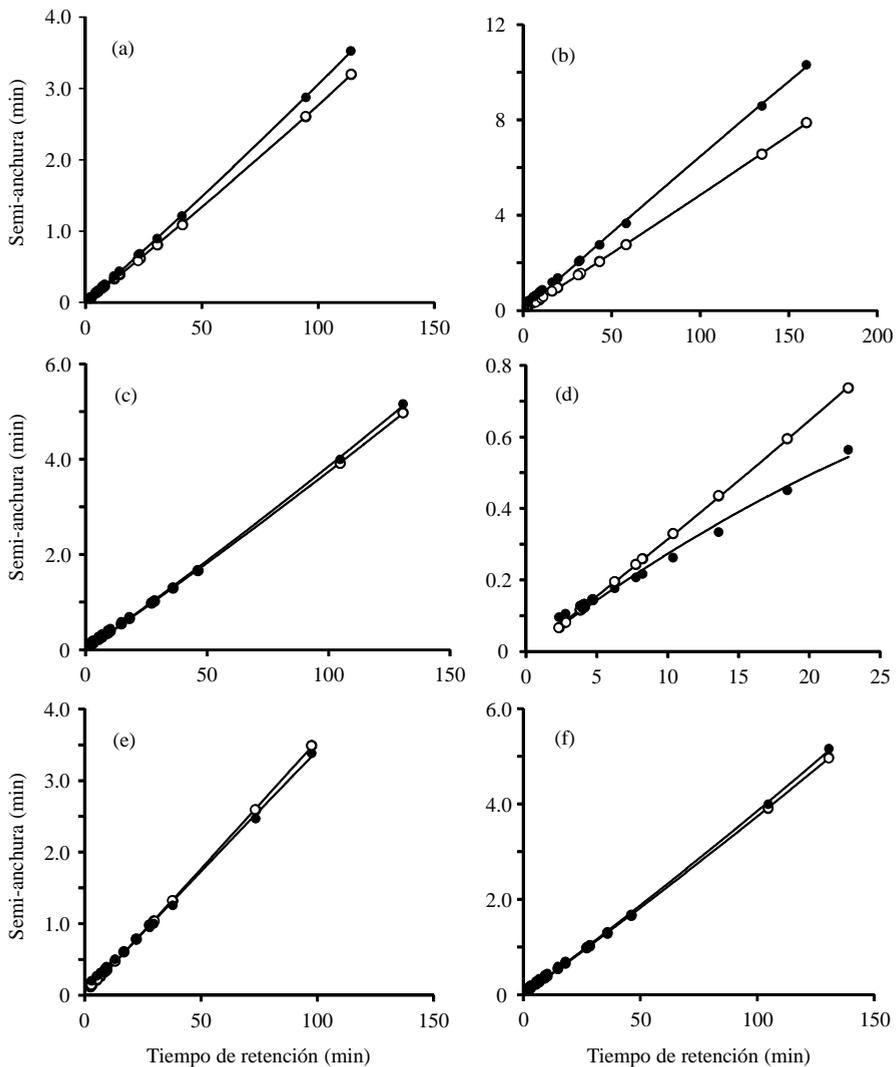


Figura 8.11. Gráficos de semi-anchura para columnas ACE aisladas de 12 cm y una combinación de columnas: (a) ACE C₁₈, (b) ACE Fenilo, (c) ACE CN, (d) ACE C₁₈-HL, (e) ACE AQ, y (f) combinación de ACE C₁₈ (4 cm, dos segmentos de 2 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE CN (3.5 cm). Los datos experimentales corresponden al conjunto completo de 15 sulfonamidas, eluidas con un 10% de acetonitrilo. Semi-anchuras: derecha, B (\bullet) e izquierda, A (\circ).

Los gráficos de las Figuras 8.10 y 8.11 muestran claramente el efecto frontal que presentan los picos para el sistema POPLink y la elevada simetría para las columnas ACE.

Se comprobó, para el sistema de columnas POPLink, que inyectando disoluciones de menor concentración (diluidas en un factor de 10–20), los picos obtenidos continuaban teniendo deformación frontal con el mismo grado de asimetría. Este efecto también ha sido observado para compuestos distintos de las sulfonamidas con las columnas POPLink, y se pueden contemplar en algunos cromatogramas publicados que utilizan el sistema POPLink [15,18].

Una posible razón del origen de los picos frontales puede ser la existencia de volúmenes muertos en el sistema [36]. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una conexión descuidada de columnas Prontosil Fenil 2 y C₁₈-SH2. Se obtuvieron picos extremadamente frontales, con valores similares para la semi-anchura izquierda para todos los picos del cromatograma (con un valor medio de $B/A = 0.49$).

Debe recordarse la observación realizada en este trabajo, en la que se indica que el volumen muerto de las combinaciones de los segmentos del sistema POPLink es mayor que la suma de los volúmenes muertos de los segmentos aislados (Sección 8.5.2a). Por lo tanto, las uniones ZDV en los extremos de los segmentos de columna, así como las conexiones imperfectas entre los segmentos, parecen generar cámaras entre las columnas, que seguramente provocan algunos de los efectos negativos obtenidos con estas columnas.

8.6. Conclusiones

En teoría, el acoplamiento de columnas en serie es una estrategia sencilla que puede proporcionar excelentes separaciones para problemas complejos, imposibles de conseguir en la estrategia convencional que utiliza una única columna y se optimiza la composición de la fase móvil. El tratamiento matemático es, además, muy simple. Sin embargo, todavía debían resolverse algunos problemas técnicos para que el acoplamiento de columnas tuviera valor práctico. En este capítulo, se comparan dos sistemas distintos para realizar el acoplamiento de columnas en serie, uno de ellos desarrollado por nosotros para este trabajo.

El sistema POPLink es una solución interesante, diseñada exclusivamente para esta aplicación, que incluye segmentos de columna de acero en una amplia diversidad de longitudes (1, 2, 4 y 8 cm), lo que permite la construcción de cualquier combinación de columnas que difieran en 1 cm. Este sistema adolece del inconveniente de que los segmentos de columnas requieren carcasas de material PEEK para quedar firmemente unidas. Dicho material sufre deterioro por el uso. Una posible solución a la fragilidad del material PEEK de las carcasas (aunque quizás más cara) es su sustitución por carcasas de acero inoxidable. Otra solución más conveniente consiste en eliminar las carcasas y utilizar conectores de columnas que se atornillan a ellas directamente, manteniéndolas unidas firmemente. Esta solución parece ser más robusta, y al parecer, elimina los problemas de la presencia de un volumen muerto significativo entre las columnas. Además, existen varios fabricantes que comercializan este tipo de conexión entre columnas. Un posible problema con este sistema de acoplamiento podría ser la falta de disponibilidad de segmentos de columnas en una variedad suficiente de longitudes. Si se

resuelven todos estos problemas, se espera un futuro prometedor para el acoplamiento de columnas en serie.

El sistema de acoplamiento de columnas desarrollado en nuestro laboratorio con las columnas ACE, combinado con los algoritmos de predicción de los cromatogramas que también hemos desarrollado, proporcionó errores en los tiempos de retención de aproximadamente un 1%, y predicciones altamente fiables para el perfil de los picos. Por lo tanto, el sistema ACE parece ser muy prometedor para implementar la estrategia de columnas acopladas en serie, aunque se debe mencionar nuevamente que pueden utilizarse columnas y conectores de otros fabricantes. En este capítulo, se ha hecho uso de elución isocrática, utilizando una composición de fase móvil pre-seleccionada. En los siguientes capítulos se tratarán las ventajas de la optimización simultánea de la composición de la fase móvil, junto a la naturaleza y la longitud de las columnas, así como el uso de gradientes, que recientemente han sido abordados en la bibliografía para el sistema POPLink [16,17,19].

8.7. Referencias

- [1] P.J. Schoenmakers, *Optimisation of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [2] R.M. Smith, *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [3] L.R. Snyder, *Practical HPLC Method Development*, 2^a ed., Wiley, Nueva York, 1997.
- [4] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 187–198.

- [5] A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, *Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 892 (2000) 75–106.
- [6] H.J. Issaq, D.W. Mellini, T.E. Beesley, *Mixed reversed phase/beta cyclodextrin packings in high performance liquid chromatography: Single mixed support column versus two columns in series*, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 333–348.
- [7] H.J. Issaq, J. Gutiérrez, *Mixed packings in high performance liquid chromatography. II. Mixed packings vs. mixed ligands*, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 2851–2861.
- [8] C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, *Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. 544 (1991) 25–39.
- [9] D.J. Pietrzyk, S.M. Senne, D.M. Brown, *Anion-cation separations on a mixed-bed ion-exchange column with indirect photometric detection*, J. Chromatogr. 546 (1991) 101–110.
- [10] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: extension to serially coupled columns*, J. Chromatogr. A 691 (1995) 171–185.
- [11] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Stationary-phase optimized selectivity LC (SOS-LC): Separation examples and practical aspects*, Chromatographia 63 (2006) S3–S9.
- [12] D. Cabooter, G. Desmet, *Performance limits and kinetic optimization of parallel and serially connected multi-column systems spanning a wide range of efficiencies for liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1219 (2012) 114–127.
- [13] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the "PRISMA" principle*, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 122–130.
- [14] B. Sreedhar, A. Seidel-Morgenstern, *Preparative separation of multi-component mixtures using stationary phase gradients*, J. Chromatogr. A 1215 (2008) 133–144.

-
- [15] M. Kühnle, J. Rehbein, K. Holtin, B. Dietrich, M. Gradl, H. Yeman, K. Albert, *Phase optimized liquid chromatography as an instrument for steroid analysis*, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1655–1661.
- [16] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Multiple step gradient analysis in stationary phase optimised selectivity LC for the analysis of complex mixtures*, Chromatographia 69 (2009) 609–614.
- [17] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Stationary-phase optimized selectivity liquid chromatography: Development of a linear gradient prediction algorithm*, Anal. Chem. 82 (2010) 1733–1743.
- [18] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D.Y. Chen, *Application of phase optimized liquid chromatography to oligopeptide separations*, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 764–767.
- [19] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Selectivity optimization in green chromatography by gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7222–7230.
- [20] Bischoff Gmbh, K. Bischoff, S. Nyiredy, Z. Szücs, *Elements for separating substances by distributing between a stationary and a mobile phase, and method for the production of a separating device*, Patent Appl. No. 10 2005 024 154.9 (2005).
- [21] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Fundamentals of stationary phase optimized selectivity LC (SOS-LC)*, Acta Pharm. Hung. 77 (2007) 65–71.
- [22] S. Nyiredy, B. Meier, C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, *Prisma: A geometrical design for solvent optimization in HPLC*, J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 8 (1985) 186–188.
- [23] S. Nyiredi, K. Dallenbach-Toelke, O. Sticher, *Correlation and prediction of the k' values for mobile phase optimization in HPLC*, J. Liq. Chromatogr. 12 (1989) 95–116.
- [24] L.R. Snyder, *Classification of the solvent properties of common liquids*, J. Chromatogr. Sci. 16 (1978) 223–234.
-

- [25] J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Optimization of mobile phases for multisolvent gradient elution liquid chromatography*, J. Chromatogr. 255 (1983) 27–39.
- [26] F.M. Matysik, U. Schumann, W. Engewald, *Isocratic liquid chromatography with segmented columns and simultaneous UV and dual electrochemical detection: application to the selectivity enhancement for the determination of explosives*, Electroanalysis 20 (2007) 98–101.
- [27] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, *Detection of low-abundance impurities in synthetic thyroid hormones by stationary phase optimized liquid chromatography-mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 279–288.
- [28] M. Zedda, J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil, T.C. Schmidt, *A strategy for the systematic development of a liquid chromatographic mass spectrometric screening method for polymer electrolyte membrane degradation products using isocratic and gradient phase optimized liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8910–8917.
- [29] M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography: Suitable technique for screening analysis*, J. Chromatogr. A 947 (2002) 31–45.
- [30] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17–24.
- [31] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217, (2010) 1786–1798.
- [32] U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley, Nueva York, 1997.
- [33] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks*, Anal. Chem. 55 (1983) 730–737.

- [34] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography*, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125–145.
- [35] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Complementary mobile-phase optimisation for resolution enhancement in high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 17–35.
- [36] I.N. Papayodannis, A. Zotou, *Fronting of chromatographic peaks: Causes*, en *Encyclopedia of Chromatography* (editada por J. Cazes), Marcel Dekker, Nueva York, 2001, pág. 363.

CAPÍTULO 9

**OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE LA COMPOSICIÓN DE
LA FASE MÓVIL Y DE LA NATURALEZA Y LA LONGITUD
DE LAS COLUMNAS PARA ANALIZAR MUESTRAS
COMPLEJAS CON COLUMNAS ACOPLADAS EN SERIE**

9.1. Summary

The combination of the selectivity of different serially coupled columns improves the separation expectancies with regard to the separation offered by each single column. In the reported approaches, either a pre-selected isocratic mobile phase composition or gradient program, giving rise to acceptable retention, are used. In previous work, we showed that the approach succeeds with conventional columns, assembled through zero-dead volume couplers. In this work, the simultaneous interpretive optimisation of mobile phase composition and column nature and length, based on a limited number of experimental data, is demonstrated. This approach allows an impressive reduction in the number of different column lengths needed without loss of performance. The massive computation needed to develop the approach was cropped by restricting the maximal analysis time, total pressure and combined column length. Guidelines to model peak position and half-widths with low errors are given, which increase the reliability of the optimisations. Pareto plots, expressed as analysis time *versus* predicted resolution, assisted in the selection of the best separation conditions. Five ACE columns of different selectivity (C₁₈, C₁₈-HL, AQ, CN and Phenyl), available at two or three different lengths, were used to demonstrate the approach. Isocratic experiments with acetonitrile-water in the 10-20% v/v range were developed to model each single column, aimed to analyse a mixture of 15 sulphonamides. No single column was able to succeed in the full separation. In contrast, the comprehensive optimisation of mobile phase composition, together with column nature and length, allowed baseline resolution of the mixture in approximately 20 min.

9.2. Introducción

La idea de utilizar mezclas de disolventes o fases estacionarias, para conseguir la separación de muestras complejas, apareció en los primeros años de desarrollo de la cromatografía (especialmente en cromatografía de gases) [1–5]. Garay describió el efecto de una manera muy gráfica indicando que "es similar a la técnica de un pintor en la preparación del color verde mezclando pinturas de color cian y amarillo, incluyendo la modificación de la tonalidad mediante la alteración de las cantidades de las dos pinturas" [6]. En el contexto de la cromatografía, hablaríamos de la polaridad o la selectividad, en lugar del color: se pueden producir transiciones casi continuas entre las selectividades de los sistemas mixtos haciendo diferentes combinaciones. Sin embargo, no se ha producido un gran desarrollo en este campo en la cromatografía líquida, debido a varias dificultades como la interacción de los disolventes o fases estacionarias cuando se mezclan directamente, lo que da lugar a comportamientos de retención complejos no lineales [5,7], o a la necesidad de utilizar columnas dedicadas a un tipo de análisis rellenas con una mezcla pre-seleccionada de fases estacionarias o de una determinada longitud para una aplicación específica [8]. De ahí que la mayoría de los análisis se realicen utilizando una única fase estacionaria de longitud pre-seleccionada, y una fase móvil conteniendo una mezcla de dos disolventes. También, de acuerdo a Mao y Carr, "una de las principales razones del uso de una única fase estacionaria es la creencia de que la retención y la selectividad en la cromatografía líquida están dominadas por la fase móvil" [8].

El comportamiento de retención no lineal para la combinación de disolventes y fases estacionarias se solventa (manteniendo el efecto mixto de la selectividad) si los disolventes o fases estacionarias se combinan en serie,

dando lugar a la denominada "modulación del disolvente" [7,9,10], y "columnas acopladas en serie" ("columnas en tándem" o "gradiente de fase estacionaria") [5,11–16]. Estas estrategias, sin embargo, no se hayan libres de problemas, tales como la mezcla de disolventes en las interfases y el equilibrado de la fase estacionaria en el método de modulación del disolvente [7], o la conexión apropiada de las columnas sin cambiar la naturaleza de la fase estacionaria cerca de sus extremos, ni añadir un volumen muerto entre las columnas [16]. Por lo tanto, la idea de utilizar las columnas en serie sólo ha sido estudiada por unos pocos autores durante la última década [12–24].

En 2006, Nyiredy *et al.* dieron nuevamente vida a la idea de utilizar columnas acopladas en serie, a través de una patente con la compañía Bischoff Chromatography (a la que se denominó "sistema de columnas POPLink"), en el que segmentos de columnas de acero inoxidable de diferentes longitudes (reellenos con fases estacionarias de diferente naturaleza) se conectan a través de conectores de volumen muerto nulo (ZDV, *zero dead volume*) y se insertan en carcasas de poliéter-éter-cetona (PEEK, *polyether ether ketone*) para mantenerlas unidas entre sí [25]. En el Capítulo 8, se ha propuesto un sistema alternativo para construir "columnas conectadas en serie", mediante el uso de conectores de columnas ZDV que se atornillan directamente a columnas convencionales para mantenerlas unidas, sin la necesidad del uso de carcasas [16]. Se trata de un sistema convencional que evita la modificación de las columnas en sus extremos y la existencia de un volumen muerto asociado a las conexiones. También es más versátil, ya que se pueden combinar fácilmente columnas y conectores ZDV de diferentes fabricantes, sin la necesidad de emplear columnas sólo destinadas a ser conectadas en serie. Además, es posible añadir fácilmente nuevas fases estacionarias (incluso fases de nuevo

desarrollo), con lo que se incrementa enormemente el abanico de posibilidades. Otra propuesta, para poner en práctica la estrategia de columnas conectadas en serie, es el uso de capilares genéricos para conectar columnas cortas [17].

En el Capítulo 8, se describe un método para hallar la combinación óptima de columnas acopladas en serie que considera la anchura de los picos y su asimetría, junto con los tiempos de retención [16]. Esto permitió la predicción fiable de los cromatogramas en diversas condiciones. El método se basa en la información experimental obtenida a partir de las columnas aisladas, y se diseñó para la situación convencional descrita en la bibliografía, en la que se optimiza la naturaleza y la longitud de las columnas acopladas, mientras que la composición de la fase móvil isocrática o el gradiente aplicado se fijan a valores pre-seleccionados [13,21,23].

En la bibliografía, se ha sugerido que la optimización simultánea de la composición de la fase móvil, junto a la naturaleza y la longitud de las columnas, es idealmente, el método más potente para ajustar finamente la selectividad [13,18]. Sin embargo, hasta que se emprendió el estudio que aquí se presenta, ese método no se había implementado. En este capítulo, se muestra la forma como hemos abordado este desafío, utilizando cinco columnas ACE de diferente selectividad y longitud, y mezclas de acetonitrilo-agua. Se desarrollaron experiencias isocráticas para modelizar cada una de las columnas, con el objetivo de resolver la mezcla compleja de 15 sulfonamidas estudiada en el Capítulo 8. Para reducir el tiempo de cálculo, se adoptaron algunas restricciones (ya comentadas en el Capítulo 8), como el establecimiento de valores máximos de tiempo de análisis, presión total y longitud de la combinación de columnas. Se propone un algoritmo para

modelizar la posición y el perfil de los picos cromatográficos con errores bajos, a fin de aumentar la fiabilidad de las predicciones en el proceso de optimización. La selección de las condiciones de separación se realizó con la ayuda de gráficos de Pareto (tiempo de análisis *versus* resolución medida como pureza de pico).

9.3. Parte experimental

Como se ha comentado, las investigaciones recogidas en este capítulo se realizaron con el mismo conjunto de sulfonamidas utilizado en los estudios del Capítulo 8.

El comportamiento de cada columna cromatográfica (tiempos de retención y semi-anchuras) se modelizó utilizando los datos obtenidos a partir de experiencias isocráticas, con fases móviles que contenían diferentes concentraciones (10, 13, 15, 17 y 20%) de acetonitrilo de calidad HPLC (Scharlab, Barcelona), y dihidrógenofosfato sódico anhidro 0.01 M de Sigma (Roedermark, Alemania). El pH se ajustó a 3.5 por adición de HCl 0.01 M y 0.01 M de NaOH de Scharlab.

Para construir las columnas acopladas en serie, se hizo uso de varias columnas ACE de acero inoxidable de diferentes longitudes, 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula, así como de conectores de columna de material PEEK (Aberdeen, Escocia, Reino Unido). Las columnas utilizadas fueron (se indican las propiedades de la fase estacionaria y longitudes de las columnas disponibles en nuestro laboratorio): ACE C₁₈ (separación basada en interacciones hidrofóbicas, dos de 2 cm y una de 5 cm), ACE C₁₈-HL (mayor retención en comparación con la ACE C₁₈, una de 2 cm y

una de 3 cm), ACE AQ (fase enlazada con funcionalidad polar integral, una de 2 cm y una de 5 cm), ACE CN (fase ciano que incrementa la retención para los compuestos polares, una de 3.5 cm y una 7.5 cm), y ACE Fenilo (fase fenilo con hidrofobicidad intermedia entre las C₄ y C₈, que ofrece una selectividad alternativa para los compuestos aromáticos, aminas y compuestos polares, una de 2 cm y una de 5 cm).

Las columnas se protegieron con una pre-columna Nucleosil C₁₈ de 3 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, y partículas de sílice de 5 μm) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.). Los compuestos de prueba se inyectaron siempre tras la pre-columna para medir exclusivamente el comportamiento cromatográfico de las combinaciones de columnas.

Se utilizó la misma instrumentación que en el Capítulo 8.

9.4. Base teórica

9.4.1. Columnas de referencia

El método de optimización que se propone aquí se basa en la modelización de los cambios de los parámetros cromatográficos (tiempo de retención y semi-anchuras), empleando un conjunto limitado de datos experimentales obtenidos para cada fase estacionaria. La predicción de la retención y del perfil de los picos para cada soluto eluido en el sistema de columnas acopladas en serie, de longitud total L , requiere la medida previa de estos parámetros para una columna de longitud l_r , para cada una de las fases estacionarias seleccionadas para construir la combinación de columnas. Se llamará a estas columnas "columnas de referencia". La longitud de una columna de referencia debe ser, preferiblemente, la mayor disponible en el laboratorio para cada tipo de fase

estacionaria, para poder alcanzar la mayor exactitud posible en las medidas. La columna de referencia puede estar constituida por un único segmento o por una combinación de varios segmentos que contengan la misma fase estacionaria.

9.4.2. Predicción de la retención para las columnas acopladas en serie

El tiempo de retención para un soluto j eluido utilizando columnas acopladas en serie ($t_{Rc,j}$) es una combinación lineal de la contribución extra-columnar (t_{ext}) y de los tiempos de retención para cada columna ($t_{R,ij}$). Expresando la retención en función del factor de retención en cada columna, se obtiene la siguiente ecuación:

$$t_{Rc,j} = t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{R,ij} = t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i} (1 + k_{ij}) =$$

$$t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i} k_{ij} = t_0 + \sum_{i=1}^n t_{0int,i} k_{ij} \quad (9.1)$$

donde i es el índice de la columna y n el número total de columnas combinadas, $t_{0int,i}$ es el tiempo muerto en el interior de cada columna, t_0 el tiempo muerto para el conjunto total de columnas, y k_{ij} el factor de retención del soluto j en el segmento i , que se calcula de acuerdo a:

$$k_{ij} = \frac{t_{R,ij} - t_{0exp,i}}{t_{0exp,i} - t_{ext}} \quad (9.2)$$

En este marco, el tiempo muerto experimental sería:

$$t_{0exp,i} = t_{ext} + t_{0int,i} \quad (9.3)$$

donde $t_{0\text{int},i}$ representa la fracción del tiempo muerto asociado exclusivamente a la columna de longitud l_i .

En ausencia de volúmenes muertos adicionales entre las columnas acopladas, se esperaría que el factor de retención fuera el mismo para columnas de la misma naturaleza que utilicen la misma composición de fase móvil, independientemente de su longitud. Por otro lado, el volumen muerto intra-columnar (una vez sustraídas las contribuciones extra-columnares) se incrementaría linealmente con la longitud de las columnas (naturalmente, siempre que su diámetro, características del soporte y la fase estacionaria fueran las mismas). Por lo tanto, no hay necesidad de medir el tiempo muerto para columnas de diferentes longitudes. Esta información puede obtenerse del tiempo muerto experimental para la columna de referencia. De la Ecuación (9.3), se obtiene:

$$t_{0\text{exp}i} = t_{\text{ext}} + (t_{0\text{exp},r} - t_{\text{ext}}) \frac{l_i}{l_r} \quad (9.4)$$

donde $t_{0\text{exp},r}$ y l_r son el tiempo muerto experimental y la longitud de la columna de referencia, respectivamente.

Debe tenerse en cuenta que la Ecuación (9.1) aísla la contribución de cada columna a la retención a través de cada término $t_{0\text{int},i}$ y k_{ij} . Este planteamiento es una característica interesante para el seguimiento de los cambios en el perfil de los picos (véase la siguiente sección). Cabe comentar que, en elución isocrática con sistemas diseñados adecuadamente, donde los volúmenes muertos asociados a las conexiones entre las columnas son despreciables (como es el caso de las columnas unidas con los conectores ZDV) [16], el orden de las columnas en el acoplamiento no introduce diferencias

significativas. Por lo tanto, los segmentos que contienen la misma fase estacionaria pueden acoplarse o no de forma consecutiva.

9.4.3. Modelización de la retención en función de la composición de la fase móvil

Se adoptó la relación cuadrática para modelizar la dependencia de la retención con la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil (φ). Para un soluto j :

$$\ln k_{ij}(\varphi) = c_{0,ij} + c_{1,ij} \varphi + c_{2,ij} \varphi^2 \quad (9.5)$$

donde $c_{0,ij}$, $c_{1,ij}$ y $c_{2,ij}$ son parámetros de ajuste, específicos para cada fase estacionaria i .

El tiempo muerto para una columna i no depende tan sólo de la longitud de la columna, sino también ligeramente de la composición de la fase móvil, entre otras razones, debido a las interacciones residuales del marcador de tiempo muerto con la fase estacionaria y a cambios en la viscosidad de la fase móvil. De las Ecuaciones (9.3) a (9.5), se obtiene:

$$t_{0\text{exp}j}(\varphi, l_i) = t_{\text{ext}} + t_{0\text{int}j}(\varphi, l_i) = t_{\text{ext}} + \left(d_{0,i} + d_{1,i} \varphi + d_{2,i} \varphi^2 \right) \frac{l_i}{l_r} \quad (9.6)$$

donde $d_{0,i}$, $d_{1,i}$ y $d_{2,i}$ son los parámetros de ajuste para el modelo que describe la retención del marcador de tiempo muerto en la columna de referencia.

9.4.4. Predicción del perfil de pico para columnas acopladas en serie

Tal como se ha indicado en capítulos anteriores, cuando se utiliza elución isocrática, las semi-anchuras pueden predecirse fácilmente con buena exactitud, utilizando los siguientes modelos globales [26,27]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (9.7)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (9.8)$$

En muchas situaciones, los modelos globales se pueden obtener utilizando datos cromatográficos experimentales (t_R , A , B) de cada soluto en la mezcla considerado individualmente, o con los datos del conjunto de solutos (como hemos hecho en este trabajo), eluidos a varias composiciones de la fase móvil. Estos modelos son útiles para predecir las semi-anchuras de los picos a otras composiciones de la fase móvil. Esto es posible siempre y cuando la cinética de reparto no cambie.

Antes de continuar, se debe indicar que para los picos gaussianos ($A = B$), puede utilizarse una ecuación única para modelizar la anchura del pico, similar a las Ecuaciones (9.7) y (9.8), que se refieren a las semi-anchuras. Cabe también mencionar que se requieren modelos específicos para cada fase estacionaria. Sin embargo, no hay necesidad de desarrollar modelos particulares para cada longitud de columna, ya que las correspondientes semi-anchuras se pueden derivar de los modelos obtenidos para las columnas de referencia.

Si el objetivo es la predicción de las semi-anchuras a un cierto tiempo de retención $t_{R,i}$, para una columna de longitud l_i , el cálculo se realiza en tres etapas:

- (i) La primera etapa consiste en calcular el tiempo de retención equivalente para la columna de referencia, de acuerdo con:

$$t_{R,r} = t_{\text{ext}} + (t_{R,i} - t_{\text{ext}}) \frac{l_r}{l_i} \quad (9.9)$$

- (ii) A continuación, se predicen las semi-anchuras para la columna de referencia (A_r y B_r) al tiempo $t_{R,r}$, con ayuda de las Ecuaciones (9.7) y (9.8), previamente ajustadas con los datos experimentales obtenidos con esa columna.
- (iii) Por último, se obtiene la contribución intra-columnar para las semi-anchuras de los picos de la columna i . Así, para la semi-anchura izquierda:

$$A_{\text{int},i} = A_{\text{int},r} \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (9.10)$$

donde:

$$A_{\text{int},r} = (A_r^2 - A_{\text{ext}}^2)^{1/2} \quad (9.11)$$

y de forma similar para la semi-anchura derecha, B .

Debe tenerse en cuenta que la corrección de la longitud en la Ecuación (9.10) sólo afecta a la contribución intra-columnar. Así, las Ecuaciones (9.7) y (9.8) pueden referirse directamente a la semi-anchura intra-columnar para la columna de referencia (Ecuación (9.11)), lo que simplifica el proceso de predicción. Cuando el objetivo es el conocimiento del efecto de la composición de la fase móvil sobre el perfil de los picos, el tiempo de retención al que se predicen las semi-anchuras (a través de las Ecuaciones (9.7)

y (9.8), y subsiguientes ecuaciones) se obtiene de la Ecuación (9.5) (o similar) y de la Ecuación (9.2).

Para picos gaussianos, puesto que los procesos que originan el ensanchamiento de los picos en una combinación de columnas son independientes, la anchura total puede calcularse considerando la aditividad de las varianzas. Para picos no gaussianos, esta propiedad no es estrictamente válida. Sin embargo, como se demostrará en este trabajo, la aditividad de las varianzas puede ser utilizada para obtener valores aproximados de los perfiles de pico (anchuras y asimetrías). Por lo tanto, las anchuras de los picos para una combinación de columnas se puede estimar como:

$$w_c^2 = (A + B)_c^2 = (A_{\text{ext}} + B_{\text{ext}})^2 + \sum_{i=1}^n (A_{\text{int},i} + B_{\text{int},i})^2 \quad (9.12)$$

donde A_{ext} y B_{ext} , y $A_{\text{int},i}$ y $B_{\text{int},i}$, son las contribuciones extra- e intra-columnares para las semi-anchuras, respectivamente.

También se puede predecir de forma satisfactoria la asimetría de los picos al 10% de su altura ($f_{0.1}$), para la combinación de columnas $(B/A)_c$, utilizando la siguiente aproximación:

$$f_{0.1} = \left(\frac{B_c^2}{A_c^2} \right)^{1/2} = \left(\frac{B_{\text{ext}}^2 + \sum_{i=1}^n B_{\text{int},i}^2}{A_{\text{ext}}^2 + \sum_{i=1}^n A_{\text{int},i}^2} \right)^{1/2} \quad (9.13)$$

Los picos en los cromatogramas predichos para las columnas individuales y las combinaciones de columnas se simularon a partir de los parámetros de pico predichos (t_R , A y B), utilizando el modelo gaussiano modificado lineal híbrido con decaimientos exponenciales [28,29]. La resolución de los picos se evaluó

midiendo la pureza de pico [30,31]. Puesto que esta medida de la resolución ofrece valores normalizados, la resolución global (pureza de pico global) se obtuvo como el producto de las purezas de pico para el conjunto de compuestos.

9.4.5. Problemas prácticos en la implementación de métodos de columnas acopladas en serie

La magnitud de los cálculos y los requerimientos informáticos para optimizar columnas acopladas en serie, especialmente cuando se considera también la composición de la fase móvil, requiere resolver algunos problemas prácticos para poder implementar el método. En primer lugar, debe señalarse que las columnas se comercializan con longitudes predefinidas. Por lo tanto, el analista no puede fijar la longitud de las columnas combinadas a cualquier valor arbitrario. Esta limitación contrasta con los niveles de contenido del modificador en una fase móvil que pueden ajustarse a cualquier valor, puesto que es un factor continuo.

En el estudio que se presenta, se consideraron inicialmente incrementos de 1 cm de longitud para las columnas, mientras que el contenido de acetonitrilo se inspeccionó en incrementos de 0.1% v/v. El software desarrollado en nuestro laboratorio fue diseñado cuidadosamente para realizar un cálculo rápido y conseguir ahorro de memoria. Sin embargo, incluso cuando se trabaja con un pequeño número de fases estacionarias, el número de condiciones que deben examinarse fácilmente excede un millón, lo que sobrecarga la memoria RAM. Por lo tanto, se establecieron tres restricciones para asegurar que sólo las soluciones factibles se procesaran: los tiempos de análisis, la presión total y la longitud de la combinación de columnas no pueden superar unos

determinados valores (e.g., 50 min, 275 bares y 15 cm, respectivamente). El usuario puede, por supuesto, cambiar las restricciones y evaluar cada vez el volumen de cálculo; una vez aceptadas, sólo se procesan las soluciones que cumplen las restricciones impuestas.

Un segundo problema es la dimensionalidad del espacio de búsqueda, que hace inviable una representación convencional de los resultados como mapas de resolución. En este sentido, el uso de gráficos de Pareto con dos respuestas objetivo (máxima pureza de pico y mínimo tiempo de análisis) es una buena opción que permite clasificar la calidad de las soluciones. Las soluciones representadas en un gráfico de Pareto definen el llamado "frente de Pareto", que reúne las condiciones experimentales que cumplen la definición de optimalidad de Pareto: "una solución se considera óptima cuando no se puede mejorar una de las respuestas sin empeorar otra" (en nuestro caso, aumentar la resolución sin aumentar el tiempo de análisis). Con ayuda de este gráfico, el cromatografista puede seleccionar la solución de compromiso que mejor se adapte a sus expectativas. Los gráficos de Pareto incluidos en la Sección 9.5 muestran exclusivamente los puntos que definen los frentes. En nuestro estudio, para acelerar el proceso de cálculo, la población de condiciones experimentales se recortó previamente de acuerdo a las restricciones descritas anteriormente. Para encontrar el frente de Pareto, sólo se procesaron las soluciones que sobrevivieron a las restricciones.

9.5. Resultados y discusión

En la Sección 9.4, se describen las herramientas de modelización y optimización (algunas de ellas diseñadas para este trabajo) utilizadas en la separación del conjunto de 15 sulfonamidas. En el método desarrollado, se tuvieron en cuenta tanto la anchura y la asimetría de los picos, como la resolución y el tiempo de análisis. La información experimental necesaria para predecir el rendimiento cromatográfico se obtuvo en el intervalo del 10 al 20% v/v de acetonitrilo, para las cinco fases estacionarias seleccionadas (las longitudes de las columnas de referencia se indican entre paréntesis): ACE C₁₈ (9 cm), ACE C₁₈-HL (3 cm), ACE AQ (5 cm), ACE CN (11 cm) y ACE Fenilo (5 cm).

9.5.1. Optimización de la composición de la fase móvil para las columnas utilizadas individualmente

La separación del conjunto de sulfonamidas se llevó a cabo, en primer lugar, considerando la estrategia convencional que hace uso de una única columna, en el intervalo de composiciones de fase móvil 10–20% de acetonitrilo. Se realizó este estudio con las cinco fases estacionarias disponibles en nuestro laboratorio. El rendimiento de la separación se puede visualizar en la Figura 9.1a, a través de la representación de los gráficos de Pareto, donde se muestra el mejor compromiso entre la resolución global (medida como pureza de pico) y el tiempo de análisis, para columnas de diversa longitud.

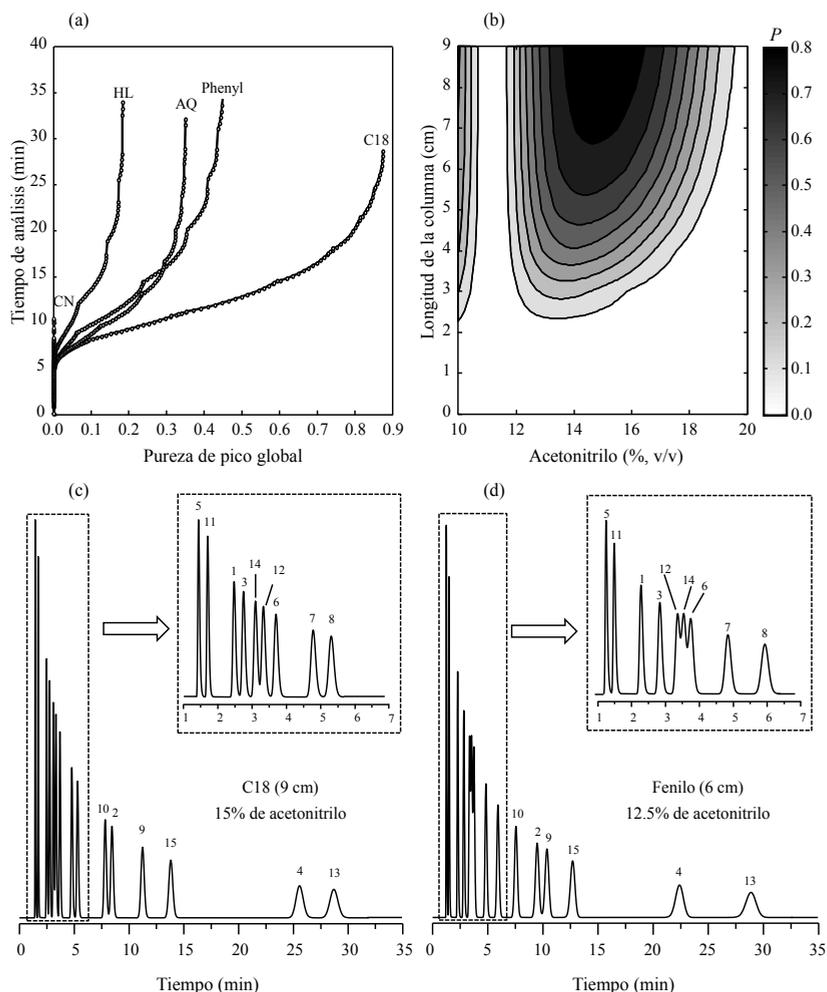


Figura 9.1. Optimización de la composición de la fase móvil para la estrategia convencional que hace uso de una única columna: (a) Gráficos de Pareto para cinco columnas ACE, (b) mapa de contorno de resolución para la columna ACE C₁₈, y (c) y (d) cromatogramas óptimos para dos columnas ACE. Compuestos: (1) sulfacetamida, (2) sulfacloropiridazina, (3) sulfadiazina, (4) sulfadimetoxina, (5) sulfaguanidina, (6) sulfamerazina, (7) sulfametazina, (8) sulfametizol, (9) sulfametoxazol, (10) sulfamonometoxina, (11) sulfanilamida, (12) sulfapiridina, (13) sulfaquinoxalina, (14) sulfatiazol, y (15) sulfisoxazol.

Las columnas ACE C₁₈ y ACE CN ofrecieron la mejor y peor separación, respectivamente, con un grave solapamiento entre varios picos para la columna ACE CN. La columna ACE C₁₈, que ofrece la mejor separación, no permitió la resolución total de los picos ($P = 0.87$). La resolución máxima para las otras columnas fue: ACE Fenilo ($P = 0.46$), ACE AQ ($P = 0.35$), ACE C₁₈-HL ($P = 0.18$), y ACE CN ($P = 0$).

En la Figura 9.1b, se ha representado el mapa de contorno de resolución para la columna ACE C₁₈ en el intervalo estudiado de composición de la fase móvil y longitudes de las columnas de hasta 9 cm. La resolución máxima se encontró en el intervalo 14–16% de acetonitrilo. La combinación del gráfico de Pareto y el mapa de contorno ofrece un cuadro completo de las posibilidades de la separación. Debe observarse que el gráfico de Pareto no incluye información sobre la composición de la fase móvil, mientras que el mapa de contorno no incorpora de información sobre el tiempo de análisis. Sin embargo, la información ausente puede añadirse a los gráficos, lo que es más sencillo para el mapa de contorno.

Las Figuras 9.1c y d muestran los cromatogramas óptimos para las dos mejores columnas (ACE C₁₈ combinada con 15% de acetonitrilo, y la ACE Fenilo combinada con 12.5% de acetonitrilo). Como se observa, dos o más compuestos permanecen parcialmente solapados (especialmente para la ACE Fenilo), y los tiempos de análisis se hallan cercanos a los 30 min. Se puede observar que el orden de elución es distinto para sulfapiridina y sulfatiazol. También, se observan cambios en el orden de elución para otros compuestos. El orden de elución para todos los compuestos en las columnas ACE AQ y ACE C₁₈-HL fue el mismo que el observado para la columna ACE C₁₈ (con algunos cambios en la distribución de los picos).

El comportamiento de la columna ACE CN se apartó del resto, originando tiempos de retención próximos para varios compuestos (sulfacetamida, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfapiridina, sulfatiazol y sulfametazina).

9.5.2. Optimización de la naturaleza y la longitud de las columnas a una composición de fase móvil pre-seleccionada

En el Capítulo 8, se muestra el uso de combinaciones en serie de columnas de diferente naturaleza y longitud, utilizando una composición de fase móvil pre-seleccionada, para mejorar la resolución y reducir el tiempo de análisis en la separación de la mezcla de 15 sulfonamidas [16]. En ese enfoque, la composición de la fase móvil se puede seleccionar en base a la experiencia previa del analista, pero por lo general se elige una fase móvil que permita la resolución de los compuestos menos retenidos y que ofrezca tiempos de análisis no excesivos. En ese capítulo, la separación se llevó a cabo utilizando un 10% de acetonitrilo, y aplicando las restricciones indicadas en la Sección 9.4.5 para el tiempo de análisis, la presión y la longitud de las columnas combinadas. Se alcanzó una resolución casi total ($P = 0.991$) para la combinación: ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (5 cm), con un tiempo de análisis de 27 min. Sin embargo, cuando se ensayó una fase móvil más rápida (conteniendo 17% de acetonitrilo), con la siguiente combinación de columnas: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈ HL (1 cm) + ACE AQ (2 cm), se obtuvo una resolución similar ($P = 0.987$), pero asociada a un tiempo de análisis más bajo (19 min) Ambas combinaciones se seleccionaron teniendo en cuenta exclusivamente la resolución.

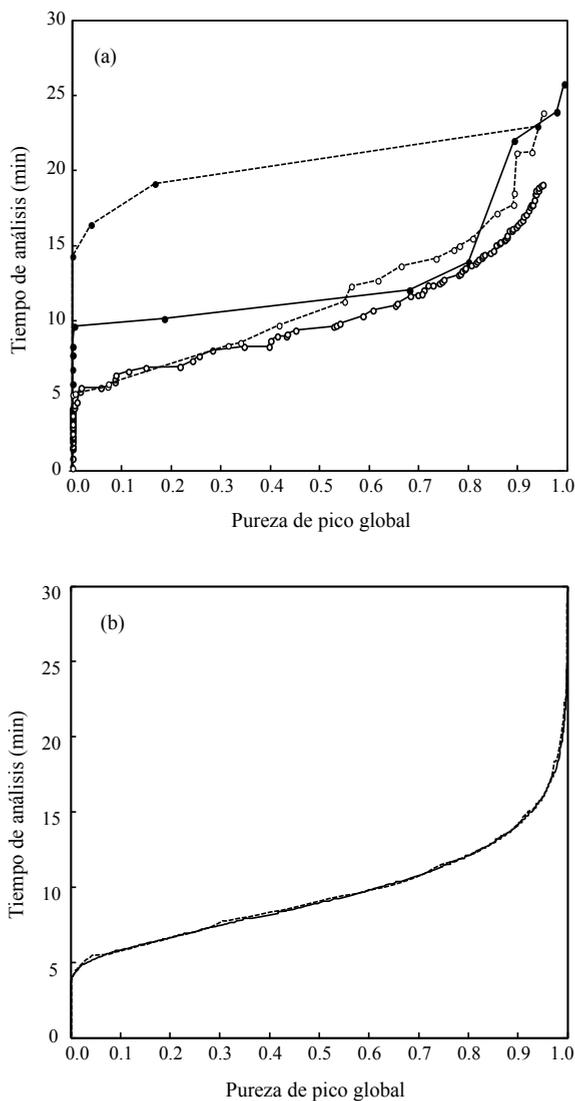


Figura 9.2. Gráficos de Pareto correspondientes a: (a) Optimización de las columnas acopladas en serie utilizando una fase móvil pre-seleccionada del 10% (●) y 20% de acetonitrilo (○), y (b) optimización simultánea de la composición de la fase móvil, junto a la naturaleza y la longitud de las columnas (exploración exhaustiva). Se consideraron incrementos de longitud de 1 cm (—), o sólo las longitudes de las columnas disponibles en nuestro laboratorio (- - -).

A partir de estos resultados, es evidente que la composición de la fase móvil pre-seleccionada es un parámetro importante que debe tenerse en cuenta. Por lo tanto, se decidió examinar el comportamiento de las columnas ACE acopladas en serie utilizando varias composiciones de la fase móvil en incrementos de un 1%, en el intervalo 10–20% de acetonitrilo.

En la Figura 9.2a, aparecen los gráficos de Pareto para un 10 y 20% de acetonitrilo (los extremos del intervalo de composición estudiado). Los puntos sobre los gráficos se han obtenido para diferentes combinaciones de fases estacionarias y longitudes de columnas. Cada punto conectado por líneas continuas corresponde a una optimización que considera incrementos en la longitud de las columnas de 1 cm (que llamaremos "exploración exhaustiva de longitudes"), y los conectados por líneas a trazos corresponden a las longitudes obtenidas mediante la combinación de las columnas disponibles en nuestro laboratorio ("exploración de las longitudes disponibles"). En ambos casos, se consideraron las mismas fases estacionarias. En esta sección, se analiza tan sólo el escaneo exhaustivo de longitudes. La exploración de las longitudes disponibles se comentará en la Sección 9.5.5.

El mayor número de puntos en la Figura 9.1a con respecto a la Figura 9.2a puede explicarse por el mayor número de condiciones que cumplen las restricciones adoptadas. Debe recordarse que el contenido de disolvente en la Figura 9.1a se inspeccionó considerando incrementos de 0.1%. Mientras tanto, en la Figura 9.2a sólo se escaneó la naturaleza y la longitud de las columnas, por lo que el frente de Pareto se halla menos poblado (la composición del disolvente orgánico se mantuvo fija). Así, el número de puntos es mayor para la situación en la que se utilizan columnas en incrementos de 1 cm, con

respecto a la optimización que considera sólo las longitudes disponibles en nuestro laboratorio.

Las líneas en la Figura 9.2a indican que un 10% de acetonitrilo proporciona mejor resolución que un 20% de acetonitrilo (la pureza de pico máxima alcanzó un valor de $P \approx 1$ y 0.95, respectivamente), aunque a costa de tiempos de análisis mayores (como se ha comentado, ésta es la razón del menor número de puntos para el 10% de acetonitrilo: un menor número de combinaciones cumple la restricción establecida de un tiempo máximo de 50 min). Sin embargo, composiciones de fase móvil intermedias mejoran la resolución, como se verá a continuación.

La combinación de sólo dos columnas, ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (4 cm), seleccionada a partir del gráfico de Pareto, ofreció buenos resultados utilizando un 10% de acetonitrilo (con un buen equilibrio entre la resolución y el tiempo de análisis, $P = 0.971$ y 25 min, Figura 9.3a). Para un 20% de acetonitrilo se seleccionó una combinación bastante más compleja: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (4 cm) + ACE CN (3 cm) + ACE C₁₈ HL (1 cm) + ACE C₁₈ AQ (2 cm) ($P = 0.933$ y tiempo de análisis próximo a 20 min, Figura 9.3b). Es interesante observar que con un 10% de acetonitrilo deben utilizarse columnas cortas y fases estacionarias con retención intrínsecamente baja, lo que excluye el uso de la columna que ofrece la mayor resolución en la separación de la mezcla de las 15 sulfonamidas (ACE C₁₈).

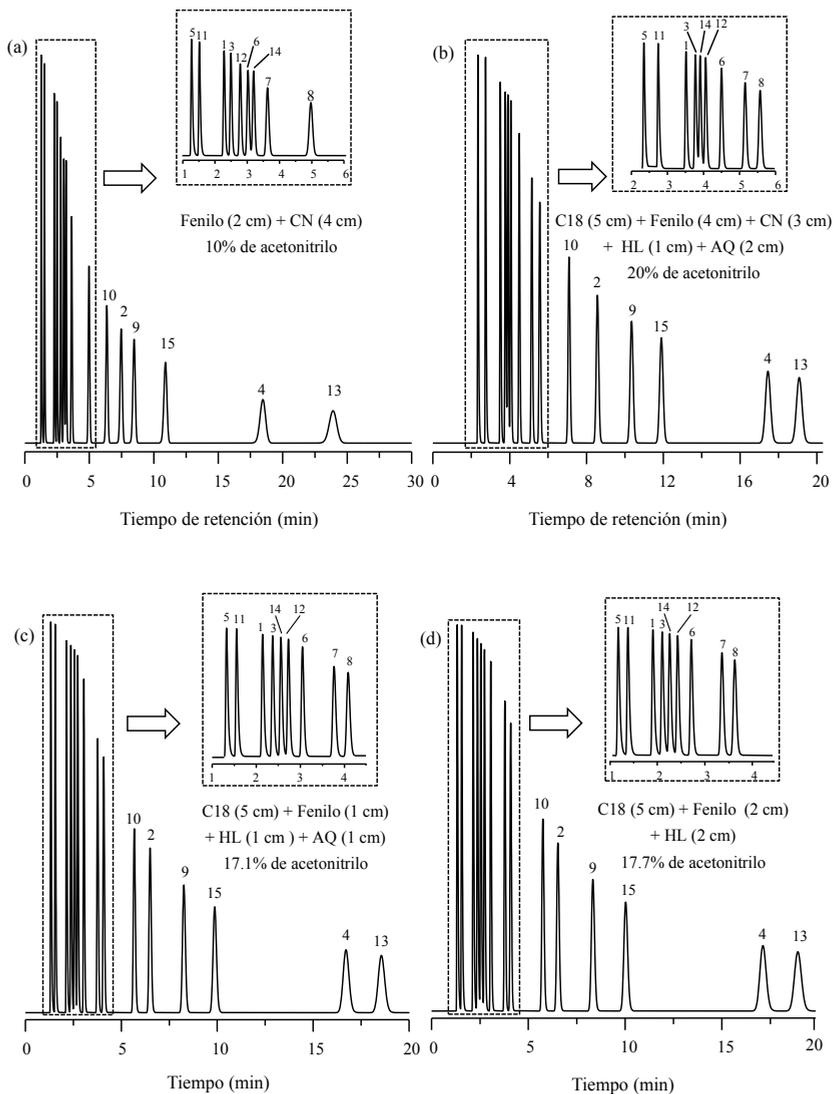


Figura 9.3. Cromatogramas para las combinaciones óptimas de columnas ACE, utilizando una composición de fase móvil pre-seleccionada (a,b), y optimización simultánea de la composición de la fase móvil, y de la naturaleza y la longitud de las columnas (c,d). En (a)–(c), se consideraron incrementos de 1 cm en la longitud de las columnas, y en (d), sólo las longitudes disponibles en el laboratorio. Para la identificación de los picos, véase la Figura 9.1.

9.5.3. Optimización simultánea de la composición de la fase móvil, y de la naturaleza y la longitud de las columnas

La adición de un segundo factor en el desarrollo del método aumenta las posibilidades de éxito de las separaciones cromatográficas. Como se ha comentado en la sección anterior, la composición de la fase móvil a la que la naturaleza y la longitud de las columnas se optimizan tiene una influencia decisiva sobre la calidad de los resultados. Por lo tanto, es posible que la fase móvil pre-seleccionada no sea la mejor en términos de resolución y tiempo de análisis. Por ello, es conveniente optimizar simultáneamente los tres factores: la composición de la fase móvil, y la naturaleza y la longitud de las columnas. Un diseño mínimo para la aplicación de este método sólo requiere la realización de dos experiencias a distinta composición de la fase móvil, para cada una de las columnas, aunque es conveniente disponer de algunas experiencias adicionales para aumentar los grados de libertad.

La línea continua en la Figura 9.2b muestra el frente de Pareto (para mayor claridad, no se han dibujado los puntos de las soluciones de Pareto) correspondiente a la optimización de la resolución y el tiempo de análisis, considerando las combinaciones posibles de las cinco columnas ACE y acetonitrilo en el intervalo 10–20%, en incrementos de 1 cm para la longitud de las columnas y de 0.1% para el disolvente orgánico. Llamaremos a este estudio "examen exhaustivo". Obsérvese que el trazado de la línea es bastante diferente a la obtenida para un 10% de acetonitrilo en la Figura 9.2a, pero similar a la línea obtenida para un 20% de acetonitrilo (se traslada a tiempos de análisis más bajos). Como se verá a continuación, las columnas combinadas para esta composición de fase móvil son próximas a la encontrada como óptima en la exploración exhaustiva. Otra diferencia entre los frentes de Pareto

para la exploración exhaustiva (Figura 9.2b) y el método que utiliza una fase móvil pre-seleccionada (Figura 9.2a) es el número de puntos que definen el frente, que se traduce en una curva más suave para la exploración exhaustiva.

Una combinación satisfactoria que logra un buen equilibrio entre la resolución y el tiempo de análisis se muestra en la Figura 9.3c: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (1 cm) + ACE HL (1 cm) + ACE AQ (1 cm) y un 17.1% de acetonitrilo ($P = 0.982$ y tiempo de análisis de aproximadamente 18.5 min). También es posible la resolución total hasta la línea base ($P > 0.999$) con otras combinaciones, pero a costa de mayores tiempos de análisis.

9.5.4. Exactitud de las predicciones

Las Figuras 9.4 y 9.5a ilustran, para la mezcla de 15 sulfonamidas, la exactitud de la predicción de los tiempos de retención, obtenidos mediante la aplicación de las Ecuaciones (9.1) a (9.5). La Figura 9.4 compara cromatogramas predichos y experimentales para una combinación de columnas. La Figura 9.5a muestra la correlación entre los tiempos de retención predichos y experimentales para los picos de la Figura 9.4. Como se observa, la concordancia entre los valores predichos y experimentales es muy satisfactoria (el error relativo medio considerando todos los picos fue del 1.6%).

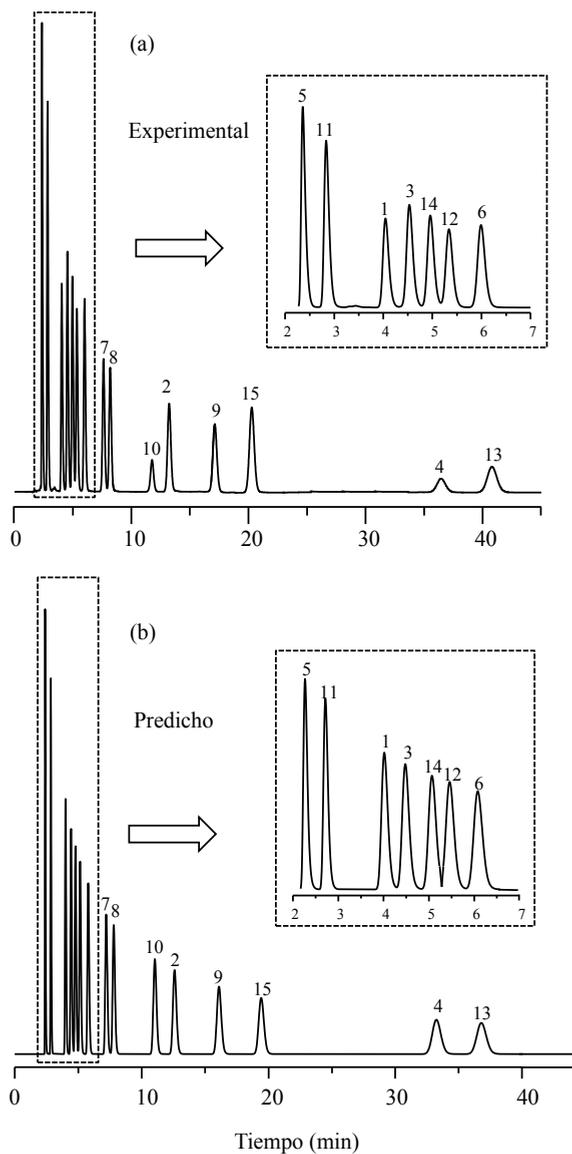


Figura 9.4. Cromatogramas experimental (a) y predicho (b) para una combinación de columnas (7 cm ACE C₁₈ + 3 cm ACE C₁₈ HL + 5 cm ACE AQ y 17.1% de acetonitrilo). Para la identificación de los picos, véase la Figura 9.1.

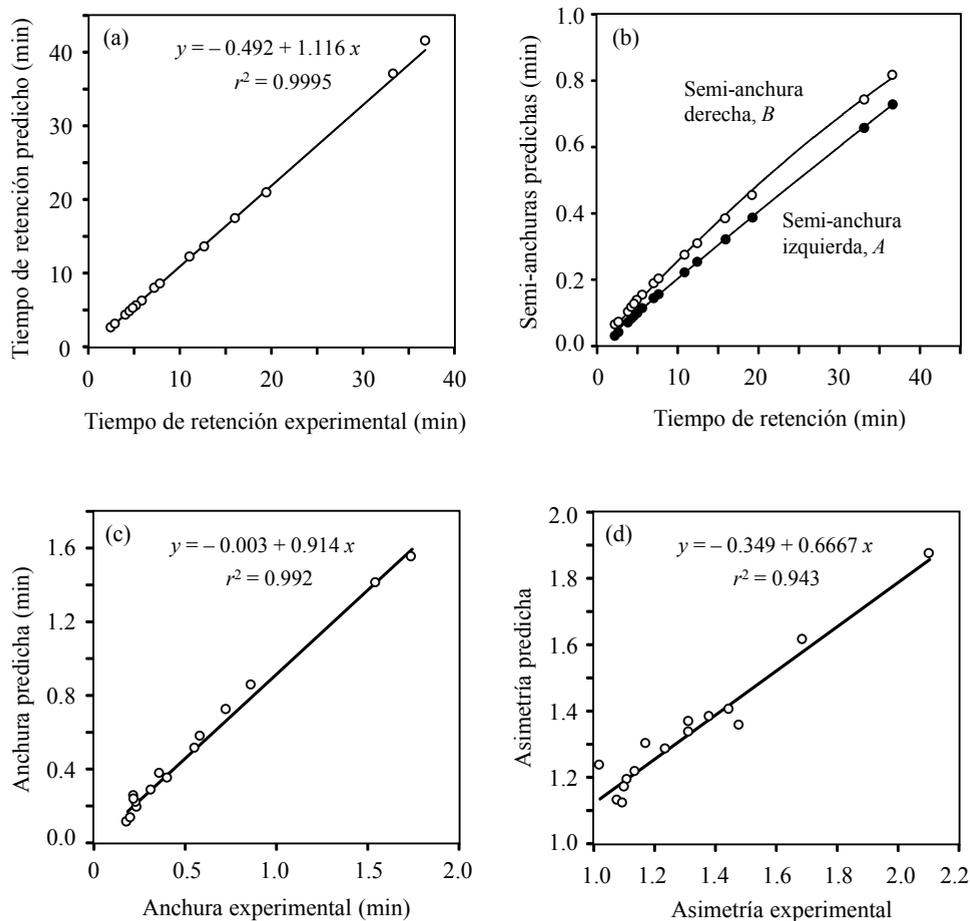


Figura 9.5. Exactitud en la predicción de la retención y semi-anchuras para la combinación ACE C₁₈ (7 cm) + ACE C₁₈ HL (3 cm) + ACE AQ (5 cm), utilizando un 17.1% de acetonitrilo (véase la Figura 9.4): (a) Correlación entre los tiempos de retención predicho y experimental, (b) gráficos de semianchura, (c) correlación entre las anchuras predichas y experimentales, y (d) correlación entre los factores de asimetría predichos y experimentales.

Las herramientas de optimización que se describen en este capítulo también permiten predicciones satisfactorias de los perfiles de los picos (Sección 9.4.4), lo que se traduce en cromatogramas realistas (compárense de nuevo las Figuras 9.4a y b). El diagrama de la Figura 9.5b representa las semi-anchuras predichas frente a los tiempos de retención para el cromatograma de la Figura 9.4b. Los valores de semi-anchura se obtuvieron a partir de los datos experimentales medidos para las columnas de referencia, procesadas de acuerdo a las Ecuaciones (9.7) a (9.13). Como se observa, las tendencias son parabólicas para ambas semi-anchuras. Además, los picos presentan una cola moderada ($B/A = 1.1$ a 2.2). Puesto que los picos menos retenidos presentaron las mayores asimetrías, el principal origen de la asimetría deben ser las contribuciones extra-columnares.

Como se indica en la Sección 9.4.4, la predicción de las semi-anchuras se lleva a cabo suponiendo la aditividad de las varianzas, lo que no es estrictamente válido para los picos no gaussianos. Sin embargo, la predicción de las anchuras (Figura 9.5c) y asimetrías (Figura 9.5d) fue satisfactoria.

9.5.5. Optimización de columnas acopladas en serie empleando un pequeño número de longitudes de columnas

Un problema que puede presentarse en la implementación del método de columnas acopladas en serie es la falta de disponibilidad de columnas con una variedad suficiente de longitudes. En este sentido, el "sistema de columnas POPLink" es una solución interesante diseñada exclusivamente para la optimización de la fase estacionaria. El sistema incluye segmentos de columna de 1, 2, 4 y 8 cm, de manera que al combinarse originan columnas desde 1 a 15 cm de longitud en incrementos de 1 cm. Otros fabricantes comercializan

columnas de acero inoxidable, que se pueden acoplar en serie a través de conectores universales de volumen muerto cero, construidos con material PEEK, que son compatibles con cualquier columna estándar [16]. En este caso, no hay restricciones respecto a la naturaleza de la fase estacionaria: puede utilizarse cualquier fase estacionaria comercializada en una columna convencional. Sin embargo, la disponibilidad de diferentes longitudes es más pobre o el precio es superior.

La falta de columnas de longitudes apropiadas puede afectar a la calidad de los resultados obtenidos con el método que sólo optimiza la naturaleza y la longitud de las columnas, como puede observarse en la Figura 9.2a (líneas a trazos), donde la composición de la fase móvil se fijó al 10 y 20% de acetonitrilo. Obsérvese que utilizando un número limitado de longitudes, las curvas se trasladan hacia arriba, respecto a lo obtenido en el examen exhaustivo de longitudes, y el número de combinaciones de columnas que aparece en el frente de Pareto es menor. Esta situación es más llamativa para el 10% de acetonitrilo.

La Figura 9.2b muestra que cuando la composición de la fase móvil se utiliza como un segundo factor en la optimización, los resultados en términos de resolución y tiempo de análisis obtenidos, cuando sólo se dispone de unas pocas longitudes de columna, están de acuerdo con los encontrados por el método que explora incrementos de 1 cm en las longitudes de las columnas (los gráficos de Pareto son prácticamente idénticos). Esto significa que la inclusión de la composición de la fase móvil, como un segundo factor en el proceso de optimización, compensa la falta de disponibilidad de longitudes de columna. En el caso de estudio, una combinación adecuada que equilibra la resolución y el tiempo máximo de análisis, empleando únicamente las

longitudes de columna disponibles en el laboratorio, fue ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (2 cm) + ACE C₁₈ HL (2 cm), utilizando un 17.7% de acetonitrilo ($P = 0.981$ y tiempo de análisis de 19.1 min, Figura 9.3d). Este resultado debe compararse con el obtenido en la exploración exhaustiva que se muestra en la Figura 9.3c: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (1 cm) + ACE C₁₈ HL (1 cm) + ACE AQ (1 cm) con 17.1% de acetonitrilo ($P = 0.982$ y tiempo de análisis próximo a 18.5 min). Cabe recordar que en nuestro laboratorio no disponíamos de columnas de 1 cm (Sección 9.3). Sin embargo, la solución encontrada con las longitudes disponibles posee una calidad comparable en términos de resolución y tiempo de análisis, y la combinación de columnas se construye con sólo tres tipos de fases estacionarias.

9.6. Conclusiones

La práctica habitual en el desarrollo de un método consiste en seleccionar, en primer lugar, la fase estacionaria mediante ensayos de prueba y error, ya sea sobre la base de las interacciones esperadas, la experiencia previa o recomendaciones de la bibliografía. A continuación, se consideran factores continuos, tales como la composición de la fase móvil, el pH o la temperatura, que son optimizados de manera independiente. Sin embargo, esta estrategia no permite aprovechar la ventaja de considerar los cambios en la naturaleza de la columna, ni los beneficios de la combinación secuencial de columnas de diferentes longitudes. Realmente, la selectividad combinada de varias fases estacionarias acopladas mejora las expectativas de separación, con respecto al de cada columna por separado con fases estacionarias específicas.

En el Capítulo 8, se mostró un método para optimizar sistemas de columnas acopladas en serie manteniendo fija la composición de la fase móvil [16]. Sin

embargo, con ello se perdía el efecto de la composición de la fase móvil sobre el rendimiento de la separación, que es al menos tan importante como el efecto de la fase estacionaria, y se puede ajustar con mucha precisión. En este capítulo, se describe la optimización de la composición de la fase móvil, junto a la naturaleza y la longitud de las columnas, como solución para conseguir un buen equilibrio entre una máxima resolución y un mínimo tiempo de análisis. Se demuestra que el tratamiento de los datos desarrollado para este estudio es capaz de encontrar cromatogramas predichos que prácticamente coinciden con los correspondientes cromatogramas experimentales. La estrategia diseñada está asistida por gráficos de Pareto, que permiten seleccionar (entre las soluciones válidas) las que ofrecen el mejor compromiso entre la resolución y el tiempo de análisis, con tiempos de cálculo razonables.

Un inconveniente del uso de las columnas combinadas empleando una composición de fase móvil pre-seleccionada es la necesidad de disponer de segmentos de columna en una amplia variedad de longitudes. Las investigaciones incluidas en este capítulo demuestran que explorando también la fase móvil, sólo unas pocas longitudes de columna para cada fase estacionaria permiten encontrar una solución alternativa, que es muy competitiva con la obtenida a partir de la exploración exhaustiva de las longitudes de las columnas. En otras palabras, la exploración del contenido de disolvente permite reducir significativamente el número de diferentes longitudes de columna necesarias para desarrollar el método de columnas acopladas en serie, sin pérdida de rendimiento, reduciendo drásticamente el coste de su implementación.

Las longitudes máximas disponibles en nuestro laboratorio para el acoplamiento de columnas de la misma fase estacionaria eran: ACE C₁₈-HL

(5 cm), ACE AQ y ACE Fenilo (7 cm), ACE C₁₈ (9 cm), y ACE CN (11,5 cm). Sin embargo, debe observarse que las longitudes de columna optimizadas nunca alcanzaron estos valores. Por lo tanto, el sistema de optimización selecciona columnas híbridas con segmentos más cortos. De ahí que debamos aconsejar que cuando se adquiriera un conjunto de columnas, es conveniente que las columnas para distintas fases estacionarias sean cortas, y al menos dos posean longitudes múltiplos una de la otra (e.g., 2 y 4 cm).

Otra ventaja del método propuesto es la reducción del número de segmentos que se conectan, lo que evita un aumento indeseable en el volumen muerto del sistema asociado a las conexiones (téngase en cuenta que con el fin de conseguir una longitud determinada, pueden tener que conectarse varios segmentos cortos, incluso en ocasiones varios segmentos de 1 cm). El trabajo experimental adicional para la optimización simultánea de la composición de la fase móvil, y la naturaleza y la longitud de las columnas, se puede reducir a dos experiencias que utilicen diferente contenido de disolvente para cada columna. Esto facilita en gran medida el desarrollo de métodos con el sistema de columnas acopladas en serie.

El método propuesto de acoplamiento de columnas en serie permite ajustar la selectividad con gran precisión, lo que da lugar a un notable incremento en la resolución cromatográfica y a la disminución del tiempo de análisis. Existe una amplia variedad de problemas complejos que no pueden ser resueltos con una única columna y que, sin embargo, pueden abordarse con éxito empleando columnas acopladas en serie utilizando protocolos apropiados. Los resultados obtenidos se acercan a los ofrecidos por la cromatografía líquida bidimensional en términos de resolución y a la elución en gradiente en términos de tiempo de

análisis, teniendo en cuenta que se emplea una instrumentación más simple y accesible a la mayoría de laboratorios.

9.7. Referencias

- [1] H.J. Maier, O.C. Karpathy, *Prediction of separation and specifications of chromatographic columns*, J. Chromatogr. 8 (1962) 308–318.
- [2] G.P. Hildebrand, C.N. Reilley, *Use of combination of columns in gas liquid chromatography*, Anal. Chem. 36 (1964) 47–58.
- [3] J.L. Glajch, J.C. Gluckman, J.G. Charikofsky, J.M. Minor, J.J. Kirkland, *Simultaneous selectivity optimization of mobile and stationary phases in reversed-phased liquid chromatography for isocratic separations of phenylthiohydantoin amino acid derivatives*, J. Chromatogr. 318 (1985) 23–39.
- [4] J.V. Hinshaw, L.S. Etre, *Selectivity tuning of serially connected open-tubular (capillary) columns in gas chromatography. Part I: Fundamental relationships*, Chromatographia 21 (1986) 561–572.
- [5] H.J. Issaq, J. Gutiérrez, *Mixed packings in high performance liquid chromatography. II. Mixed packings vs. mixed ligands*, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 2851–2861.
- [6] F. Garay, *Application of a flow-tunable, serially coupled gas chromatographic capillary column system for the analysis of complex mixtures*, Chromatographia 51 (2000) S108–S120.
- [7] J.H. Wahl, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: Optimization strategies*, J. Chromatogr. 485 (1989) 541–556.
- [8] Y. Mao, P.W. Carr, *Adjusting selectivity in liquid chromatography by the use of the thermally tuned tandem column concept*, Anal. Chem. 72 (2000) 110–118.

-
- [9] J.H. Wahl, C.G. Enke, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: General concept and theory*, Anal. Chem. 62 (1990) 1416–1423.
- [10] J.H. Wahl, C.G. Enke, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: experimental verification and comparison with conventional premixed mobile phases*, Anal. Chem. 63 (1991) 1118–1126.
- [11] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: extension to serially coupled columns*, J. Chromatogr. A 691 (1995) 171–185.
- [12] E. Benická, J. Krupčík, J. Lehotay, P. Sandra, D.W. Armstrong, *Selectivity tuning in an HPLC multicomponent separation*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 28 (2005) 1453–1471.
- [13] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the "PRISMA" principle*, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 122–130.
- [14] B. Sreedhar, A. Seidel-Morgenstern, *Preparative separation of multi-component mixtures using stationary phase gradients*, J. Chromatogr. A 1215 (2008) 133–144.
- [15] M. Zedda, J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil, T.C. Schmidt, *A strategy for the systematic development of a liquid chromatographic mass spectrometric screening method for polymer electrolyte membrane degradation products using isocratic and gradient phase optimized liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8910–8917.
- [16] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Comparison of two serially-coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures*, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 94–105.
- [17] K. Chen, F. Lynen, R. Szucs, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography with conventional columns*, Analyst 138 (2013) 2914–2923.
-

- [18] M. Kühnle, J. Rehbein, K. Holtin, B. Dietrich, M. Gradl, H. Yeman, K. Albert, *Phase optimized liquid chromatography as an instrument for steroid analysis*, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1655–1661.
- [19] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, *Detection of low-abundance impurities in synthetic thyroid hormones by stationary phase optimized liquid chromatography-mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 279–288.
- [20] F.M. Matysik, U. Schummann, W. Engewald, *Isocratic liquid chromatography with segmented columns and simultaneous UV and dual electrochemical detection: application to the selectivity enhancement for the determination of explosives*, Electroanalysis 20 (2007) 98–101.
- [21] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Multiple step gradient analysis in stationary phase optimised selectivity LC for the analysis of complex mixtures*, Chromatographia 69 (2009) 609–614.
- [22] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D.Y. Chen, *Application of phase optimized liquid chromatography to oligopeptide separations*, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 764–767.
- [23] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Stationary-phase optimized selectivity liquid chromatography: Development of a linear gradient prediction algorithm*, Anal. Chem. 82 (2010) 1733–1743.
- [24] D. Cabooter, G. Desmet, *Performance limits and kinetic optimization of parallel and serially connected multi-column systems spanning a wide range of efficiencies for liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1219 (2012) 114–127.
- [25] Bischoff Gmbh, K. Bischoff, S. Nyireddy, Z. Szücs, *Elements for separating substances by distributing between a stationary and a mobile phase, and method for the production of a separating device*, Patent Appl. No. 10 2005 024 154.9 (2005).

-
- [26] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17–24.
- [27] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786–1798.
- [28] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks*, Anal. Chem. 69 (1997) 3822–3831.
- [29] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals: Part II: Peak model and deconvolution algorithms*, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146–155.
- [30] S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187–198.
- [31] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 125–145.

CAPÍTULO 10

**OPTIMIZACIÓN DE LA ELUCIÓN EN GRADIENTE CON
COLUMNAS ACOPLADAS EN SERIE
PARTE I: GRADIENTES LINEALES SIMPLES**

10.1. Summary

A mixture of compounds often cannot be resolved with a single chromatographic column, but the analysis can be successful using columns of different nature, serially combined through zero-dead volume junctions. In previous work, we developed an isocratic approach that optimised simultaneously the mobile phase composition, stationary phase nature and column length. In this work, we take the challenge of implementing optimal linear gradients for serial columns to decrease the analysis time for compounds covering a wide polarity range. For this purpose, five ACE-columns of different selectivity (three C₁₈ columns of different characteristics, a cyano and a phenyl column) were combined, aimed to resolve a mixture of 15 sulphonamides using acetonitrile-water gradients. A gradient predictive system, based on numerical integration, was built to simulate chromatograms under linear gradient profiles. Two approaches were compared: the optimisation of the combination of columns pre-selecting the gradient profile, first developed by De Beer et al., and the optimisation of the gradient program after pre-selecting the column combination using isocratic elution, developed for this work. Several refinements concerning the gradient delays along the solute migration and peak half-width modelling were included to improve the realism of the predictions. Pareto plots (expressed as analysis time *versus* predicted global resolution) assisted in the selection of the best separation conditions. The massive computation time in the optimisation of gradients, of once the column combination was optimised, was reduced to ca. 3 min by using genetic algorithms.

10.2. Introducción

Los avances recientes en la tecnología de columnas han permitido el desarrollo con éxito de sistemas de columnas híbridas, que se construyen acoplando en serie columnas que contienen fases estacionarias distintas. La combinación de mecanismos de separación utilizando columnas conectadas en serie es una opción simple para mejorar la resolución, ya que la selectividad global es generalmente mejor que la alcanzada con cualquier columna (fase estacionaria) aislada. Incluso las separaciones más pobres cuando se emplean columnas aisladas pueden tener éxito si éstas se combinan. El requisito básico para el éxito del método es lograr una correcta unión de las columnas, mediante conectores de volumen muerto cero (ZDV, *zero dead volume*), y la disponibilidad de un sistema robusto y práctico para mantener las columnas unidas.

En 2005, Bischoff Chromatography comercializó un nuevo sistema de columnas acopladas en serie, bajo el nombre comercial de "columnas POPLink" [1]. Ello dio nueva vida a la idea de modular la selectividad mediante la combinación de diferentes fases estacionarias [2,3]. El kit de "columnas POPLink" incluye carcasas de material PEEK que mantiene firmemente unidos segmentos de columnas de acero inoxidable de varias longitudes. En el Capítulo 8, se demostró la posibilidad de utilizar con excelentes resultados, columnas cortas convencionales conectadas a través de conectores ZDV, que se atornillan directamente a las columnas sin necesidad de acopladores externos [4]. Estos conectores permiten el acoplamiento de cualquier columna convencional existente en el mercado o de nueva comercialización. Chen *et al.* también propusieron el montaje de columnas convencionales cortas con tubos de acero inoxidable estándar de 10.5 cm de

longitud y 0.12 mm de diámetro interno [5], con el que obtuvieron resultados más deficientes que con las "columnas POPLink". Por ello, sugirieron utilizar tubos de acero de menor longitud o acopladores de una sola pieza, con el fin de mejorar las predicciones al disminuir el volumen muerto en las conexiones.

El sistema de "columnas POPLink" se desarrolló fijando la composición de la fase móvil y optimizando la combinación de segmentos de columna (su naturaleza y longitud), basándose en el método PRISMA [6]. En los Capítulos 8 y 9, se han propuesto algoritmos fiables alternativos para optimizar columnas acopladas en serie [4,7]. En primer lugar, se mejoraron las predicciones de la resolución cromatográfica mediante la inclusión de un algoritmo para predecir los perfiles de los picos (anchuras y asimetrías), con resultados que coinciden prácticamente con los obtenidos experimentalmente [4] (resultados mostrados en el Capítulo 8). En una segunda contribución (Capítulo 9), se desarrolló un método que optimiza simultáneamente la composición de la fase móvil, junto a la naturaleza y la longitud de las columnas, que es el método más potente en la actualidad para modular finamente la selectividad con columnas acopladas en serie en elución isocrática.

Un inconveniente del método de optimización a una composición fija de la fase móvil es que requiere segmentos de columna de muchas longitudes para lograr una amplia variedad de combinaciones de fases estacionarias, de las que se selecciona la mejor. La inclusión de la composición de la fase móvil como factor a optimizar (que se puede ajustar finamente) reduce el número de longitudes de columna necesarias, sin pérdida de rendimiento. Esto posee consecuencias evidentes en la implementación práctica de las columnas acopladas en serie [7].

No es sorprendente el interés que ha despertado el método que utiliza elución isocrática [3,4,6,7], en vista de sus atractivos resultados cercanos a los obtenidos mediante cromatografía líquida bidimensional en términos de resolución y a la elución en gradiente en términos de tiempo de análisis, y todo ello utilizando una instrumentación más simple y accesible a la mayoría de los laboratorios. El método de optimización para la elución isocrática es también relativamente simple, especialmente si sólo se basa en la predicción de la retención. Sin embargo, las mezclas de compuestos que difieren significativamente en su polaridad requieren un aumento gradual de la fuerza eluyente, con el fin de obtener tiempos de análisis prácticos y una adecuada distribución de los picos a lo largo del espacio de separación. Esto se consigue generalmente a través de la aplicación de gradientes de disolvente orgánico. Por lo tanto, a pesar de la complejidad de la implementación de gradientes con columnas acopladas en serie, varios autores se han interesado en su desarrollo.

Inicialmente se propuso un método que implementaba múltiples etapas isocráticas para el acoplamiento de columnas [8,9]. El método, desarrollado por De Beer *et al.* [9], está inspirado en la optimización de las "columnas POPLink" [6] y se puede resumir como sigue: (i) tras analizar la mezcla de solutos utilizando un gradiente lineal con una columna convencional, los solutos se agrupan de acuerdo a su polaridad; (ii) se desarrollan a continuación optimizaciones independientes fijando la composición de la fase móvil (elución isocrática), seleccionándola del gradiente lineal, para obtener la mejor combinación de columnas para cada grupo de solutos; (iii) entre esas combinaciones, se elige una combinación común para todos los grupos de solutos; (iv) finalmente, se construye un gradiente con etapas multi-isocráticas utilizando la combinación de columnas común y la composición de fase móvil particular para cada grupo de solutos.

Un estudio posterior, también basado en el principio de las "columnas POPLink", propone pre-seleccionar un perfil de gradiente (con segmentos lineales simples o múltiples), restringiendo la optimización a la selección de la mejor combinación de columnas (naturaleza y longitud) [10–12]. Con el fin de mejorar la fiabilidad de las predicciones, una vez realizada la optimización, los autores consideraron una relación lineal entre la desviación estándar de los picos y el tiempo de retención (suponiendo picos cromatográficos gaussianos) [5].

En este capítulo, se pretende ir más allá proponiendo un método sistemático para columnas acopladas en serie, donde se lleva a cabo la optimización de gradientes lineales simples. Se muestra la mejora de las simulaciones en gradiente considerando el perfil de los picos asimétricos a lo largo de la elución a través de las columnas acopladas en serie. Se incluyen varias correcciones que tienen en cuenta los retrasos del gradiente a lo largo de la migración de los solutos, que mejoran en gran medida el realismo de las predicciones. En el Capítulo 11 (Parte II de este estudio), se abordará la aplicación de gradientes lineales múltiples incluyendo etapas isocráticas.

10.3. Parte experimental

Se ha hecho uso de los mismos reactivos y columnas descritas en los Capítulos 8 y 9. La instrumentación es también la misma, excepto que en lugar de utilizar una bomba isocrática, se ha hecho uso de una bomba de gradiente de Agilent (Waldbronn, Alemania).

10.4. Predicción de la elución en gradiente para columnas acopladas en serie

Con el fin de llevar a cabo una optimización racional utilizando elución isocrática o en gradiente con las columnas acopladas en serie, el primer paso a realizar es la modelización del comportamiento de retención para cada compuesto de la muestra, en función del contenido de disolvente (φ , generalmente expresado como porcentaje v/v). También es conveniente disponer de un sistema para pronosticar perfiles de los picos cromatográficos, con el fin de mejorar la fiabilidad de las predicciones. La predicción del tiempo de retención en elución isocrática o en gradiente, para un determinado soluto analizado con una combinación de columnas, se realiza combinando las predicciones obtenidas para cada columna acoplada.

10.4.1. Descripción de la retención

a) Ecuación fundamental para la elución en gradiente

La elución en gradiente es la herramienta que da respuesta al problema de la separación exponencialmente mayor entre los picos de los compuestos, a lo largo de un cromatograma, cuando la mezcla contiene solutos con una amplia variedad de polaridades y se utiliza elución isocrática. La bibliografía recoge varios enfoques para describir la elución en gradiente, generalmente basados en la integración de la siguiente ecuación [13]:

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \quad (10.1)$$

En la Ecuación (10.1), t_g es el tiempo de retención observado al aplicar un gradiente, k el factor de retención instantáneo, $\varphi(t)$ el programa de gradiente y t

el tiempo medido a la entrada de la columna, que se corresponde con la composición del gradiente que afecta al soluto. La variable de interés es t_g , que como se observa, se encuentra en el límite superior de la integral. Para resolver la integral (ya sea analítica o numéricamente), el contenido de disolvente orgánico en función del tiempo debe corresponder a la ubicación del soluto en el interior de la columna. Por esta razón, se debe considerar que, puesto que el soluto se mueve a lo largo de la columna, un gradiente medido a la entrada de la columna requiere un tiempo progresivamente mayor para alcanzar al soluto. Este efecto se tiene en cuenta mediante el uso de $t_g - t_0$ en lugar de t_g en el límite superior de la integral.

b) Integración numérica para columnas acopladas en serie

Sólo es posible la solución analítica de la Ecuación (10.1) en los casos más simples, tales como la elución con una única columna con gradientes lineales cuando la retención de los solutos se describe con modelos lineales [13,14]. El caso de las columnas acopladas en serie es mucho más complejo, haciendo inviable la solución analítica, incluso para el caso más simple que implica sólo dos columnas, un modelo de retención lineal y un gradiente lineal. Debe tenerse en cuenta que el tiempo necesario para cruzar cada columna en el acoplamiento, es decir, su contribución al tiempo de retención total, depende de la composición a la que el soluto ha salido de la(s) columna(s) anterior(es). Además, el modelo de retención y el intervalo de tiempo en el cual el modelo es válido es específico para cada soluto y columna. Por lo tanto, la solución analítica de la Ecuación (10.1) requeriría resolver la integral para cada columna, una vez obtenida la solución para la columna anterior. Por esta razón, no es posible resolver analíticamente la ecuación integral para el conjunto de

columnas en una sola etapa. La situación es aún más compleja cuando se aplican gradientes lineales múltiples.

La integración numérica, que da lugar a algoritmos de predicción discontinuos [15] es, en cualquier caso, una solución más práctica y flexible para la Ecuación (10.1). Se basa en el hecho de que cuando un soluto migra experimentando un gradiente, su movimiento viene determinado por el contenido de disolvente orgánico en el microambiente que rodea a la banda de elución del soluto. Si la banda es inspeccionada en un intervalo de tiempo suficientemente pequeño, la variación en el contenido del disolvente orgánico resulta insignificante, y se puede considerar que el soluto migra en régimen isocrático, al menos durante un corto tiempo. Esto permite dividir la Ecuación (10.1) en una serie de integrales. Para una columna i y soluto j se tiene:

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_1-t_{01}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_1-t_{01}}^{t_2-t_{02}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \dots + \int_{t_{n-1}-t_{0n-1}}^{t_n-t_{0n}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_n-t_{0n}}^{t_{gy}-t_{0i}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \quad (10.2)$$

Cada término del sumatorio está asociado a una etapa isocrática, a lo largo del programa de gradiente ($\varphi(t)$), que se relaciona con la fracción de columna migrada a lo largo del incremento de tiempo cubierto por las integrales. En la Ecuación (10.2), t_1, t_2, \dots, t_n representan los tiempos en los que se ha dividido el tiempo total del gradiente, cuya magnitud se puede fijar atendiendo a la sensibilidad del instrumento para generar gradientes de disolvente orgánico (e.g., 0.1%), o como incrementos de tiempo suficientemente pequeños (e.g., la exactitud que se desea en la predicción de los tiempos de retención, tal como 0.01 min). El tiempo necesario para que el gradiente alcance al soluto en cada sección infinitesimal de la columna, medido desde la entrada de la columna, viene dado por los términos de retraso $t_{01}, t_{02}, \dots, t_{0n}$, que son específicos para cada columna y soluto.

El tiempo de retención en gradiente ($t_{g,j}$) de un soluto j es el tiempo t_n asociado al término para el que la suma en la Ecuación (10.2) coincide con t_{0i} para la columna i . Este tratamiento es válido para cualquier tipo de gradiente (puesto que el dominio de tiempos se divide en subdominios isocráticos), y también para los modelos de retención no integrables.

En la práctica, el programa de gradiente alcanza la entrada de la columna tras un tiempo de retardo asociado a los tubos que conectan la bomba con la columna (t_d), durante el cual la elución es isocrática. Este retardo se ha añadido a la Ecuación (10.2). Además, como se ha comentado, existe otro retardo producido por el tiempo progresivamente mayor que el frente de gradiente necesita para alcanzar el soluto, que debe tenerse en cuenta en los límites de cada término en la integración numérica. Puesto que $k_{ij}(\varphi_n)$ se puede considerar constante en cada etapa (e.g., el valor central en el intervalo), la solución de la integral es la siguiente:

$$t_{0i} \approx \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{t_1 - t_d}{k_{ij}(\varphi_1)} + \frac{t_2 - t_1}{k_{ij}(\varphi_2)} + \dots + \frac{t_{g,j} - t_n}{k_{ij}(\varphi_n)} = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_1)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_2)} + \dots + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_n)} \quad (10.3)$$

donde se ha considerado que en cada término $t_{0n} \approx t_{0n-1}$ (véase también la Ecuación (10.2)); $k_{ij}(\varphi_n)$ es el factor de retención en las proximidades del soluto, asociado a cada término $\varphi(t_n - t_{0n})$.

La Ecuación (10.2) también es válida para la primera columna en el acoplamiento de columnas. Para columnas posteriores:

$$t_{0i} = \int_{t_{p\bar{y}}}^{t_1 - (t_{p\bar{y}} + t_{01})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_1 - (t_{p\bar{y}} + t_{01})}^{t_2 - (t_{p\bar{y}} + t_{02})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \dots + \int_{t_{n-1} - (t_{p\bar{y}} + t_{0n-1})}^{t_n - (t_{p\bar{y}} + t_{0n})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_n - (t_{p\bar{y}} + t_{0n})}^{t_{g,j} - (t_{p\bar{y}} + t_0)} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \quad (10.4)$$

Los tiempos t_1, t_2, \dots, t_n y $t_{01}, t_{02}, \dots, t_{0n}$ tienen el mismo significado que para la primera columna, mientras que $t_{p,ij}$ es el tiempo de gradiente para el soluto j cuando el gradiente alcanza la entrada de la columna considerada, tras cruzar todas las columnas anteriores (una o varias). La función $\varphi(t)$ describe la composición del gradiente a la entrada de la primera columna.

Como se ha comentado en el Capítulo 9, el tiempo muerto de la columna depende de la concentración del disolvente orgánico. Esto implica que, al migrar el soluto, dicha concentración cambia, y en consecuencia, el tiempo muerto debe modificarse también. Teniendo esto en cuenta, para simplificar, se tomó la decisión de hacer coincidir la suma de los términos de las Ecuaciones (10.2) a (10.4) con el valor del tiempo muerto predicho para la composición instantánea cuando el soluto alcanza la salida de la columna.

El tiempo de retención en gradiente para el acoplamiento de columnas es una combinación lineal de los tiempos de retención asociados a cada columna, a lo que se añade las contribuciones extra-columnares:

$$t_{g,j} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^{nc} t_{g,ij} \quad (10.5)$$

Sin embargo, los cálculos anteriores deben llevarse a cabo sin incluir las contribuciones extra-columnares, ya que son una fuente de error. Éstas deben añadirse al final del proceso, una vez que se ha calculado el tiempo de retención asociado al tránsito a través de las columnas.

Para el acoplamiento de columnas en serie utilizando un gradiente, el modelo de retención utilizado en la integración numérica necesita ser controlado y adaptado a la columna en la que el soluto se encuentra en cada momento. Es decir, debe tenerse en cuenta el cambio de columna para llevar a

cabo la integración. Cuando la suma acumulada en las Ecuaciones (10.2) a (10.4) iguala al tiempo muerto de la columna (t_{0i}), el soluto ha alcanzado la salida de esa columna. A partir de este momento, si el soluto entra en una nueva columna, debe adoptarse la función $k_{ij}(\varphi)$ para la nueva columna, y resolverse una nueva ecuación integral utilizando como tiempo de retardo acumulado ($t_{p,ij}$) la suma del tiempo de retardo asociado al instrumento y a la suma de los tiempos muertos para las columnas anteriores. Debido a las distintas velocidades de los solutos, las transiciones entre columna pueden ocurrir a distintos tiempos para cada soluto y, por consiguiente, estar asociados a diferentes fases estacionarias.

Las explicaciones anteriores indican que existen varios tipos de retrasos que deben conocerse para calcular el contenido real de disolvente en la posición del soluto dentro de la columna: (i) el volumen extra-columnar (o instrumental), asociado al tiempo de retardo, (ii) los retrasos generados por el tránsito a través de las columnas anteriores (la suma de los tiempos muertos para esas columnas), y (iii) el volumen intra-columnar (o interno), esto es, el retraso asociado a la distancia migrada por el soluto dentro de la columna donde el soluto está eluyendo a un tiempo determinado. Estos retrasos obligan a corregir el contenido de disolvente orgánico en el término correspondiente de la ecuación integral para cada columna.

10.4.2. Predicción de los perfiles de pico y resolución cromatográfica

Los perfiles de gradiente se pueden predecir mediante la aproximación de Jandera y Churáček [16], que establece que la anchura de un pico cuando se aplica un gradiente coincide con la anchura del pico cuando éste eluye, isocráticamente, a la composición instantánea a la que el soluto alcanza la salida de la columna. De acuerdo a ello, se calculó la anchura de pico mediante:

$$A_{ij} = a_{0i} + a_{1i} t_{Rij} + a_{2i} t_{Rij}^2 \quad (10.6)$$

$$B_{ij} = b_{0i} + b_{1i} t_{Rij} + b_{2i} t_{Rij}^2 \quad (10.7)$$

utilizando el tiempo de retención en gradiente como t_R (A_{ij} y B_{ij} son las semi-anchuras izquierda y derecha de los picos de los solutos i eluidos con una columna j). Por lo tanto, el tratamiento en el modo isocrático para calcular las anchuras de los picos y las asimetrías, para combinaciones de columnas en elución isocrática, se puede adaptar fácilmente a elución en gradiente (véase Capítulo 9). Las contribuciones extra-columnares deben restarse antes de sumar las contribuciones de cada columna, añadiéndose de nuevo al final del proceso.

La resolución de los picos se evaluó midiendo la pureza de pico [15,17]. La resolución global se obtiene considerando todos los compuestos en el cromatograma, como el producto de las purezas de pico para los compuestos individuales.

10.5. Resultados y discusión

10.5.1. Exactitud de las predicciones

La optimización interpretativa de cualquier sistema cromatográfico descansa en la calidad de las predicciones a partir de modelos. En este capítulo y en los Capítulos 8 y 9, se describe la teoría en la que se basa la predicción de la retención y del perfil de los picos, cuando se utilizan columnas acopladas tanto en el modo isocrático como en gradiente. En elución isocrática, la predicción del tiempo de retención es bastante simple, ya que se basa en la combinación lineal de los tiempos de retención y tiempos muertos. La complejidad de las predicciones se incrementa notablemente en elución en gradiente. Por el contrario, la predicción de los perfiles de pico (anchura y asimetría) es similar en ambos modos de elución, una vez conocidos los tiempos de retención.

Todas las medidas básicas para obtener información sobre el rendimiento cromatográfico (retención y perfil de los picos), para las cinco fases estacionarias seleccionadas, se realizaron utilizando columnas con las siguientes longitudes (indicadas entre paréntesis): ACE C₁₈ (9 cm), ACE C₁₈-HL (3 cm), ACE C₁₈-AQ (5 cm), ACE CN (11 cm), y ACE Fenilo (5 cm). En este trabajo, se llevaron a cabo siete experimentos isocráticos por columna para cada soluto en el intervalo de acetonitrilo 5–30%, con el fin de modelizar los tiempos de retención y perfiles de los picos. Los coeficientes de regresión para los modelos de retención ajustados fueron altamente satisfactorios.

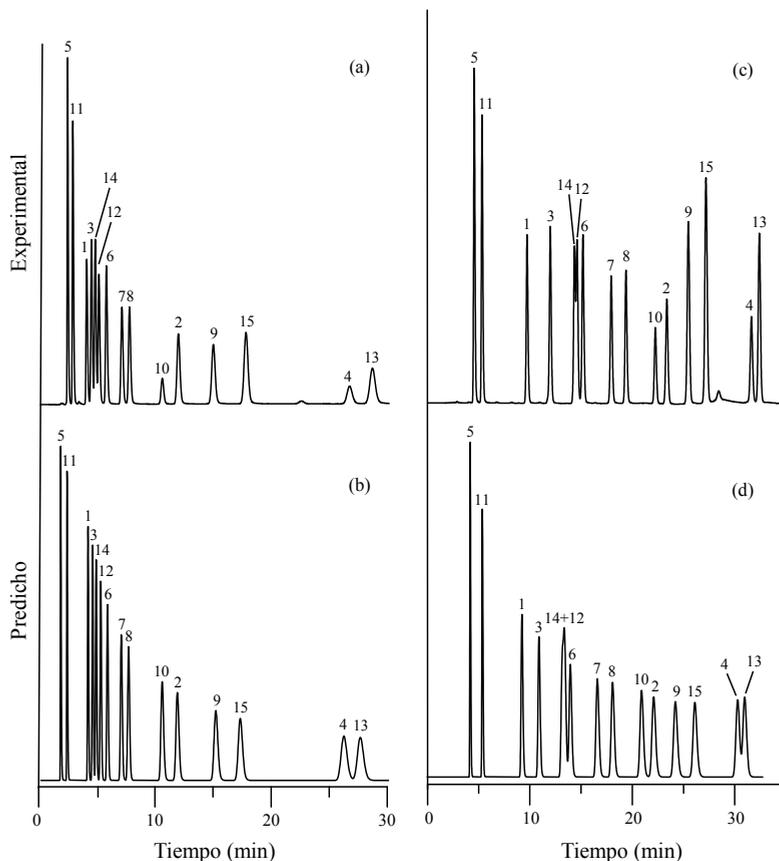


Figura 10.1. Cromatogramas obtenidos con las columnas ACE acopladas en serie, utilizando un gradiente lineal: (a,c) cromatogramas experimentales, y (b,d) cromatogramas predichos. Combinaciones de columnas: (a,b) ACE C₁₈ (7 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (5 cm), y (c,d) ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈ (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (5 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE CN (5 cm). Gradientes: (a,b) 17–21% de acetonitrilo en 30 min, y (c,d) 5–45.5% de acetonitrilo en 50 min. Compuestos: (1) Sufacetamida, (2) sulfacloropiridazina, (3) sulfadiazina, (4) sulfadimetoxina, (5) sulfaguanidina, (6) sulfamerazina, (7) sulfametazina, (8) sulfametizol, (9) sulfametoxazol, (10) sulfamonometoxina, (11) sulfanilamida, (12) sulfapiridina, (13) sulfaquinoxalina, (14) sulfatiazol, y (15) sulfisoxazol.

La Figura 10.1 ilustra la exactitud de las predicciones en gradiente para la mezcla de 15 sulfonamidas separadas con columnas ACE acopladas. Las condiciones de separación seleccionadas ofrecen una buena resolución, pero las condiciones que se muestran no son las óptimas. El intervalo de contenido de disolvente orgánico en el programa de gradiente fue 17–21% y 5–45.5% de acetonitrilo para las Figuras 10.1a,b, y 1c,d, respectivamente. Como se observa, la concordancia entre los cromatogramas experimentales y predichos es muy satisfactoria. El error relativo medio para la predicción de los tiempos de retención fue 2.2 y 3.7%, respectivamente.

En la Figura 10.2, se correlacionan los tiempos de retención predichos y experimentales para las condiciones de separación indicadas (los coeficientes de determinación fueron $r^2 = 0.9995$ y 0.9989 , respectivamente). La alineación perfecta de los puntos en los gráficos de correlación indica que la predicción de la selectividad será altamente fiable, a pesar de los pequeños sesgos encontrados en los tiempos de retención.

Estos resultados deben compararse con un trabajo previo publicado por otros autores, en el que se optimizaban columnas acopladas utilizando un gradiente [11]. En ese trabajo, los autores, con el fin de mejorar la exactitud de las predicciones del tiempo de retención, utilizaron un método de calibración empírico, en el que en base a las desviaciones obtenidas para dos solutos seleccionados, corrigieron los tiempos de retención del cromatograma predicho. En el trabajo que aquí se presenta no se aplicó una corrección de ese tipo.

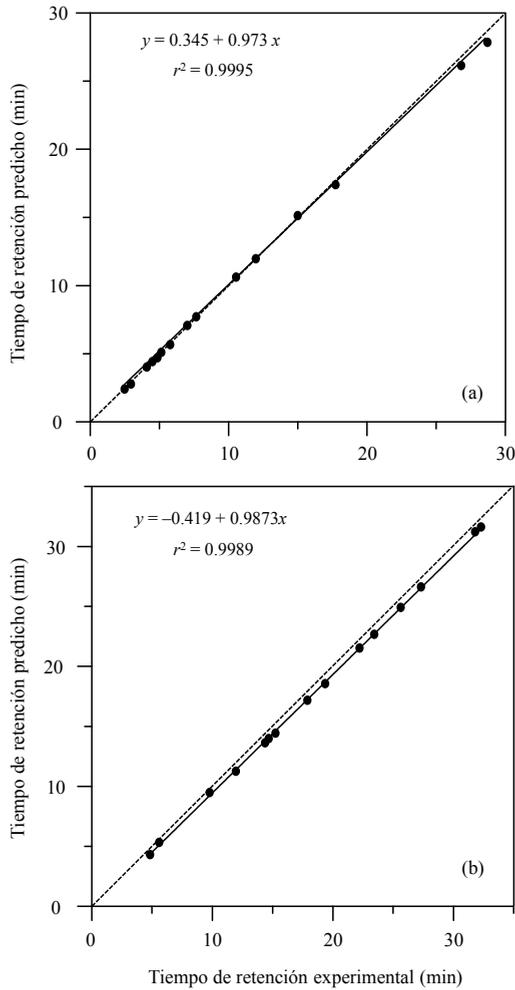


Figura 10.2. Exactitud en la predicción del comportamiento de retención empleando las columnas ACE acopladas en serie, y un gradiente lineal. El gráfico de correlación en (a) corresponde a las Figuras 10.1a,b, y el gráfico de correlación en (b) a las Figuras 10.1c,d.

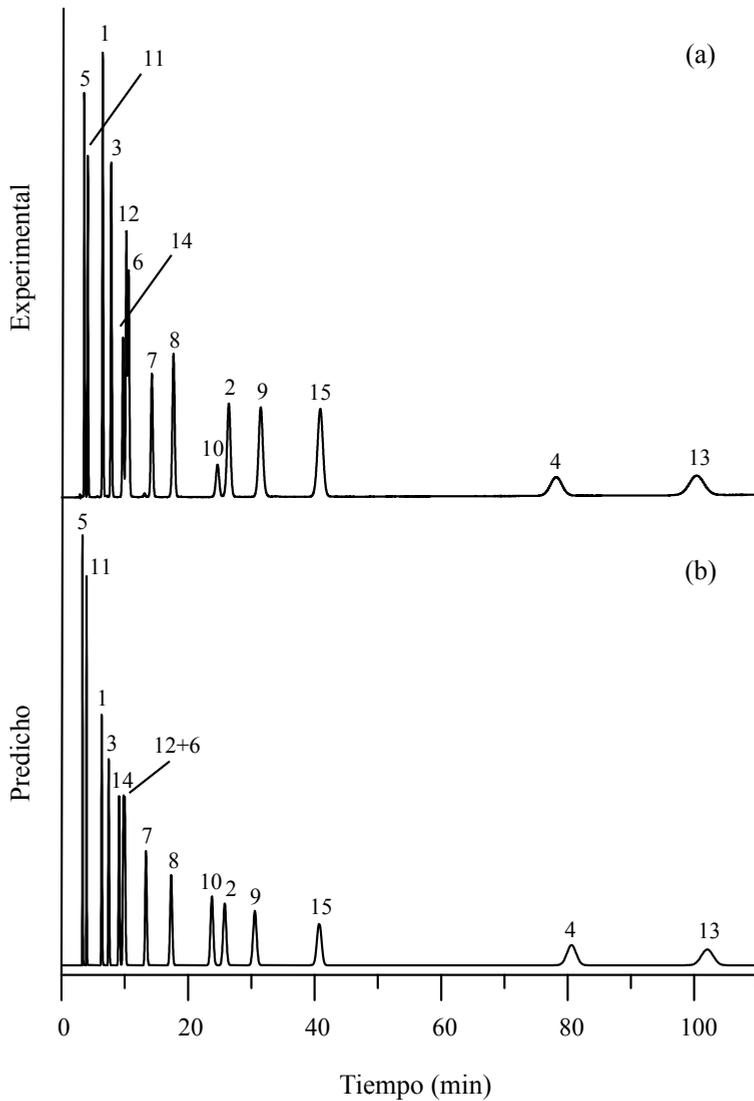


Figura 10.3. Cromatogramas obtenidos con las columnas ACE acopladas en serie, utilizando elución isocrática. (a) Cromatograma experimental, y (b) cromatograma predicho. Combinación de columnas: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (5 cm) + ACE CN (7.5 cm). Composición de la fase móvil: 10% de acetonitrilo. Para la identificación de los solutos, véase la Figura 10.1.

Con motivos comparativos, la Figura 10.3 muestra los cromatogramas experimentales y predichos obtenidos con las columnas ACE acopladas en serie, utilizando condiciones isocráticas. Se observa también una excelente concordancia. Tanto en elución isocrática como en gradiente, la predicción del perfil de los picos es también satisfactoria, lo que se traduce en cromatogramas fiables. Para evaluar los resultados, debe tenerse en cuenta que los picos en los cromatogramas predichos están normalizados, y la predicción de las semi-anchuras de los picos se realizó asumiendo la aditividad de las varianzas, lo que no es estrictamente válido para picos no gaussianos.

A continuación, se comparan dos metodologías diferentes: la optimización de la combinación de columnas acopladas en serie para un gradiente pre-seleccionado (desarrollado por De Beer *et al.* [10]), y la optimización del perfil del gradiente para una combinación de columnas pre-seleccionada (desarrollado en este trabajo).

10.5.2. Pre-selección del gradiente

Siguiendo la idea inicial del sistema POPLink, algunos autores [9–12] han optimizado la combinación de columnas que ofrece un máximo rendimiento, utilizando un perfil de gradiente previamente seleccionado. Nosotros aplicamos, en primer lugar, nuestro sistema predictor a esta estrategia. Sin embargo, en lugar de utilizar el sistema de columnas POPLink, hicimos uso del sistema desarrollado en el Capítulo 8, que acopla columnas convencionales en serie con conectores ZDV. Otra diferencia con el sistema POPLink es que éste permite implementar longitudes de columna muy diversas mediante la unión de segmentos de columna de un cm para cada fase estacionaria, mientras

que nosotros sólo disponíamos en nuestro laboratorio de columnas de unas pocas longitudes.

La implementación del método de optimización a las columnas acopladas en serie, pre-seleccionando el perfil del gradiente y buscando la combinación óptima de columnas, es relativamente simple, pero tiene el inconveniente de que el gradiente seleccionado puede no ser el mejor. Para seleccionar el gradiente, se consideró la composición de disolvente óptima en el modo isocrático, para cada fase estacionaria disponible en nuestro laboratorio (los contenidos óptimos de acetonitrilo se indican entre paréntesis): ACE C₁₈-HL (14.25%), ACE C₁₈ (14.75%), ACE C₁₈-AQ (8.0%), ACE Fenilo (12.5%) y ACE CN (7.25%). Teniendo en cuenta estas composiciones, se seleccionaron dos condiciones de gradiente: un gradiente entre 5 y 17% de acetonitrilo, con un tiempo de gradiente $t_G = 60$ min o 40 min, que garantizaba la elución de todos los solutos antes de alcanzar el valor de t_G . Con el fin de examinar las posibilidades de la estrategia de trabajo, también se utilizó un tercer perfil de gradiente en el intervalo 5–30% de acetonitrilo con $t_G = 60$ min.

Cabe comentar que se llevó a cabo una búsqueda sistemática de las combinaciones de columnas, incluyendo las posibles permutaciones entre ellas. Además, se optimizó tanto la resolución, como el tiempo de análisis. Sin embargo, el planteamiento de objetivos opuestos (máxima resolución y mínimo tiempo de análisis) implica que no existe una única solución al problema, sino una población de soluciones. Esto se puede mostrar con un gráfico de Pareto [18]. Se considera una solución óptima de acuerdo con la definición de Pareto, cuando no se puede mejorar una respuesta sin empeorar otra. Las soluciones de Pareto definen en conjunto el denominado "frente de Pareto", del cual el cromatografista puede hacer su elección entre varias

soluciones. Los gráficos de Pareto que se muestran en este trabajo muestran sólo el frente.

La Figura 10.4 muestra los frentes de Pareto para los tres gradientes pre-seleccionados. Como se observa, la calidad de la separación depende del gradiente. Además, cabe destacar que el número de soluciones en el frente de Pareto (y puntos vecinos) es más bien pequeño. Esto significa que la mayoría de las combinaciones de las columnas no pueden resolver la mezcla de compuestos en un tiempo razonable, con los gradientes ensayados. Se ha señalado en el gráfico algunas soluciones seleccionadas de la Figura 10.4, con $P > 0.95$, y los cromatogramas correspondientes aparecen representados en las Figuras 10.5a–d. Las Figuras 10.5a y d corresponden a la misma combinación de columna óptima.

En los Capítulos 8 y 9, en los que la combinación de columnas acopladas en serie se optimizó en el modo isocrático, se puso de manifiesto que el máximo rendimiento de la separación empleando únicamente las columnas disponibles en nuestro laboratorio dependía de la composición de la fase móvil. Esto también es válido cuando se pre-selecciona el perfil del gradiente: la combinación óptima depende críticamente del programa de gradiente pre-seleccionado.

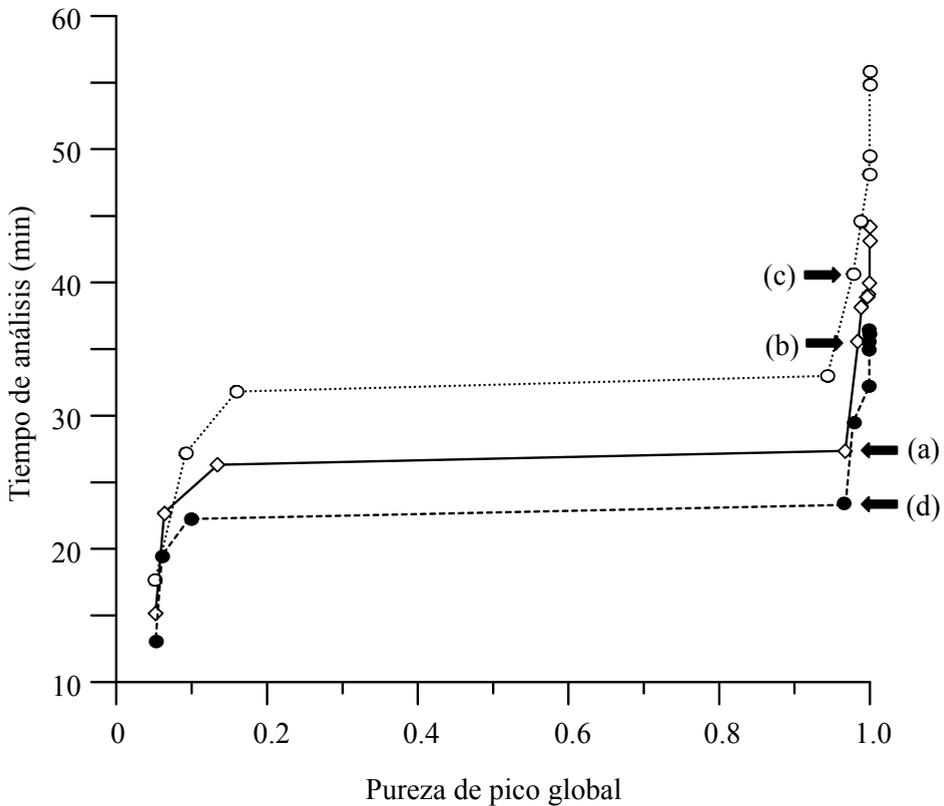


Figura 10.4. Frentes de Pareto para tres perfiles del gradiente distintos, de acuerdo al método de pre-selección del perfil del gradiente: (○) 5–17% de acetonitrilo en 60 min, (◇) 5–17% de acetonitrilo en 40 min, y (●) 5–30% de acetonitrilo en 60 min. Las flechas indican la resolución y el tiempo de análisis para las combinaciones de columnas utilizadas para obtener los cromatogramas de las Figuras 10.5a–d.

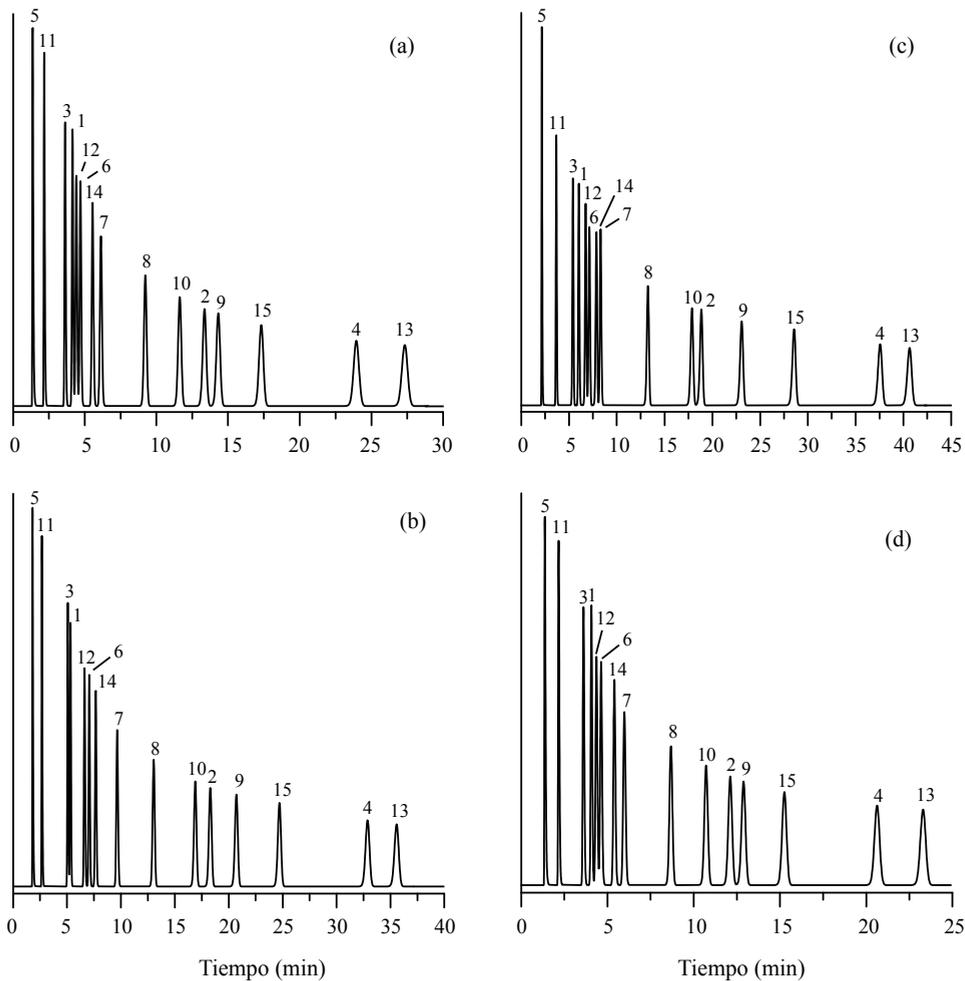


Figura 10.5. Cromatogramas correspondientes a las soluciones óptimas de Pareto señaladas en la Figura 10.4: (a) ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (3.5 cm) y 5–17% de acetonitrilo en 40 min ($P = 0.967$), (b) ACE C₁₈ (2 cm) + ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (3.5 cm) y 5–17% de acetonitrilo en 40 min ($P = 0.985$), (c) ACE C₁₈ (2 cm) + ACE CN (7.5 cm) y 5–17% de acetonitrilo en 60 min ($P = 0.977$), y (d) ACE Fenilo (2 cm) + ACE CN (3.5 cm) y 5–30% de acetonitrilo en 60 min ($P = 0.968$). Para la identificación de los solutos, véase la Figura 10.1.

10.5.3. Pre-selección de la combinación de columnas

En los Capítulos 8 y 9, se ha mostrado que la composición de la fase móvil en el modo isocrático tiene una influencia decisiva en el rendimiento de una optimización centrada exclusivamente en la naturaleza y la longitud de las columnas acopladas. Por lo tanto, para encontrar las mejores condiciones de separación, es conveniente optimizar simultáneamente la composición de la fase móvil, y la naturaleza y la longitud de las columnas. En el Capítulo 9, se demostró además el hecho de que el número de longitudes de columna necesarias para obtener el máximo rendimiento se reduce siguiendo esa estrategia. Siguiendo esta línea de trabajo, se consideró en primer lugar la optimización simultánea del perfil del gradiente, junto con la naturaleza y la longitud de las columnas. Sin embargo, operando de esta forma, el tiempo de cálculo se incrementa hasta un volumen inviable.

Además de la solución proporcionada por Chen *et al.* con columnas acopladas en serie utilizando elución en gradiente [11], se pensó en otra posibilidad alternativa a la optimización simultánea del perfil del gradiente, junto con la naturaleza y la longitud de las columnas, que se describe a continuación y que puede ofrecer un mejor rendimiento que la solución de Chen *et al.*

La nueva propuesta consiste en seleccionar una combinación óptima de la naturaleza y la longitud de las columnas, junto con la composición de la fase móvil para la elución isocrática, con ayuda de un gráfico de Pareto [7]. A continuación, se busca el perfil óptimo del gradiente para esa combinación. En este caso, el tiempo de cálculo permite realizar una exploración sistemática de los perfiles del gradiente. Sin embargo, se optó por una búsqueda mucho más rápida a través del uso de algoritmos genéticos [19], que iteran una

población de soluciones, haciéndolas evolucionar de acuerdo a principios de evolución natural, de modo que las soluciones convergen gradualmente hasta el óptimo en un tiempo reducido.

Las variables codificadas fueron el contenido inicial y final del modificador, adoptando el orden de las columnas como índice de la permutación. Los algoritmos genéticos implementados para este trabajo aplican las operaciones genéticas clásicas (la probabilidad se proporciona entre paréntesis) de apareamiento, reproducción, cruce (100%) y mutación (3%), junto con la reaparición del mejor individuo histórico (5%). Se utilizó codificación binaria de 8 bits para cada variable, y la población estaba constituida por 100 individuos. Las poblaciones se almacenaron a lo largo de las generaciones, y una vez que el algoritmo genético convergió, se representó el gráfico de Pareto con la población de soluciones incluyendo todos los individuos de todas las generaciones. Sin embargo, sólo se examinó finalmente el frente de Pareto.

En la Figura 10.6a, se representan las soluciones que definen el frente de Pareto para la optimización isocrática, obtenidas mediante una búsqueda sistemática, limitada a las longitudes de las columnas disponibles. Cada punto se corresponde con una combinación óptima de columnas y fase móvil, de acuerdo al concepto de óptimo de Pareto. Como se observa, existen varias soluciones satisfactorias. Se utilizó este gráfico para seleccionar la mejor combinación para optimizar el perfil del gradiente. Puesto que se espera que la aplicación de gradientes a una combinación de columnas acelere la separación, se eligió una combinación que ofreciera un tiempo de análisis relativamente largo, con un valor de pureza de pico cercana a $P = 1$ ($P = 0.991$).

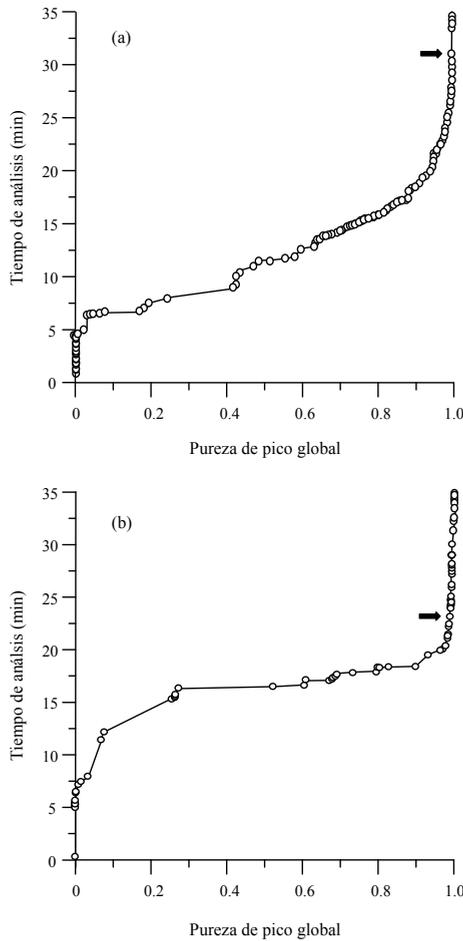


Figura. 10.6. Gráficos de Pareto para: (a) la optimización de la naturaleza y la longitud de las columnas, junto a la composición de la fase móvil en elución isocrática, y (b) optimización del perfil del gradiente con la combinación de columnas señalada en (a). Combinación de columna seleccionada: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm). Las flechas en (a) y (b) indican la resolución y el tiempo de análisis en las condiciones experimentales utilizadas para obtener los cromatogramas de las Figuras 10.7a y b, respectivamente.

La combinación seleccionada aparece marcada en la Figura 10.6a, correspondiendo a la combinación de ACE C₁₈ (5 cm) + ACE Fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) y 16.6% de acetonitrilo. El cromatograma isocrático correspondiente se representa en la Figura 10.7a. Con la combinación de columnas seleccionada, se optimizó el perfil de gradiente. El frente de Pareto construido como se ha explicado anteriormente, basado en las poblaciones de la búsqueda genética, se proporciona en la Figura 10.6b. La exploración se limitó al intervalo 5–30% con $t_G = 60$ min, considerando la permutación de las columnas. Puesto que la combinación de columnas pre-seleccionada contenía cuatro columnas, el número de permutaciones es 24. Para dar una idea general del rendimiento del método, una cifra representativa del número de gradientes predichos permutando las columnas en la búsqueda genética hasta alcanzar la convergencia es 20,000 (20 generaciones con 100 individuos por generación). Sin embargo, sólo se dibujaron los datos para los gradientes óptimos que forman el frente de Pareto (Figura 10.6b).

La solución seleccionada (señalada en la Figura 10.6b), que mantiene la resolución alcanzada en la separación isocrática, consiste en un gradiente con un aumento en el contenido de acetonitrilo desde 16.9 a 28.8% en 60 min ($P = 0.981$). El cromatograma correspondiente se muestra en la Figura 10.7b. El tiempo de análisis se redujo desde algo más de 32 min en el modo isocrático (Figura 10.7a) a 22 min utilizando el gradiente lineal óptimo (Figura 10.7b). Es posible rebajar los tiempos de análisis utilizando gradientes lineales con pendientes mayores, sacrificando resolución.

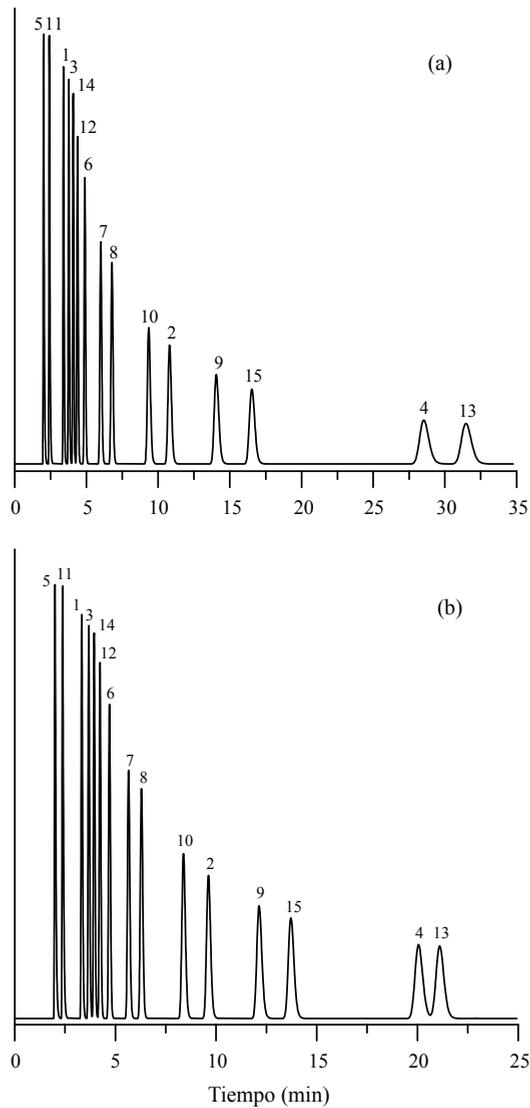


Figura 10.7. Cromatogramas correspondientes a las soluciones de Pareto óptimas señaladas en la Figura 10.6: (a) Elución isocrática con 16.6% de acetonitrilo, y (b) uso de un gradiente de 16.9–28.8% de acetonitrilo en 60 min. La combinación de columnas se indica en la Figura 10.6. Para la identificación de los solutos, véase la Figura 10.1.

La comparación de los resultados obtenidos con las dos estrategias de trabajo presentadas en este capítulo (la optimización de la combinación de columnas pre-seleccionando el perfil del gradiente y la optimización del gradiente utilizando la combinación de columnas óptima obtenida en la optimización en el modo isocrático (Figuras 10.5 y 10.7, respectivamente) indica que la segunda estrategia ofrece mejores resultados. Es interesante indicar que las columnas en las combinaciones óptimas encontradas en las dos estrategias son diferentes: las columnas ACE C₁₈-HL y ACE-C₁₈ AQ sólo están presentes en la solución óptima encontrada por el método de pre-selección de las columnas.

10.5.4. Tiempo de cálculo para las dos estrategias

Naturalmente, la optimización de la combinación de columnas utilizando un gradiente implica un tiempo de cálculo mucho mayor, respecto a la implementación de una separación isocrática (donde los resultados son independientes del orden de las columnas). Como se ha comentado, la optimización basada en la búsqueda sistemática exhaustiva de la combinación de columnas y el programa de gradiente es totalmente inviable, debido al elevadísimo número de condiciones que deben examinarse. El tiempo de cálculo es mucho más aceptable cuando el programa de gradiente o la combinación de columnas se pre-seleccionan.

Cuando se optimiza la combinación de columnas, una vez pre-seleccionado el programa de gradiente, el número de condiciones a examinar se calcula multiplicando el número de posibles combinaciones de columna y el número de permutaciones entre las columnas. En el trabajo aquí expuesto, en el que se hizo uso de cinco columnas, restringiendo la longitud a 15 cm, el número de

condiciones es: 409 combinaciones de columna \times 120 permutaciones = 49,080, lo que representa un tiempo de cálculo aproximado de 2.7 horas (con una CPU Intel Core i7).

El tiempo de cálculo es mayor cuando el programa de gradiente se optimiza tras pre-seleccionar una combinación determinada de columnas. El número total de condiciones que deben examinarse para el caso de estudio, en el que la combinación seleccionada incluyó cuatro columnas, fue: 1 combinación de columnas \times 24 permutaciones \times 31,626 gradientes = 759,024 (42.2 horas de tiempo de cálculo). Este tiempo se redujo a 3 min mediante el uso de algoritmos genéticos, que proporcionó soluciones aceptables en pocas generaciones (10 a 20). A este tiempo, debe añadirse el tiempo de cálculo necesario para encontrar la mejor combinación de columnas bajo elución isocrática: 192 combinaciones de columnas \times 101 niveles de composición de la fase móvil (en incrementos de 0.1%) = 19,392 (1 hora de tiempo de cálculo). Debe, sin embargo, señalarse que la solución isocrática está disponible para el analista antes de considerar el gradiente.

10.6. Conclusiones

Existe una amplia variedad de problemas analíticos complejos, que no pueden abordarse con la estrategia convencional que utiliza una única columna, pero que pueden ser resueltos con columnas acopladas en serie utilizando protocolos apropiados. En este capítulo, se ha abordado la implementación de gradientes lineales óptimos, utilizando combinaciones de hasta cinco columnas ACE de diferente selectividad y longitud, y mezclas de acetonitrilo-agua para resolver una mezcla de 15 sulfonamidas. Para modelizar el comportamiento de cada columna, se desarrollaron experiencias isocráticas.

Debe tenerse en cuenta que las columnas se comercializan con longitudes pre-definidas; por lo tanto, el analista no puede ajustar la combinación de columnas a cualquier longitud arbitraria. Esta característica contrasta con la selección de niveles para explorar el contenido de disolvente orgánico en una fase móvil isocrática o programa de gradiente, que son factores continuos y se pueden fijar a cualquier valor arbitrario.

El sistema predictor que se ha construido se puede utilizar para simular gradientes cuando se utiliza una columna aislada o columnas acopladas en serie, utilizando condiciones isocráticas o gradientes lineales, multi-lineales o multi-isocráticos (véase el Capítulo 11). Cabe también señalar que el mismo sistema predictor se puede utilizar para las distintas estrategias de trabajo que hacen uso de columnas acopladas en serie. En este trabajo, se ha estudiado dos de ellas: la optimización de la combinación de columnas pre-seleccionando el programa de gradiente, y la optimización del programa de gradiente pre-seleccionando la combinación de columnas.

En elución en gradiente, cada soluto migra de acuerdo con la fuerza del disolvente en el microambiente de su banda de elución. Como consecuencia del tránsito a lo largo de las columnas acopladas en serie, el frente del gradiente alcanza al soluto con un tiempo de retraso progresivamente mayor (asociado al tránsito a través de las columnas anteriores y la porción de la columna en la que se halla el soluto). Esto obliga a implementar correcciones para tener en cuenta todos estos retrasos, que mejoran notablemente la calidad de las predicciones, independientemente del objetivo de la optimización: la combinación de columnas o el gradiente. Atendiendo a la selectividad de las diferentes columnas, se han observado excelentes correlaciones entre los valores experimentales y los predichos, pero se producen pequeños sesgos en

la predicción de la retención, especialmente para los solutos más lentos. Estos sesgos también han sido observados por otros autores [11]. Los errores de predicción pueden deberse a los conectores que unen las columnas, o más probablemente, a errores en la preparación de la fase móvil, a la pérdida de componentes volátiles, o a cambios a largo plazo en la fase estacionaria.

La comparación de los dos métodos de optimización evaluados en este capítulo indica que la pre-selección de la combinación de columnas, seguida de la optimización del gradiente, es capaz de encontrar las mejores soluciones. De hecho, este método parece ser más razonable, ya que generalmente se alcanza la resolución máxima en elución isocrática, aunque a menudo a costa de tiempos de análisis inadecuados. La elución en gradiente tiende a lograr la resolución máxima conforme la complejidad de los programas de gradiente aumenta [20]. En teoría, se puede encontrar la misma solución con la estrategia que selecciona el programa de gradiente, siempre que el gradiente sea el óptimo, pero esta información es desconocida *a priori*. Obsérvese también que este método tiende a producir sólo un pequeño número de soluciones con una resolución suficientemente alta (véanse los resultados para los tres gradientes seleccionados en la Figura 10.4, con una amplia región vacía en el intervalo $P = 0.2-0.8$). Por el contrario, para el nuevo método descrito en este trabajo, el frente de Pareto (Figura 10.6b) incluye múltiples soluciones con $P \approx 1$ (resolución completa), con una mayor calidad que las soluciones ofrecidas por el método que pre-selecciona el gradiente.

De acuerdo a nuestra experiencia, el uso de columnas acopladas en serie requiere un protocolo de trabajo en etapas. Sólo debe realizarse, en primer lugar, el acoplamiento si la optimización con varias columnas aisladas no ofrece resultados satisfactorios. En este caso, la información recogida se puede

reutilizar para encontrar la mejor combinación de las columnas y contenido de disolvente, con ayuda de simulación por ordenador en el modo isocrático. Si el tiempo de análisis no es conveniente, la misma información puede aprovecharse para encontrar la mejor separación en gradiente. El único dato que debe añadirse a la separación en gradiente es el tiempo de retardo.

Por último, debe comentarse que el tiempo de análisis se reducirá aplicando gradientes multi-lineales. Sin embargo, la complejidad de la implementación de estos gradientes y la inclusión de etapas isocráticas o gradientes con pequeñas pendientes requiere su propio espacio, y será el objetivo de la segunda parte de este trabajo, que se presenta en el Capítulo 11.

10.7. Referencias

- [1] Bischoff Gmbh, K. Bischoff, S. Nyiredy, Z. Szücs, *Elements for separating substances by distributing between a stationary and a mobile phase, and method for the production of a separating device*, Patent Appl. No. 10 2005 024 154.9 (2005).
- [2] H.J. Issaq, J. Gutiérrez, *Mixed packings in high performance liquid chromatography. II. Mixed packings vs. mixed ligands*, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 2851–2861.
- [3] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, *Solvent modulation in liquid chromatography: extension to serially coupled columns*, J. Chromatogr. A 691 (1995) 171–185.
- [4] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Comparison of two serially-coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures*, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 94–105.

-
- [5] K. Chen, F. Lynen, T. Szucs, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography with conventional columns*, *Analyst* 138 (2013) 2914–2923.
- [6] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the "PRISMA" principle*, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 122–130.
- [7] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Simultaneous optimization of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially coupled columns*, *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 39–48.
- [8] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, *Detection of low-abundance impurities in synthetic thyroid hormones by stationary phase optimized liquid chromatography-mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 279–288.
- [9] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Multiple step gradient analysis in stationary phase optimised selectivity LC for the analysis of complex mixtures*, *Chromatographia* 69 (2009) 609–614.
- [10] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Stationary-phase optimized selectivity liquid chromatography: Development of a linear gradient prediction algorithm*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1733–1743.
- [11] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Selectivity optimization in green chromatography by gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7222–7230.
- [12] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D.Y. Chen, *Application of phase optimized liquid chromatography to oligopeptide separations*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 764–767.
- [13] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.

- [14] J.J. Baeza Baeza, C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1284 (2013) 28–35.
- [15] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 125–145.
- [16] P. Jandera, J. Churáček, *Gradient elution in liquid chromatography. II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography. Theoretical considerations*, J. Chromatogr. 91 (1974) 223–235.
- [17] S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187–198.
- [18] A.K. Smilde, A. Knevelman, P.M.J. Coenegracht, *Introduction of multi-criteria decision making in optimization procedures for high-performance liquid chromatographic separations*, J. Chromatogr. 369 (1986) 1–10.
- [19] L. Davis, *A Genetic Algorithms Tutorial*, in: Handbook of Genetic Algorithms (editado por L. Davis), Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 1991, págs. 1–101.
- [20] V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. 1063 (2005) 79–88.

CAPÍTULO 11

**OPTIMIZACIÓN DE LA ELUCIÓN EN GRADIENTE CON
COLUMNAS ACOPLADAS EN SERIE
PARTE II: GRADIENTES MULTI-LINEALES**

11.1. Summary

An interpretive approach is reported for the simultaneous optimisation of resolution and analysis time in the separation of complex samples by reversed-phase liquid chromatography, using serially-coupled columns of different lengths and nature, and multi-linear gradient elution. The results complement those reported in Chapter 10 for single linear gradients, using combinations of five columns: three C₁₈ columns of different characteristics, a cyano column and a phenyl column. The relationships between the logarithm of the retention factor ($\ln k$) and the organic solvent content (φ), and between the peak half-widths and the retention times, for each analyte, were determined using isocratic retention times. From the established correlations, the gradient retention time was predicted using the fundamental equation for gradient elution (modified to be used for serially-coupled columns), and with this information, the peak profile. Two chromatographic goals (maximal peak purity and minimal analysis time) were simultaneously evaluated using the Pareto optimality concept. The rigorous predictive system can be easily applied to columns from different manufacturers, and succeeds at different levels: single and combined columns, using isocratic and gradient elution. The computation time for gradient elution optimisation was significantly reduced to practical values with the help of genetic algorithms.

11.2. Introducción

La práctica habitual para un analista que trabaja en cromatografía líquida es seleccionar una única columna para resolver un problema de separación. Sin embargo, cuando se trabaja con problemas complejos, a pesar de los continuos avances en los materiales utilizados como fases estacionarias y las mejoras en la tecnología de empacado de las columnas (con incrementos significativos en la selectividad y eficacia cromatográfica), la resolución cromatográfica todavía puede ser insuficiente con las columnas disponibles. Es posible que exista una columna ideal para cada problema concreto, pero ésta puede no estar disponible en el laboratorio, o encontrarse sólo tras comprobar el rendimiento de numerosas columnas, lo que resulta poco práctico.

En los Capítulos 8 y 9, se ha descrito el desarrollo de un sencillo método multi-columna que utiliza columnas de diferente naturaleza acopladas en serie y elución isocrática, en el que la composición de la fase móvil se optimiza junto con la naturaleza y la longitud de las columnas combinadas [1]. El método incrementa enormemente las probabilidades de éxito, respecto a un método anterior en el que se fijaba la composición de la fase móvil isocrática (es decir, sólo se optimizaban la naturaleza y la longitud de las columnas) [2–4]. A pesar de que, en elución isocrática los tiempos de análisis son apreciablemente más cortos empleando columnas acopladas en serie, respecto a los obtenidos con las columnas individuales, se ha investigado la posibilidad de acortar aún más los tiempos de análisis mediante el uso de elución en gradiente. La optimización simultánea del perfil del gradiente y de la naturaleza y la longitud de la columna es inviable, debido al volumen de los cálculos necesarios. Sin embargo, se han propuesto dos metodologías más sencillas que resultan útiles: (i) la búsqueda de la mejor combinación de

columnas tras seleccionar el programa de gradiente [5–7], y (ii) la búsqueda de los mejores programas de gradiente tras seleccionar la combinación de columnas, método que fue propuesto en el Capítulo 10. La selección de la combinación de columnas, seguida de la optimización del gradiente, proporciona una mayor variedad de soluciones y, en general, óptimos de mejor calidad. En este enfoque, la mejor combinación de columnas acopladas en serie es la utilizada en elución isocrática [1].

El protocolo de optimización para implementar gradientes con columnas acopladas en serie es más elaborado que el necesario para gradientes con columnas sencillas. En el Capítulo 10 (Parte I de este trabajo), se describieron los principios básicos para optimizar la elución en gradiente empleando columnas acopladas en serie. Allí sólo se consideraron gradientes lineales positivos. En este capítulo (Parte II), se estudia la optimización de gradientes multi-lineales, que son capaces de reducir significativamente el tiempo de análisis respecto a los gradientes lineales simples. El enfoque propuesto explora gradientes multi-lineales que incluyen etapas isocráticas, estableciendo previamente el tiempo de duración del gradiente y las concentraciones inicial y final del mismo. De nuevo se hace uso de los gráficos de Pareto para ayudar en la selección de las mejores condiciones de separación, teniendo en cuenta tanto la resolución como el tiempo de análisis. Este capítulo continúa la investigación iniciada sobre el desarrollo de nuevas herramientas para optimizar columnas acopladas en serie, estudio que se inició aplicando elución isocrática con una composición de fase móvil fija [4], utilizando como compuestos de prueba 15 sulfonamidas eluidas con fases móviles de acetonitrilo-agua.

11.3. Parte experimental

Se ha hecho uso de los mismos reactivos y columnas descritas en los Capítulos 8 y 9, así como de la misma bomba de gradiente utilizada en el Capítulo 10.

11.4. Base teórica

El Capítulo 10 describe la teoría básica para predecir la retención y el perfil de los picos en elución en gradiente, utilizando columnas acopladas en serie. A continuación, se analizan algunos de los problemas que se plantean en esos cálculos. Previamente se debe recordar que, en elución en gradiente, el perfil del gradiente (es decir, el cambio en el contenido del disolvente orgánico con el tiempo, $\varphi(t)$) se mide a la entrada de la columna (para una combinación de columnas, a la entrada de la primera columna). Con gradientes positivos, el contenido de disolvente orgánico se incrementa al atravesar las columnas acopladas. Debe recordarse también que la concentración relevante en elución en gradiente es la concentración local que rodea al soluto dentro de la columna, que está relacionada con el tiempo que necesita el frente del gradiente para alcanzar al soluto. Debe incluirse en los cálculos el tiempo que el frente del gradiente requiere para alcanzar la entrada de la primera columna (es decir, el tiempo de retardo, que depende de las conexiones externas previas a las columnas). Con columnas acopladas en serie, también debe añadirse el tiempo que necesita el soluto para cruzar la columna(s) anterior(es) a la que en un momento dado se halla el soluto.

11.4.1. Integración de la ecuación fundamental

Para una columna dada i , la predicción de la retención al aplicar un gradiente se basa en la denominada "ecuación fundamental" [8,9]:

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_{g,ij}-t_0} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \tag{11.1}$$

donde t_d es el tiempo de retardo, $t_{g,ij}$ el tiempo de retención observado en gradiente para un soluto j (a la salida de la columna), k_{ij} el factor de retención (a la entrada de la columna), φ_0 la composición inicial de fase móvil, y $\varphi(t)$ el perfil del gradiente (a la entrada de la columna). Es necesario resolver una ecuación particular para cada soluto eluido con una columna diferente. Un procedimiento universal precisaría desarrollar predicciones numéricas con modelos no integrables, para incrementar la exactitud de las predicciones en intervalos amplios de disolvente. Además, en el caso particular de las columnas acopladas en serie, la única opción es la resolución numérica, incluso en el caso más sencillo donde participan sólo dos columnas y un gradiente lineal. Ello se debe a que las soluciones se encuentran anidadas (es decir, la solución para cada columna y soluto depende de la solución para las columnas anteriores).

La integración numérica implica la división de la Ecuación (11.1) en una serie de integrales:

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_1} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \dots + \int_{t_{n-1}}^{t_n} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \int_{t_n}^{t_{g,j}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} \tag{11.2}$$

donde t_1, t_2, \dots, t_n son las divisiones de tiempo en que se ha dividido el tiempo de gradiente, y $t_{01}, t_{02}, \dots, t_{0n}$ los tiempos necesarios para que el gradiente

alcance al soluto en cada sección de columna infinitesimal, medida desde la entrada de la columna. Para intervalos de tiempo suficientemente cortos, cada término de la suma representa una etapa isocrática a lo largo del perfil del gradiente. El tiempo de retención del gradiente para una columna i ($t_{g,ij}$) es el tiempo asociado al término en el que la suma de integrales de la Ecuación (11.2) coincide con el tiempo muerto para esa columna (t_{0i}).

Dado que el factor de retención es constante en cada etapa q isocrática, en cada intervalo se puede adoptar el valor central $k_{ij}(\varphi_q)$. Para este cálculo, la Ecuación (11.2) requiere un programa de gradiente corregido ($\varphi_s(t)$), que prediga la concentración del disolvente orgánico en la posición en la que se halla el soluto. La solución de la integral puede ser descrita de la siguiente manera:

$$t_{0i} = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{t_1 - t_d}{k_{ij}(\varphi_{s,1})} + \frac{t_2 - t_1}{k_{ij}(\varphi_{s,2})} + \dots + \frac{t_g - t_n}{k_{ij}(\varphi_{s,n})} = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,1})} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,2})} + \dots + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,n})} \quad (11.3)$$

Por lo tanto, el tiempo de retención de gradiente para cada soluto, y cada columna en el conjunto acoplado, es la suma de varias contribuciones de tiempo, que pueden corresponder a elución en gradiente o isocrática, o bien a un perfil de elución mixto. Finalmente, el tiempo de retención en gradiente para la combinación de columnas es la suma del tiempo de retención asociado a cada columna, a la que debe añadirse la contribución extra-columnar.

Una cuestión importante es que el modelo de retención depende de la columna donde el soluto está siendo eluido a lo largo de su recorrido por las columnas acopladas en serie, y del dominio del perfil de gradiente asociado a esa columna. Por esta razón, el conocimiento del tiempo al que el soluto

abandona una cierta columna para ser transferida a la siguiente es crítico. La obtención de esta información es bastante simple, ya que ello ocurre cuando la suma de integrales (Ecuación (11.3)) coincide con t_{0i} .

11.4.2. Protocolo a seguir para considerar los retrasos del frente de disolvente dentro de una columna

Como se ha comentado, a lo largo de la elución del soluto, se deben considerar una serie de retrasos del frente del disolvente:

- (i) el retraso extra-columnar o instrumental,
- (ii) el retraso generado por el tránsito a través de columnas anteriores (es decir, la suma de los tiempos muertos para esas columnas), y
- (iii) el volumen intra-columnar o retraso interno (es decir, el retraso asociado a la distancia migrada por el soluto dentro de la columna, donde el soluto está eluyendo en un momento dado).

Los dos primeros retrasos se pueden obtener fácilmente. El verdadero problema es el cálculo del retraso interno, que es relevante para realizar la integración numérica. Esto requiere una explicación adicional.

En principio, el retraso interno puede ser implementado en la dirección del tiempo o en la dirección del contenido de disolvente (es decir, mediante la corrección de t o de φ , respectivamente, en $k_{ij}(\varphi(t))$, véase la Figura 11.1).

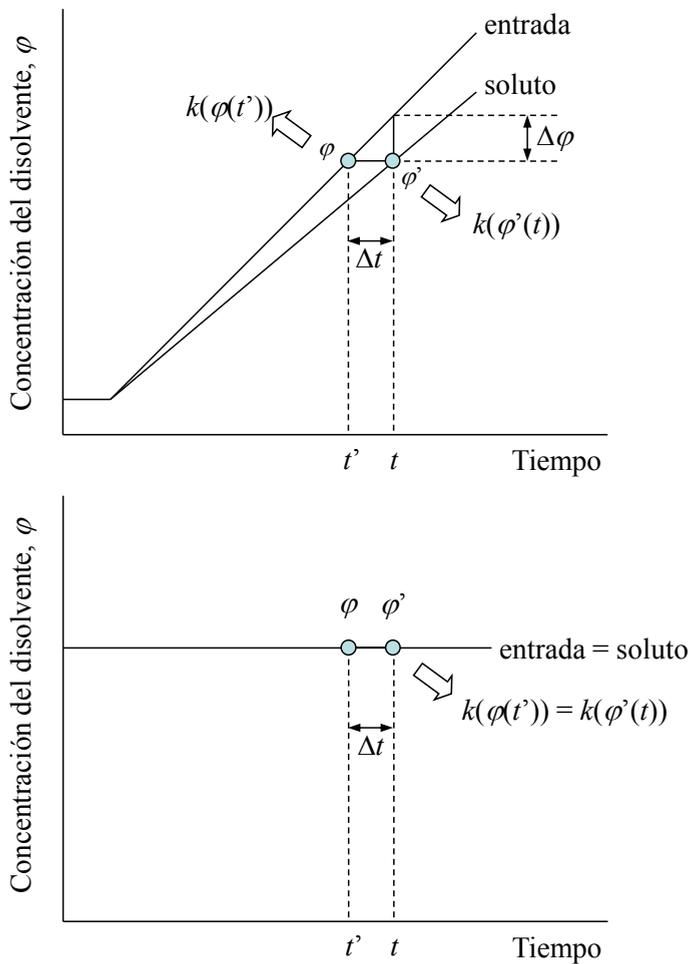


Figura 11.1. Retrasos en la dirección del tiempo y de la concentración de disolvente orgánico: (a) aplicación de un gradiente y (b) elución isocrática. En (b), no se requiere ninguna corrección. Para más detalles véase el texto.

La corrección en la dirección del tiempo parece ventajosa en términos de cálculo, y también es conceptualmente más simple, ya que cada término de la integral se relaciona con la fracción de volumen de columna migrada. Por lo tanto, es equivalente a un cambio en la escala de tiempos. Esto permitiría el uso de una tabla pre-calculada de factores de retención para todas las integraciones y correcciones. Sin embargo, tal corrección puede ser equívoca, especialmente con gradientes que incluyen una etapa isocrática o etapas con pequeñas pendientes. El fracaso de la corrección en la dirección del tiempo es debido al hecho de que la verdadera variable que debe conocerse es el contenido de disolvente orgánico en la posición en la que se halla el soluto. Si un retraso en la dirección del tiempo no se traduce en un cambio en el contenido de disolvente orgánico, la corrección será incorrecta (Figura 11.1b). Por lo tanto, el mejor esquema de cálculo debe implementar los retrasos en términos de contenido de disolvente.

11.4.3. Diseño de gradientes multi-lineales

En un gradiente multi-lineal, se definen dos o más segmentos consecutivos de diferente pendiente, en los que la concentración de disolvente orgánico se incrementa linealmente. Con el fin de acelerar la elución, las pendientes del gradiente deben ser siempre positivas e incrementarse en etapas sucesivas, pero ocasionalmente pueden ser útiles una o más etapas isocráticas, o puede ser conveniente disminuir la pendiente con respecto a segmentos previos, para conseguir la separación óptima de algunos solutos.

Un caso particular de gradiente lineal es un gradiente en una sola etapa (es decir, sin nodos), que se describió en el Capítulo 10. En ese estudio, el tiempo de gradiente se fijó a un valor conveniente, y se optimizaron los

contenidos de disolvente inicial y final. Un gradiente multi-lineal (con uno o más nodos) posee un mayor número de parámetros asociados (los mismos que para el gradiente lineal, y el tiempo y el contenido de disolvente orgánico para cada nodo). Si se consideraran todos estos parámetros, y se realizara una búsqueda sistemática (es decir, una búsqueda en grid), la optimización sería inviable. Por esta razón, el algoritmo mostrado en este trabajo se diseñó fijando el tiempo de gradiente, así como el contenido de disolvente inicial y final, optimizándose tan solo las coordenadas de los nodos. Además, la búsqueda sistemática fue reemplazada por una búsqueda más eficiente, tal como se explica a continuación.

En el protocolo de optimización, el primer nodo se buscó dentro de todo el dominio de contenido de disolvente orgánico, el segundo nodo en el espacio que quedaba entre el primer nodo y el contenido de disolvente final, y así sucesivamente. El contenido de disolvente inicial se puede establecer arbitrariamente o ser seleccionado en base al contenido de disolvente óptimo encontrado en la optimización isocrática, utilizando la misma combinación de columnas. El intervalo de concentraciones del gradiente también puede delimitarse teniendo en cuenta el encontrado en la optimización del gradiente lineal simple.

Atendiendo al comportamiento de retención de los solutos, se pueden plantear al menos dos casos, para cualquier gradiente, que se han considerado en el software preparado para este trabajo:

- (i) *La elución del soluto finaliza isocráticamente*: el gradiente termina antes de que el soluto alcance la salida de la combinación de columnas. Por lo tanto, el soluto migrará isocráticamente a través de la fracción de columna

restante (o, las columnas subsiguientes). En este caso, debe calcularse la fracción de la columna en la que el soluto migra en estas condiciones.

- (ii) *La elución del soluto finaliza durante el gradiente*: Cuando no existe información previa, el intervalo de composiciones adoptado inicialmente puede ser demasiado amplio, y el último o últimos nodos pueden situarse tras la elución del soluto más retenido (fuera de la región de elución). En este caso, la composición final debe reducirse, y repetir la optimización utilizando límites de búsqueda más adaptados. Si los límites no son correctos, la ubicación de los nodos lo indicará, sugiriendo nuevos límites para repetir la optimización. Esta estrategia es más flexible que otras en las que los nodos poseen coordenadas fijas de contenido de disolvente orgánico o de tiempo.

11.4.4. Optimización de gradientes multi-lineales

Cada soluto en una mezcla posee características específicas. Por lo tanto, un algoritmo eficiente debe ser capaz de pronosticar los gradientes de forma rápida y exacta, para una gran variedad de solutos simultáneamente, preferiblemente en términos matriciales. El método más sencillo a utilizar para implementar gradientes multi-lineales consiste en la inserción de nodos que alteran un gradiente lineal óptimo establecido con anterioridad, el cual se asiste por la observación de cromatogramas simulados [10–12]. De forma similar a la elución isocrática, podría desarrollarse una búsqueda sistemática en grid para encontrar la posición de uno, dos o más nodos en los gradientes multi-lineales. Sin embargo, esto tiene el inconveniente de que el tiempo de cálculo aumenta exponencialmente con el número de nodos. Por lo tanto, ésta es claramente una mala estrategia para optimizar el perfil del gradiente para columnas acopladas

en serie. Una alternativa mucho más eficiente es desarrollar la búsqueda empleando algoritmos genéticos (GAs, *genetic algorithms*) [13], ya que la exploración se concentra progresivamente en las regiones más prometedoras en el dominio de trabajo. Los GAs son métodos de optimización global constreñidos y resultan una buena alternativa en problemas en los que existe un elevado número de soluciones locales. Cuanto más compleja sea la situación, más ventajosa es la aplicación de los GAs.

Una etapa obligatoria en los GAs es la codificación de la información en números discretos (por lo general, números binarios), lo que da lugar a una entidad de parámetros codificados, denominados "cromosomas". Cada parámetro de un cromosoma posee varios niveles asociados, que pueden corresponder a un número entero o a un número real que se discretiza. Una búsqueda a través de GAs comienza usualmente con una población aleatoria de soluciones codificadas, que consisten típicamente de entre 20 y 500 individuos, que constituyen la población inicial. Esta población es forzada a evolucionar de acuerdo a reglas que simulan procesos de selección natural, por lo que gradualmente, las soluciones convergen en el óptimo, que preferiblemente debe ocurrir en un tiempo corto. La primera etapa del proceso consiste en evaluar la calidad de cada individuo de la población, a la que se denomina "fitness" (aptitud). En este trabajo, se ha atendido a la resolución global para mejorar el gradiente, no considerando el tiempo hasta alcanzar la convergencia. El operador de selección se basó en el concepto de la "rueda de ruleta".

Con la información obtenida, la población inicial se somete a algunas operaciones matemáticas que imitan procesos genéticos (la probabilidad aplicada se indica entre paréntesis): apareamiento (100%), reproducción (100%), cruce (100%), mutación (3%), y reaparición del mejor individuo

histórico (5%). Estas operaciones simulan la forma en la que los mejores individuos sobreviven y priman en la naturaleza, cruzando su información genética para dar lugar a mejores nuevos individuos. A cada ciclo se le denomina "generación". El proceso se detiene cuando no se observa una mejora significativa (en este trabajo en la resolución) tras un número razonable de generaciones, lo que suele suceder cuando un pequeño número de soluciones asociadas domina la población (es decir, cuando la diversidad genética cae por debajo de un determinado umbral).

En este trabajo, se utilizaron como parámetros codificados las coordenadas de cada nodo (tiempo y contenido de disolvente). El orden de las columnas se incluyó como un índice de permutación. Se utilizó codificación binaria de 8 bits para cada parámetro, y el tamaño de la población fue de 100 individuos. Las poblaciones se almacenaron a lo largo de las generaciones, y una vez que la búsqueda por GAs convergió, se representó el gráfico de Pareto (tiempo de análisis frente a la resolución) correspondiente a la población acumulada (que incluía todos los individuos de todas las generaciones).

Todo el proceso se llevó a cabo con un software integral construido en el laboratorio en MATLAB 2014a, que se puede aplicar para optimizar la separación con columnas simples o combinadas, en elución isocrática, y con gradientes multi-isocráticos (constituidos de etapas sucesivas isocráticas), gradientes lineales simples y gradientes multi-lineales.

11.5. Resultados y discusión

11.5.1. Uso de columnas individuales con elución isocrática y en gradiente

La manera habitual de hacer frente a un problema de separación es seleccionar una columna cromatográfica de entre las disponibles en el laboratorio, o escogerla de un catálogo. De acuerdo a ello, se inició nuestro estudio examinando la posibilidad de resolver el conjunto de compuestos de prueba (15 sulfonamidas) con una columna aislada. Se obtuvo el comportamiento cromatográfico (retención y perfil de pico), para cada soluto y columna disponible, a partir de datos experimentales obtenidos isocráticamente en el intervalo de acetonitrilo 5–30% v/v. Los modelos ajustados de retención y perfil de pico permitieron la estimación de la pureza de pico global (P) para las columnas individuales. La resolución global máxima (pureza de pico) y el tiempo de análisis para columnas de 12 cm fueron: ACE C₁₈ ($P = 0.942$ y 36.8 min), ACE C₁₈-HL ($P = 0.174$ y 237 min), ACE AQ ($P = 0.374$ y 411 min), ACE ciano ($P = 0.131$ y 47.7 min), y ACE fenilo ($P = 0.461$ y 61.2 min). Por lo tanto, entre las cinco columnas ACE probadas en nuestro laboratorio, la columna ACE C₁₈ dio lugar a la mejor separación cromatográfica, aunque la resolución no fue completa y el tiempo de análisis fue excesivo.

Las Figuras 11.2a y c muestran que no hay una solución única a la selección de la composición de la fase móvil, sino una población de soluciones, ya que el objetivo de un analista no es sólo alcanzar una buena resolución, sino también atender al tiempo de análisis (que debería ser lo más corto posible). Las figuras sólo muestran los frentes de Pareto, restringidos a las soluciones que proporcionan tiempo de análisis inferiores a 40 (elución isocrática) y 25 min (elución en gradiente), respectivamente.

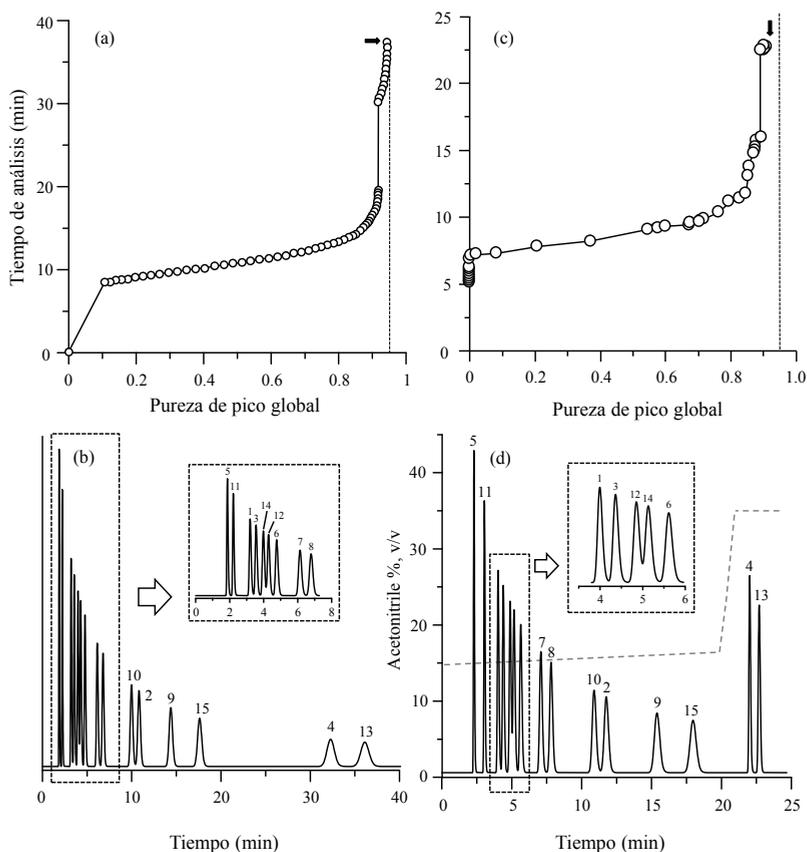


Figura 11.2. Gráficos de Pareto (a,c), y cromatogramas óptimos (b,d) para la mezcla de 15 sulfonamidas, analizadas con una columna ACE C₁₈ de 12 cm. Composición de la fase móvil y resolución global para: (a,b) elución isocrática (15.2% de acetonitrilo, $P = 0.942$), y (c,d) gradiente multi-lineal ($t_d = 0.89$ min, 14.9–16.3% de acetonitrilo en 19.0 min, 23.0% en 19.3 min y 35.0% en 20.0 min, $P = 0.906$). Compuestos: (1) sulfacetamida, (2) sulfacloropiridazina, (3) sulfadiazina, (4) sulfadimetoxina, (5) sulfaguanidina, (6) sulfamerazina, (7) sulfametazina, (8) sulfametizol, (9) sulfametoxazol, (10) sulfamonometoxina, (11) sulfanilamida, (12) sulfapiridina, (13) sulfaquinoxalina, (14) sulfatiazol, y (15) sulfisoxazol. En (a) y (c), se indica la pureza global $P = 0.95$ con una línea discontinua.

La mejor separación isocrática se obtuvo con la columna ACE C₁₈, utilizando un 15.2% de acetonitrilo (Figura 11.2b). Según se observa, existe un pequeño solapamiento entre sulfapiridina y sulfatiazol (compuestos 12 y 14). El uso de gradientes multi-lineales con tres nodos (Figura 11.2d) disminuye el tiempo de análisis de 37 a 23 min, pero a costa de perder resolución ($P = 0.906$).

11.5.2. Selección de la mejor combinación de columnas acopladas

Las columnas ACE se utilizaron para construir combinaciones de columnas acopladas en serie, lo que permitió extender el intervalo de selectividad. Una consideración práctica importante se refiere al volumen de cálculo: incluso considerando un pequeño número de fases estacionarias (cinco fases estacionarias en este trabajo), el número de condiciones examinadas fácilmente puede superar el millón, lo que sobrecarga la memoria RAM del ordenador. Por lo tanto, se adoptaron dos restricciones para asegurar que únicamente se procesaran soluciones viables: el tiempo de análisis debería ser inferior a 50 min, y la longitud máxima de la combinación de columnas no debería superar los 15 cm.

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, una buena opción para implementar columnas acopladas en serie, utilizando gradientes, es optimizar en primer lugar la combinación de columnas en elución isocrática, y emplear a continuación esa combinación para averiguar la mejor solución en gradiente. Esta optimización descartará una columna si no ofrece ninguna mejora en la separación, e indicará la naturaleza de la combinación de columnas (naturaleza y longitud de las columnas individuales) más adecuada.

La optimización de la elución en el modo isocrático, para las columnas acopladas en serie, es también conveniente para establecer una referencia para apreciar la magnitud de la reducción en el tiempo de análisis, conseguido con un protocolo de elución en gradiente.

En la Figura 11.3a, se representa el frente de Pareto correspondiente a la optimización isocrática de la composición de la fase móvil, junto con la naturaleza y la longitud de las columnas acopladas en serie. Para ayudar a la selección de la mejor combinación de columnas, sobre el gráfico también se ha añadido una línea que representa la pureza de pico $P = 0.95$, que se consideró como un valor satisfactorio mínimo, ya que los picos peor resueltos ofrecen una pureza mínima de $p = 0.975$. Debe llamarse la atención sobre el hecho de que esta resolución no puede alcanzarse con una sola columna (Figura 11.2a).

En la Figura 11.3a, se han señalado con una flecha tres soluciones con $P > 0.95$, y en las Figuras 11.3b, c y d se representan los cromatogramas correspondientes. Estos cromatogramas se obtuvieron con tres combinaciones diferentes de columna, a las que llamaremos Combinaciones I, II y III. La Combinación I (Figura 11.3b) está construida con un sistema de cuatro columnas: ACE C₁₈ (7 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) ($P = 0.9992$ para el óptimo seleccionado). La Combinación II (Figura 11.3c) es también un sistema de cuatro columnas: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) ($P = 0.9986$). Finalmente, la Combinación III (Figura 11.3d) se compone de tres columnas: ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) ($P = 0.978$). El contenido óptimo de acetonitrilo en la fase móvil para las tres soluciones fue similar: 16.7%, 16.6% y 16.6%, respectivamente.

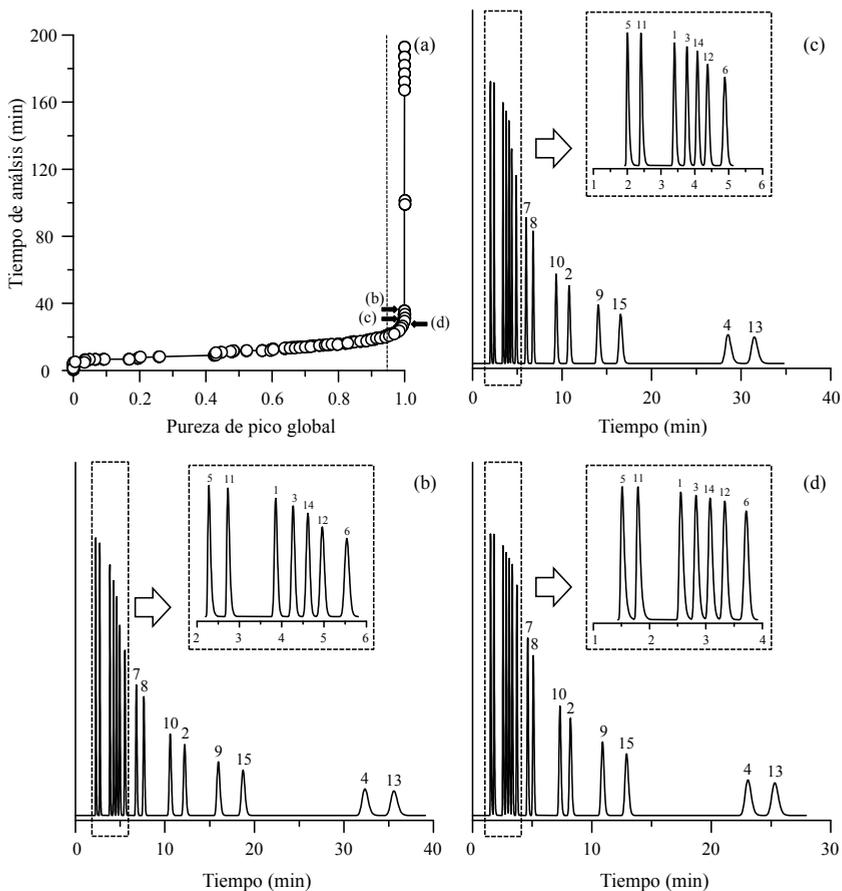


Figura 11.3. Optimización simultánea de la composición de la fase móvil, y la naturaleza y la longitud de las columnas en elución isocrática: Gráfico de Pareto (a), y cromatogramas óptimos (b, c y d). Combinación de columnas y composición de la fase móvil: (b) ACE C₁₈ (7 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) y 16.7% de acetonitrilo ($P = 0.9992$), (c) ACE C₁₈ (5 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) y 16.6% de acetonitrilo ($P = 0.9986$), y (d) ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) y 16.6% de acetonitrilo ($P = 0.978$). Las flechas en (a) indican la resolución y el tiempo de análisis de los cromatogramas mostrados en (b)-(d). Otros detalles se ofrecen en el pie de la Figura 11.2.

Ciertamente, el criterio para seleccionar la combinación de columnas puede diferir de acuerdo a las prioridades del analista (por ejemplo, la resolución o el tiempo de análisis), pero también dependerá del modo de elución. Si el objetivo es trabajar utilizando elución isocrática, se puede sacrificar algo de resolución para obtener tiempos de análisis suficientemente cortos. Entonces, la Combinación III sería la mejor opción. En cambio, si el objetivo final es utilizar elución en gradiente, puede ser más interesante seleccionar una combinación que ofrezca valores de resolución más elevados, aunque a costa de un mayor tiempo de análisis, que será reducido optimizando el gradiente. Éste es el caso de las Combinaciones I y II. Este último criterio fue elegido para los estudios en gradiente de elución que se muestran en el Capítulo 10, y se utilizará de nuevo aquí.

11.5.3. Elución en gradiente utilizando columnas acopladas en serie

a) Orden de las columnas

En elución isocrática, los tiempos de retención obtenidos con las columnas acopladas en serie son independientes del orden de las columnas, siempre y cuando las conexiones entre columnas sean correctas [4]. Los tiempos de retención son combinaciones lineales de los tiempos correspondientes a cada columna:

$$t_{R_{c,j}} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n t_{R_j} \quad (11.4)$$

Sin embargo, en gradiente, el orden de las columnas afecta a los tiempos de retención. Cada columna ofrece un comportamiento de retención particular, y dependiendo de su ubicación en la combinación, se verá afectada por un

intervalo distinto de disolvente orgánico en el gradiente. Aunque el efecto del orden de las columnas se ha comentado en el Capítulo 10, es interesante mostrarlo con más detalle, considerando ambas respuestas (resolución y tiempo de análisis). El efecto del orden de las columnas se ilustra en la Tabla 11.1 para la Combinación II (construida con cuatro columnas acopladas), utilizando un gradiente multi-lineal en el que se optimizan cuatro segmentos lineales (tres nodos), incluyendo todas las posibles permutaciones de columnas ($4 \times 3 \times 2 = 24$). Los datos que figuran en la tabla son los valores de P y de t_{anal} para la máxima resolución, la pureza de pico global para un tiempo de análisis de $t_{\text{anal}} = 14$ min y el tiempo de análisis correspondiente a una pureza de pico global de $P = 0.97$ (que se alcanzó en todos los casos).

Es evidente la diferencia en el rendimiento de las distintas permutaciones. Teniendo en cuenta todos los parámetros evaluados, se concluyó que las mejores permutaciones de columnas eran: ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm), y ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈ (5 cm) (marcadas con asteriscos en la tabla; nótese que sólo ha cambiado el orden de ACE C₁₈ y ACE C₁₈-HL).

En la Tabla 11.1, cada permutación se halla asociada a un gradiente óptimo distinto (no indicado). Por lo tanto, se consideró interesante repetir el estudio fijando el gradiente para aislar el efecto real de la permutación de las columnas. En la Figura 11.4, se muestran los cromatogramas obtenidos para cuatro permutaciones, incluyendo una de las dos mejores y la peor, entre las 24 posibles. Debe observarse que las mejores permutaciones coinciden con las obtenidas en el estudio anterior.

Tabla 11.1. Rendimiento de las permutaciones para la Combinación II.

Permutaciones ^a	Pureza de pico ^b		Tiempo de análisis ^c	
	P_{\max}	$t = 14 \text{ min}$	t_{\max}	$P = 0.97$
C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm)	0.9966	0.8860	29.69	19.36
C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm)	0.9969	0.8874	29.95	18.35
C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm)	0.9929	0.8763	26.22	19.84
C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm)	0.9963	0.8617	28.18	19.84
C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm)	0.9969	0.8338	29.90	18.84
C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm)	0.9967	0.8931	29.50	18.54
Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm)	0.9966	0.9488	27.02	18.59
Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm)	0.9960	0.9316	26.97	19.18
HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm)	0.996	0.917	28.18	18.92
AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm)	0.990	0.852	27.06	20.54
HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm)	0.994	0.957	24.00	18.51
AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm)	0.994	0.967	30.33	19.89
Phe (2 cm) + HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm)	0.997	0.936	26.35	17.09

Tabla 11.1 (continuación).

Permutaciones ^a	Pureza de pico ^b		Tiempo de análisis ^c	
	P_{\max}	$t = 14 \text{ min}$	t_{\max}	$P = 0.97$
Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm)*	0.997	0.958	26.70	14.47
HL (3 cm) + Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + AQ (2 cm)	0.995	0.965	28.11	17.15
AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + HL (3 cm)	0.995	0.951	27.12	18.86
HL (3 cm) + AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm)	0.997	0.926	28.85	19.06
AQ (2 cm) + HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm) + Phe (2 cm)	0.991	0.904	27.25	20.39
Phe (2 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm)	0.996	0.961	28.32	18.05
Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm)*	0.997	0.972	28.35	14.35
HL (3 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + C ₁₈ (5 cm)	0.996	0.948	28.95	15.75
AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm) + C ₁₈ (5 cm)	0.989	0.958	26.86	19.21
HL (3 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm)	0.995	0.954	28.37	19.39
AQ (2 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm) + C ₁₈ (5 cm)	0.992	0.966	29.34	20.75

^a C₁₈: ACE C₁₈; Phe: ACE Phenyl; HL: ACE C₁₈-HL; AQ: ACE C₁₈-AQ.

^b Pureza de pico global más elevada (valor superior del frente Pareto) y pureza de pico máxima para un tiempo de análisis de 14 min. ^c Tiempo de análisis para el valor de pureza más elevado y para $P = 0.97$.

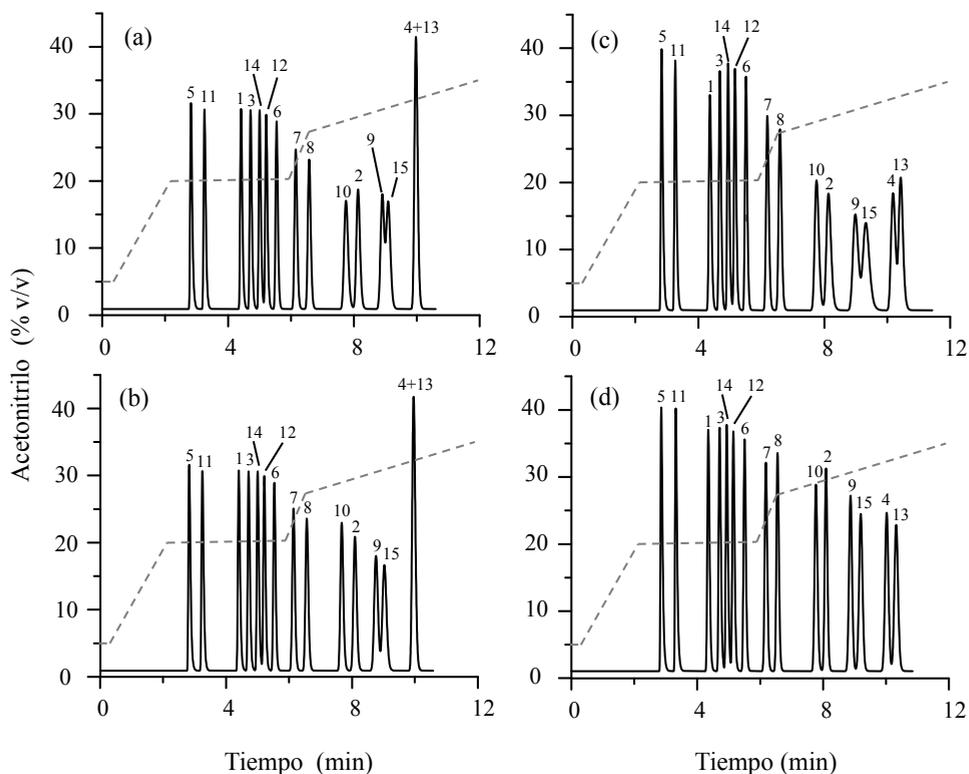


Figura 11.4. Influencia del orden de las columnas para un gradiente multi-lineal pre-seleccionado (5.0–19.3% de acetonitrilo en 1.3 min, 20.2% en 5.0 min, 28.5% de acetonitrilo en 5.6 min, y 45.0% en 20.0 min). Orden de la combinación de columnas (se proporciona la resolución global): (a) ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE fenilo (2 cm) ($P = 0.084$), (b) ACE C₁₈ (5 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) ($P = 0.105$), (c) ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈ (5 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) ($P = 0.698$), (d) ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈ (5 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) ($P = 0.957$). Otros detalles se ofrecen en la Figura 11.2.

b) Selección de los mejores gradientes multi-lineales

Los gradientes multi-lineales reducen de forma más eficaz el tiempo de análisis que los gradientes lineales simples, ya que pueden adaptarse en cierta medida a los requisitos particulares de los grupos de solutos que eluyen a tiempos próximos. Sin embargo, la predicción de los mejores gradientes es apreciablemente más compleja. En este trabajo, para predecir los gradientes multi-lineales, se utilizó el mismo sistema de predicción descrito en el Capítulo 10 para gradientes lineales simples. Las condiciones óptimas se buscaron también considerando ambos resolución y tiempo de análisis, con la asistencia de gráficos de Pareto.

Los gradientes multi-lineales implican un mayor número de parámetros, y en consecuencia, el número de soluciones que deben analizarse es significativamente mayor, incluso si sólo se optimizan las coordenadas de los nodos, como en este trabajo. Por lo tanto, en lugar de una búsqueda exhaustiva, se llevó a cabo una optimización de GAs (véase la sección 11.4.4). Esta estrategia se utilizó también para la optimización de los gradientes lineales simples, pero con los gradientes multi-lineales es aún más necesaria.

Aquí debe resaltarse que, a través de las operaciones genéticas, sólo se optimiza la resolución (y no el tiempo), puesto que no nos interesa la solución final del GA (ya que tendría un tiempo de análisis excesivo), sino las soluciones encontradas a lo largo del proceso (es decir, la población acumulada o histórica), que son los datos representados en la Figura 11.5. En otras palabras, no se optimiza activamente la resolución y el tiempo de análisis en base al concepto de optimalidad de Pareto, sino tan sólo la resolución para generar un conjunto de poblaciones históricas.

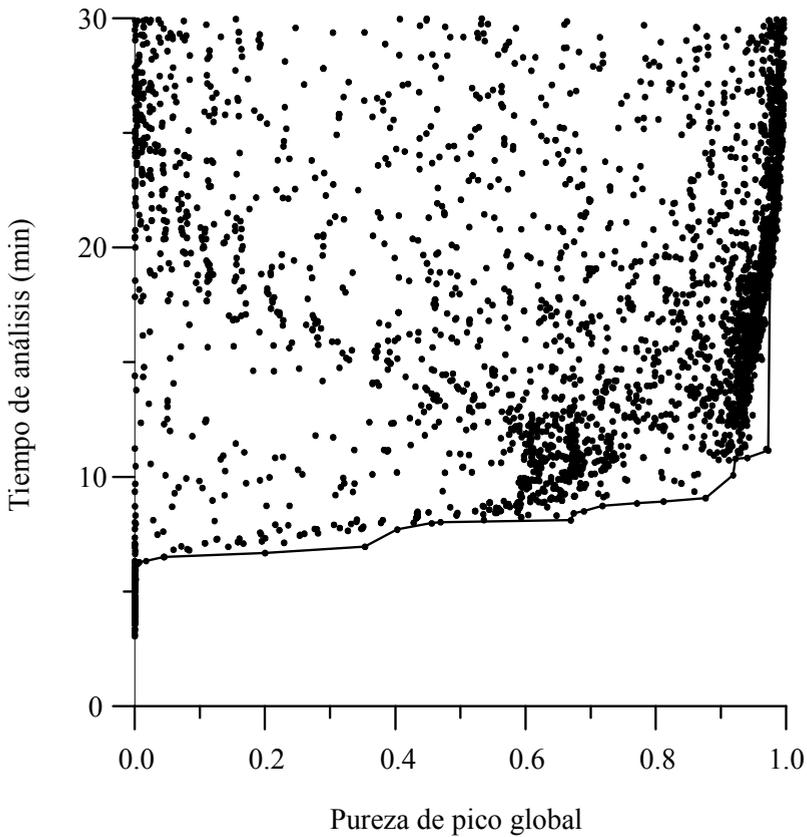


Figura 11.5. Gráfico de Pareto donde se representan todas las soluciones históricas encontradas tras realizar una búsqueda mediante GAs, en la optimización de un gradiente multi-lineal con tres nodos, utilizando la Combinación II. El frente de Pareto se señala con una línea delgada. Véanse también las Figuras 11.6c y d, que corresponden a la misma optimización.

Una vez que el GA ha convergido, la población histórica se procesa para encontrar el frente de Pareto (obsérvese en el diagrama obtenido que este tipo de búsqueda concentra la exploración de los gradientes en el límite de la representación de Pareto). Por lo tanto, la solución final no es la que se

encuentra mediante la aplicación del GA (una vez que se pierde toda la diversidad), sino una de las soluciones tal vez descartada en las generaciones anteriores, que es seleccionada de acuerdo a los principios de Pareto al final del proceso. El algoritmo debe estar configurado de tal forma que la diversidad se pierda gradualmente para mantener una capacidad de exploración elevada, a lo largo del proceso.

En la búsqueda mediante GAs, las sucesivas poblaciones tienden a mejorar la exploración de los conjuntos de factores en el dominio experimental en el que la resolución es cada vez más elevada. Las poblaciones iniciales del proceso se distribuyen en todo el dominio experimental, y sólo unas pocas soluciones (o tal vez ninguna) se sitúan cerca del frente de Pareto final. Al sucederse las generaciones, el número de soluciones con buena resolución aumenta, algunas de ellas correspondiendo a tiempos de análisis largos y otras a tiempos relativamente más cortos. Dado que sólo se atiende a la resolución, este tipo de búsqueda favorece las soluciones lentas. Por lo tanto, al principio y al final de la búsqueda, no se encuentran soluciones interesantes: al principio la resolución es pobre, y al final, el tiempo de análisis es demasiado largo, aunque la resolución es mejor. Sin embargo, cuando todas las poblaciones históricas de soluciones se contemplan en conjunto, algunas soluciones ofrecen el rendimiento que estábamos buscando.

Se obtiene un gráfico de Pareto diferente dependiendo de la combinación de columnas elegida y del número de nodos asumidos en el gradiente. Además, cada vez que la secuencia de búsqueda se ejecuta, se obtiene un conjunto de soluciones diferente, ya que la búsqueda es probabilística. Sin embargo, utilizando el protocolo descrito en el apartado 11.4.4, se ha comprobado que

los frentes de Pareto obtenidos a partir de GAs independientes son similares en la resolución de un mismo problema.

La Figura 11.6 compara los resultados obtenidos con una de las mejores permutaciones de la Combinación II (ver Figura 11.3a y la Tabla 11.1), utilizando un gradiente lineal simple (Figuras 11.6a y b), y un gradiente multi-lineal de tres nodos (Figuras 11.6c y d). El rendimiento en cada caso puede ser evaluado con los gráficos de Pareto correspondientes (Figuras 11.6a y c), donde se pueden observar varias soluciones que ofrecen una resolución global $P > 0.95$. Las soluciones seleccionadas, en ambos casos, cumplen esta condición a los tiempos de análisis más cortos. Como se observa, el gradiente multi-lineal ofrece una buena resolución: $P = 0.967$ con un tiempo de análisis de tan sólo ~ 10.5 min. Este resultado mejora la solución obtenida con el gradiente lineal simple óptimo ($P = 0.948$ en 12.2 min), en relación a ambos resolución y tiempo de análisis.

Sin embargo, el rendimiento obtenido dependerá de la combinación de columnas seleccionada. Esta selección posee un cierto grado de subjetividad, ya que el analista puede elegir una de varias combinaciones posibles (Figura 11.3a). Sin embargo, el rendimiento es razonablemente bueno para diversas combinaciones. Así, las mejores permutaciones de las Combinaciones I y III también ofrecen un buen rendimiento para gradientes multi-lineales (Figuras 11.7a y b, y Figuras 11.7c y d, respectivamente). Los cromatogramas para estas combinaciones de columnas deben compararse con los de las Figura 11.6b y d para la Combinación II.

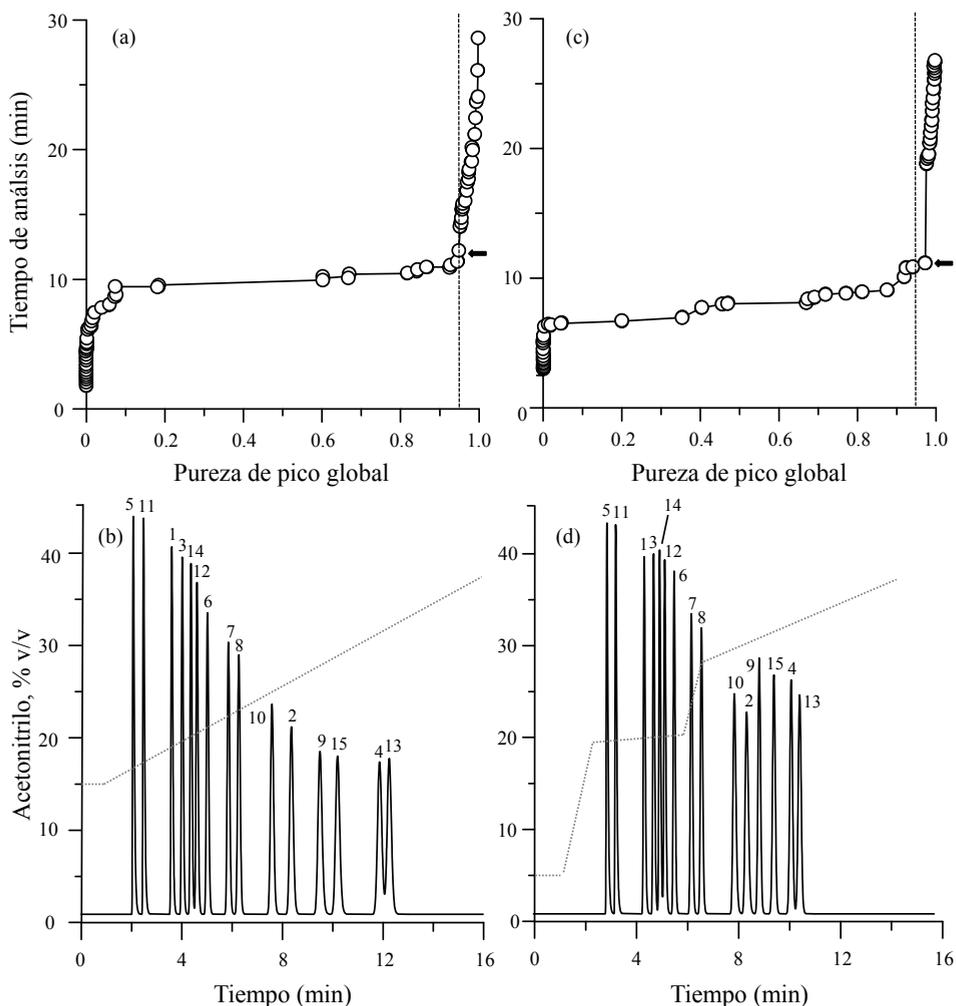


Figura 11.6. Gráficos de Pareto (a,c), y cromatogramas óptimos (b,d) obtenidos en elución en gradiente para la Combinación II, utilizando la permutación óptima, ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈ (5 cm): (a, b) Gradiente lineal simple (15.0–43.0% de acetonitrilo en 20.0 min, $P = 0.948$), y (c,d) gradiente multi-lineal (5.0–19.3% de acetonitrilo en 1.3 min, 20.2% en 5.0 min, 28.5 % en 5.6 min, y 45.0% en 20.0 min, $P = 0.967$). Las flechas en (a) y (c) indican la resolución y el tiempo de análisis de los cromatogramas representados en (b) y (d). Otros detalles se ofrecen en la Figura 11.2.

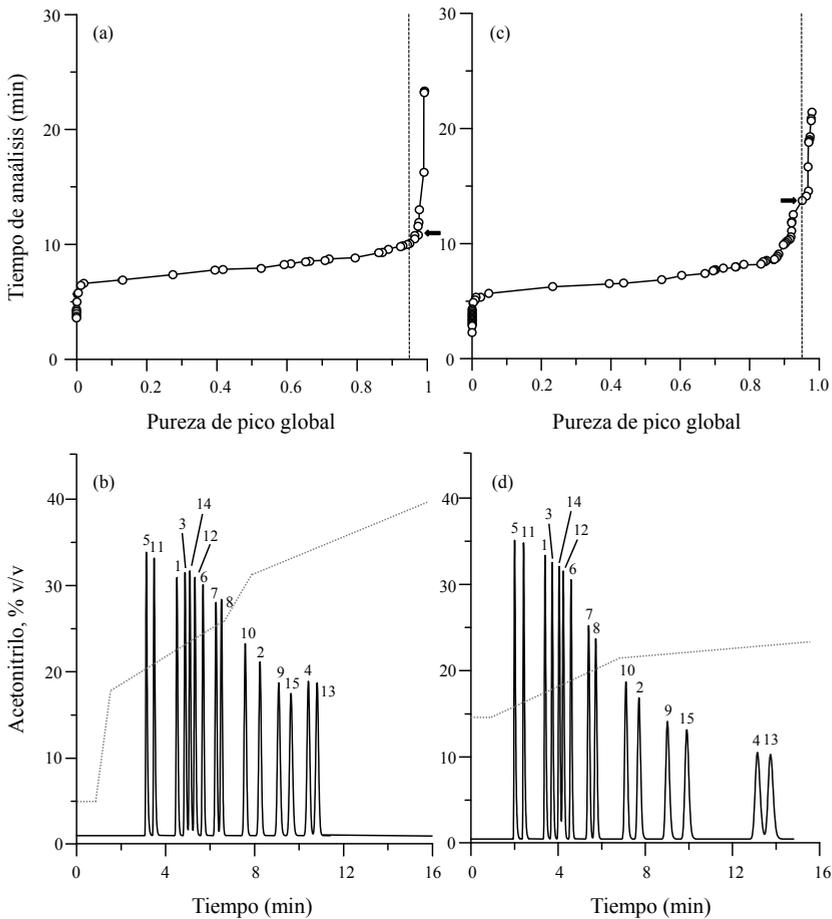


Figura 11.7. Gráficos de Pareto (a,c), y cromatogramas óptimos (b,d) para combinaciones de columnas pre-seleccionadas, utilizando un gradiente multi-lineal y la permutación de columnas óptima: (a,b) Combinación I: ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈ (7 cm) (5.0–17.9% de acetonitrilo en 0.6 min, 26.0% en 5.7 min, 31.5% en 7.0 min, y 45.0% en 20.0 min, $P = 0.972$), y (d) Combinación III: ACE C₁₈-AQ (2 cm) + ACE C₁₈-HL (2 cm) + ACE C₁₈ (5 cm) (14.6–21.4% de acetonitrilo en 5.9 min, 23.6% en 15.9 min y 45.0% en 20.0 min, $P = 0.951$). Las flechas en (a) y (c) indican la resolución y el tiempo de análisis de las condiciones utilizadas para obtener los cromatogramas representados en (b) y (d). Otros detalles se ofrecen en la Figura 11.2.

c) Fiabilidad de las predicciones

Se puede pensar que la complejidad del algoritmo matemático (e incluso del propio acoplamiento de columnas) puede conducir a predicciones pobres de los cromatogramas para las condiciones seleccionadas. Sin embargo, se ha comprobado la alta fiabilidad del método. La Figura 11.8 ilustra la gran exactitud de las predicciones para la Combinación II, utilizando dos gradientes diferentes (Figuras 11.8a y b, para el primero, y Figuras 11.8c y d, para el segundo). En las Figuras 11.9a y b, se puede comprobar la exactitud de otra combinación de columnas (ACE C₁₈ (7 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (5 cm)), utilizando otro gradiente multi-lineal. La concordancia entre los cromatogramas experimentales y predichos es de nuevo excelente. El nivel de exactitud es similar al que se logra con una sola columna (ACE C₁₈ (9 cm)), utilizando un único gradiente lineal, que es una situación mucho más simple (Figuras 11.9c y d).

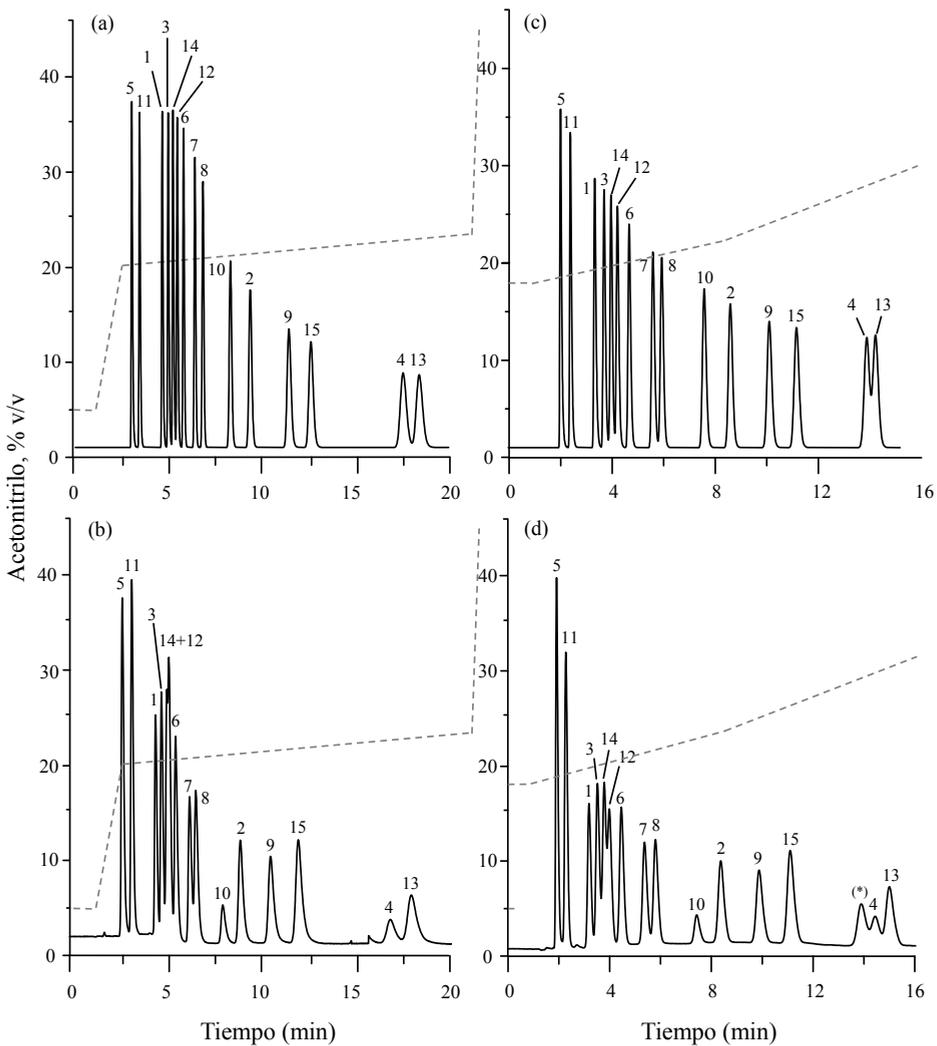


Figura 11.8. Cromatogramas predichos (a,c), y experimentales (b,d) para la mezcla de 15 sulfonamidas, utilizando un gradiente multi-lineal y la combinación ACE C₁₈ (5 cm) + ACE fenilo (2 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + ACE C₁₈-AQ (2 cm). Gradientes: (a,b) 5.0–20.1% de acetonitrilo en 1.6 min, 21.7% en 19.6 min y 45.0% en 20.0 min ($P = 0.962$), y (c,d) 17.0–22.5% de acetonitrilo en 7.5 min, y 30.0% en 15.0–20.0 min ($P = 0.774$). Otros detalles se ofrecen en la Figura 11.2. El pico (*) pertenece a un producto de degradación.

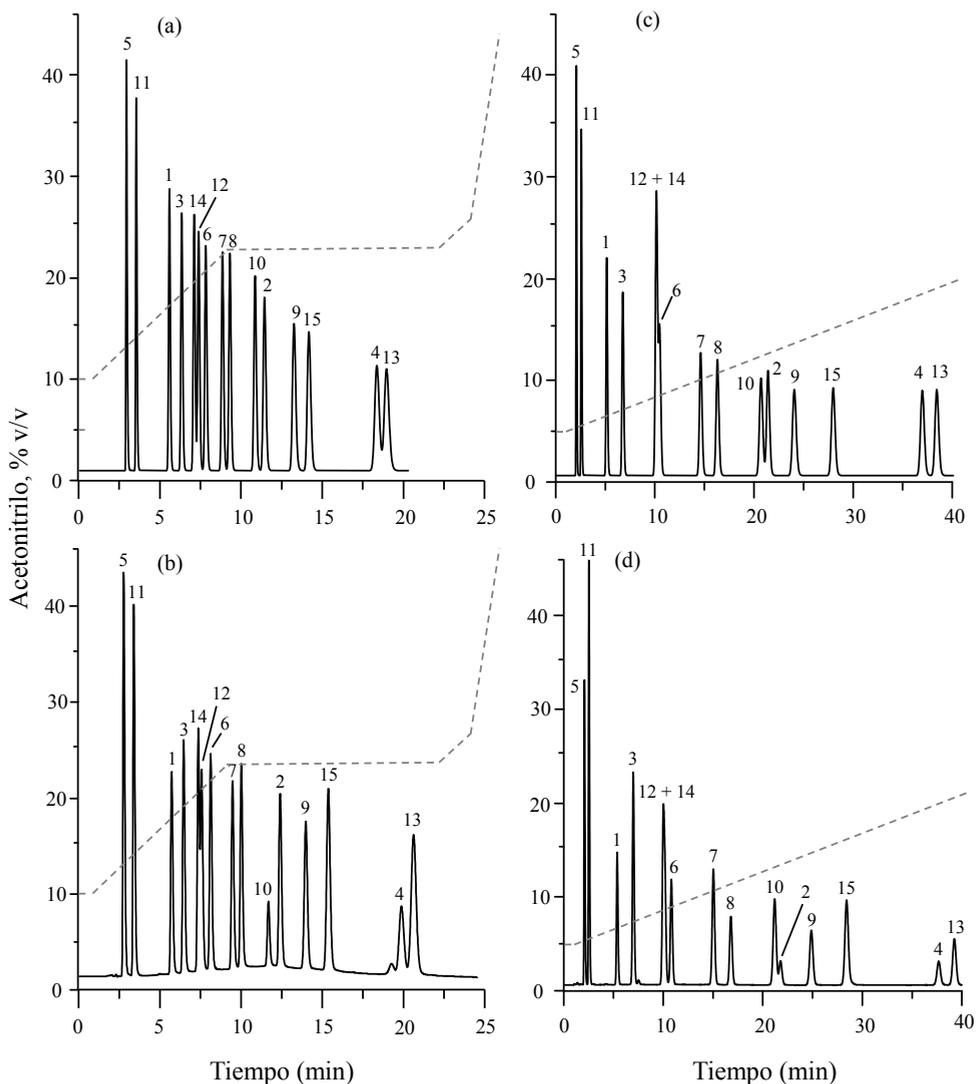


Figura 11.9. Cromatogramas predichos (a,c), y experimentales (b,d) de la mezcla de 15 sulfonamidas, utilizando: (a,b) la combinación ACE C₁₈ (7 cm) + ACE C₁₈-HL (3 cm) + C₁₈ ACE AQ (5 cm) y un gradiente multi-lineal de 10.0–23.5% de acetonitrilo en 21.3 min, 26.6% en 23.2 min, y 45.0% en 25.0 min ($P = 0.888$), y (c,d) una columna ACE C₁₈ de 9 cm aislada y un gradiente lineal simple de 5.0–45.5% de acetonitrilo en 101.2 min. Otros detalles se ofrecen en la Figura 11.2.

11.6. Conclusiones

El acoplamiento en serie de fases estacionarias se puede implementar fácilmente utilizando columnas cortas convencionales unidas a través de acopladores ZDV, que se enroscan directamente a las columnas sin la necesidad de utilizar carcasas externas. Pueden utilizarse columnas ya existentes (o de nueva fabricación) disponibles en el mercado. El inconveniente que supone el empleo de una composición fija de fase móvil o de un gradiente fijo, es la necesidad de disponer columnas de múltiples longitudes para lograr una extensa gama de combinaciones de columnas, entre las que se selecciona la mejor. Además, en este caso, es posible que las condiciones seleccionadas no conduzcan a los resultados óptimos.

Un enfoque significativamente más potente y competitivo, en elución isocrática, optimiza simultáneamente la composición de la fase móvil, junto con la naturaleza y la longitud de las columnas acopladas. El protocolo de optimización es más complejo. Sin embargo, posee la ventaja de permitir el ajuste de la selectividad con la ayuda del contenido de disolvente orgánico, que es una variable continua.

Al utilizar gradientes, el número de parámetros a optimizar se incrementa: las composiciones inicial y final del eluyente, y la pendiente del gradiente para gradientes lineales simples, y al menos las coordenadas de los nodos para gradientes multi-lineales, junto con la naturaleza y la longitud de las columnas acopladas. El elevado número de parámetros haría inviable la optimización de las columnas acopladas. La búsqueda se reduce significativamente si la combinación de columnas se selecciona previamente, sobre la base de las condiciones óptimas en la separación isocrática, en combinación con la

aplicación de un GA, que explora de manera más eficiente el espacio de búsqueda.

Una cuestión importante de cara a la utilidad y fiabilidad de las columnas acopladas en serie, ya sea en elución isocrática o en gradiente, es la optimización rigurosa de los parámetros involucrados. El sistema de predicción debe incluir una modelización fiable del comportamiento de retención para cada compuesto de la muestra, en función del contenido de disolvente (u otros factores experimentales seleccionados), y un sistema para predecir los perfiles de pico (anchura y asimetría). La predicción del tiempo de retención y del perfil de pico para las combinaciones de columnas se logra finalmente mediante la combinación de las predicciones obtenidas para cada columna individual. En este capítulo, se explora el potencial del método, y se comprueba cómo es capaz de tener éxito a distintos niveles: columnas individuales y combinadas mediante elución isocrática y en gradiente. El algoritmo también es útil cuando se incluyen etapas isocráticas en el gradiente multi-lineal, y etapas lineales con pendientes pequeñas.

Para este estudio, se tomó la decisión de inspeccionar incrementos de un cm para todas las columnas, con el objetivo de explorar con gran detalle en qué medida la resolución podría mejorarse. En nuestro laboratorio, por razones económicas, estamos más limitados a un menor número de longitudes para cada columna. Pero, naturalmente, la investigación puede centrarse sólo en las columnas disponibles. El problema de separación presentado y las columnas utilizadas para este trabajo evidencian los buenos resultados obtenidos con el método y programa desarrollados, pero se obtendrán resultados similares o incluso más atractivos con otros grupos de compuestos, o columnas de ACE o de otros fabricantes.

11.7. Referencias

- [1] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Simultaneous optimization of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially coupled columns*, J. Chromatogr. A 1317 (2013) 39–48.
- [2] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, *Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the "PRISMA" principle*, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 122–130.
- [3] K. Chen, F. Lynen, T. Szucs, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography with conventional columns*, Analyst 138 (2013) 2914–2923.
- [4] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *Comparison of two serially coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures*, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 94–105.
- [5] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Stationary-phase optimized selectivity liquid chromatography: Development of a linear gradient prediction algorithm*, Anal. Chem. 82 (2010) 1733–1743.
- [6] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Selectivity optimization in green chromatography by gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7222–7230.
- [7] C. Ortiz Bolsico, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns. Part I: Single linear gradients*, J. Chromatogr. A 1350 (2014) 51–60.
- [8] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.

- [9] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Some insights on the description of gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Sep. Sc.* 37 (2014) 2269–2277.
- [10] J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, *DryLab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution*, *J. Chromatogr.* 485 (1989) 91–112.
- [11] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, *Optimisation technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 283–289.
- [12] V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 79–88.
- [13] L. Davis, *A Genetic Algorithms Tutorial*, in: *Handbook of Genetic Algorithms*, (editado por L. Davis), Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 1991, págs. 1–101.
- [14] A.K. Smilde, A. Knevelman, P.M.J. Coenegracht, *Introduction of multi-criteria decision making in optimization procedures for high-performance liquid chromatographic separations*, *J. Chromatogr.* 369 (1986) 1–10.

GENERAL CONCLUSIONS

In the next pages, the general conclusions from each chapter of this PhD. Project are outlined, classified in three sections:

- Fundamental studies in reversed-phase liquid chromatography (RPLC)
- Secondary equilibria in RPLC
- Optimisation of serially-coupled columns in RPLC

C.1. Fundamental studies in RPLC

C.1.1. Modelling of peak retention and profile in RPLC

- Gradient elution is often required in RPLC to achieve practical retention times. To evaluate the resolution of complex samples and achieve reliable optimal experimental conditions, both the retention time and width (or half-widths) of chromatographic peaks should be predicted with high accuracy. In this work, alternative methods are proposed for modelling the retention when linear gradients are used. The description of the peak profiles in isocratic and gradient elution is also discussed.
- Despite the wide use of the logarithmic linear model to predict the retention in RPLC using linear gradients, at least other three models (the quadratic model, a model proposed by Jandera *et al.* for normal liquid chromatography, and the polarity model proposed by Bosch and Rosés) offer higher accuracy, especially for wide ranges of organic solvent content. Among these, the most familiar is the logarithmic quadratic model, which is widely used in isocratic elution. However, its analytical integration to describe gradients is not easy. For this reason, a semi-empirical integration algorithm was proposed, based on the

similarities of the linear and quadratic trends, which provided prediction errors similar to those obtained in isocratic elution.

- A global equation is demonstrated to allow the prediction of the profiles of chromatographic peaks in the two elution modes (isocratic and gradient) with low errors. Also, the peak profile of a set of compounds that show similar kinetics with a given column is described by the same equation. This behaviour contrasts with the need of a specific equation for each compound to describe the retention behaviour.
- The expected range of retention times and peak profile in gradient elution is visualised by plotting the logarithm of the retention factor versus the initial concentration of the organic modifier (similarly to the logarithmic plots of retention factor versus the concentration of organic modifier in isocratic elution), and the half-widths or widths *versus* the gradient time (the retention time in isocratic elution). The diagrams summarise all possible behaviours that can be found for a solute or groups of solutes eluted from a particular column, depicting irregular triangles.
- Each solute is associated to a particular "elution triangle", whose wider region corresponds to the smallest concentrations of organic modifier: the higher the solute retention, the wider the triangle. In contrast, when the solutes in a mixture exhibit similar kinetics, a common triangle ("peak width triangle") describes the behaviour of all solutes. However, for solutes with particular kinetics, specific diagrams should be drawn for each solute.

C.1.2. Development of new algorithms to describe chromatographic peaks based on modified Gaussian models

- There is a need for the development of practical models to predict chromatographic peaks within a wide range of asymmetry for optimisation purposes, where the model parameters depend on easily measurable properties, as is the case of the peak half-widths and the retention time. The developments in this work are based on models of diverse complexity: the pure Gaussian model, the polynomially-modified Gaussian model with linear standard deviation, the parabolic-Lorentzian Gaussian model (PLMG), and the modified Gaussian model with parabolic variance (PVMG).
- Polynomially-modified Gaussian models interpret the deviations from the ideal behaviour as a change in the standard deviation with time. This approach has proved high accuracy in the fitting of peaks with large frontal and tail deviations. However, it has the disadvantage of an uncontrolled growth of the predicted signal outside the elution region.
- The PLMG model solves this problem, by combining a parabola that describes the change of the variance in the peak region, and a Lorentzian that reduces the growth of the variance outside the peak. However, it has the disadvantage of its excessive flexibility, which hinders the optimisation process when the initial values for the model parameters are far from the optimal ones.

- The PVMG model is a simplified model, where the Lorentzian dependence has been suppressed. This model is useful when the peaks have moderate asymmetry. The model fits accurately the apex of most chromatographic peaks (above approximately 60% height).
- The accuracy of the new approaches was checked using experimental peaks obtained in isocratic and gradient elution with different columns, mobile phase compositions, temperatures, flow rates and pH values, with a variety of behaviours (i.e., efficiencies and asymmetries in a wide range). The results were highly satisfactory, especially for those based on the PLMG and PVMG models.
- Particularly interesting are the proposed methodologies based on the PLMG model, which makes use of the half-widths at 60.65% and 10% peak height, or only above 10% peak height. The former methodology yielded the best results, since it allows a proper description of both the upper and lower peak regions.
- The proposals in this work improve the fitting ability of the PLMG model and will allow obtaining more reliable peak properties, such as the peak area or statistical moments of different degrees, as well as improved results in the deconvolution of chromatographic peaks.
- It should be finally indicated that the provided guidelines to fit and predict a variety of peaks in different situations can be useful in other scientific fields.

C.2. Secondary equilibria in RPLC

Several studies were performed on the modification of the chromatographic behaviour in RPLC using several additives: the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) and the non-ionic surfactant Brij-35 in the so-called micellar liquid chromatography (MLC), the amines triethylamine and dimethyloctylamine, and several ionic liquids derived from imidazolium.

C.2.1. Implementation of organic solvent gradients in micellar liquid chromatography using Drylab®: Separation of basic compounds in urine samples

- In MLC, the chromatographic peaks are usually distributed more evenly in the time domain, with regard to the classical RPLC. This makes gradient elution often unnecessary. However, gradient elution in MLC may be useful to elute mixtures of compounds exhibiting a wide range of polarities to reduce the analysis time. Also, it can benefit the determination of compounds of moderate or low polarity in physiological fluids when the direct injection into the chromatograph is performed. The study provides guidelines to work in MLC using the gradient mode and is aimed to encourage analysts to develop their own applications.
- The surfactant micelles present in the mobile phase protect the chromatographic column from protein precipitation in the physiological fluids. The protection is larger with mobile phases without organic solvent. Therefore, the direct injection of the physiological sample (in this work, urine) is proposed to be carried out in a purely micellar

medium (without organic solvent), and once the proteins have been swept off the column, the elution strength is increased with a positive linear gradient of organic solvent. The approach was successful in the analysis of samples containing β -blockers.

- Surprisingly, among the hundreds of analytical procedures published in MLC where different types of compounds are determined in a wide variety of samples, only very few employed gradient elution. However, as demonstrated in this work, implementing a gradient method in MLC is simple and gives rise to rapid methods that do not need previous treatment of the samples, nor column re-equilibration.
- In a pioneering report by Madamba *et al.* on the use of gradients in MLC using a Nucleosil C18 column, published 20 years ago, the significant decrease in the re-equilibration time (7.5 min in that report) was highlighted. In the study carried out for this work using a Zorbax Eclipse XDB-C8 column, the re-equilibration amounted only 2 min.
- Despite the presence of surfactant, the optimisation of gradients of organic solvent was satisfactorily carried out with the commercial software DryLab®, which had not been previously used in MLC.
- MLC with hybrid mobile phases has the advantage over conventional RPLC of using significantly smaller amounts of organic solvent, particularly in the analysis of non-polar compounds. This is translated into lower toxicity and environmental impact, due to the reduction in the amount of polluting wastes. Moreover, the stabilisation of organic solvents with micelles in the mobile phase reduces the risk of evaporation. These properties are attractive given the increasing restriction in the use of organic solvents in the laboratories. For this and

other reasons, we think that the proposed methodology will have a large impact for the analysis of physiological samples.

C.2.2. Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate on a C₁₈ stationary phase under micellar and submicellar conditions in RPLC

- In MLC, surfactant monomers added to the mobile phase aggregate to form micelles, but are also significantly adsorbed on the surface of the non-polar stationary phases changing their nature. Adequate efficiencies frequently require the presence of organic solvent in the micellar mobile phase. However, if this contains a high concentration of organic solvent, the micelles are not formed and the amount of surfactant adsorbed on the stationary phase is reduced, giving rise to another chromatographic mode called high submicellar liquid chromatography (HSLC).
- In HSLC, the presence of a thinner layer of surfactant modifies the selectivity of the stationary phase and improves the peak shape. However, there is some concern about the complete desorption of the surfactant by the addition of large amounts of organic solvent, which would produce a chromatographic mode close to the classical RPLC.
- Therefore, SDS adsorption on a C₁₈ stationary phase was examined under MLC and HSLC conditions (i.e., micellar and submicellar), applying two different methodologies: frontal chromatography using a refractive index detector, and monitoring the properties of chromatographic peaks for a set of basic compounds.

- Frontal chromatography provides a direct measurement of the amount of surfactant adsorbed on the stationary phase. However, the technique was only successful for concentrations below 30% acetonitrile. For higher concentrations, the saturation of the detector did not allow proper measurements.
- Meanwhile, the measurement of chromatographic parameters (retention times and peak half-widths) for basic compounds indirectly evidenced the existence of adsorbed surfactant, constituting an interesting alternative. The method can also be used to check the adsorption of other additives (as ionic liquids) on the stationary phase. The observed effects are produced by the inaccessibility of protonated basic compounds to the free silanols, protected by the surfactant layer covering the stationary phase.
- The study showed that the C18 stationary phase was still covered by SDS at the maximal assayed acetonitrile concentration (60%).

C.2.3. Micellar liquid chromatography using Brij-35 in isocratic and gradient elution

- The use of non-ionic surfactants in MLC is an almost unexplored field, which has focused primarily on the use of polyoxyethylene(23)lauryl ether (known as Brij-35), using isocratic elution. When Brij-35 is added to the mobile phase in RPLC, its alkyl chain is associated to the alkyl- bonded chain in the stationary phase, and its polar hydrophilic end is oriented away from the surface, increasing the stationary phase polarity which remains neutral. In order to increase the knowledge on

the use of Brij-35 in MLC, several studies were carried out with purely micellar mobile phases and hybrid mobile phases containing Brij-35 and acetonitrile, using three sets of probe compounds (β -blockers, sulphonamides and flavonoids).

- In comparison to a non-modified C₁₈ column, the analysis times with Brij-35 are globally smaller due to the lower polarity of the modified surface. However, longer retention is obtained when the hydroxyl group of the oxyethylene chain interacts with the eluted solutes through hydrogen bonding, as is the case of sulphonamides, and especially flavonoids. The latter solutes were found to interact strongly with the stationary phase.
- Several diagrams that depict the trends in the chromatographic behaviour (retention and peak shape) are shown, which give more clear descriptions on the behaviour than the direct observation of the chromatograms. These diagrams allowed a comprehensive study of MLC using Brij-35 in both isocratic and gradient elution.
- In isocratic elution, purely micellar mobile phases of Brij-35 decrease the retention times when the concentration of surfactant increases, but the peaks are significantly wider. For hybrid mobile phases, the retention also decreased when the concentration of organic solvent increased, but the peak performance was significantly improved, especially for flavonoids.
- To our knowledge, there is no previous report on the use of gradient elution in MLC with Brij-35. This surfactant allows implementing different types of gradients: (i) Gradients of Brij-35 in the absence or

presence of a fixed amount of organic solvent, (ii) gradients of organic solvent keeping constant the concentration of Brij-35, and (iii) double gradients of Brij-35 and organic solvent where their concentrations change in the same or opposite directions. In all instances, peak widths were appreciably smaller, compared to the isocratic mode, being the peaks obtained with gradients of organic solvent and fixed concentration of Brij-35 strikingly narrow.

- The studies performed in this work suggest two interesting working strategies in MLC with Brij-35: the use of purely micellar eluents in both isocratic and gradient modes, which represents a modality of "green chromatography" (chromatography with water and detergent), and the use of gradients of organic solvent in the presence of a fixed concentration of Brij-35. The possibility of using purely micellar mobile phases of Brij-35, for a range of compounds, contrasts with the use of SDS in MLC, which usually requires the addition of an organic solvent.

C.2.4. Comparative study of several imidazolium ionic liquids as additives in RPLC for the determination of basic compounds

- In the absence of additives, basic compounds protonated at acidic pH originate wide and asymmetrical peaks in RPLC, due to ionic interaction of the cationic solutes with the residual silanols on the silica-based stationary phases. In recent years, there has been an intense research on the use of several kinds of ionic liquids as additives in the mobile phase to block the silanol activity. These compounds have a dual character: a cation associated to an anion, both exhibiting affinity for the stationary

phase. This gives rise to a positive or negative layer, whose charge depends on the relative adsorption of both ions.

- The effect of six ionic liquids derived of 3-methylimidazolium with 1-ethyl, 1-butyl and 1-hexyl as substituents, associated to chloride, tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions, were studied, using a group of 10 β -blockers as probe compounds. The results were compared with those provided with triethylamine and dimethyloctylamine. The study complements other research previously developed in our laboratory, and allowed an insight in the behaviour of ionic liquids as suppressors of the silanol effect.
- The most effective ionic liquids (those that produce small broadening of chromatographic peaks, combined with smaller retention) are those containing a bulky imidazolium ion in combination with a weakly adsorbed anion. Among the compounds studied, 1-hexyl-3-imidazolium associated to tetrafluoroborate and chloride showed the most interesting features.
- Usually, in the literature, the ability of ionic liquids to block silanols has been compared with that of triethylamine. In that research, the effect of the additives on the retention (instead of the peak profiles) were mainly studied. This has led to the wrong conclusion of the superiority of ionic liquids compared to amines. Our work has revealed that the ability to decrease the retention depends on the volume of the cation of the additive (ionic liquid or amine). Thus, the behaviour of triethylamine is similar to that of 1-ethyl-3-imidazolium chloride (with a small effect on the retention), whereas the behaviour of dimethyloctylamine is similar to

that of 1-hexyl-3-imidazolium chloride (with a large effect on the retention).

- It seems that the appeal of ionic liquids compared to amines should be emphasised in terms of environmental impact, recovery of the initial stationary phase, and ability to establish specific interactions with the solutes, and not in terms of the effects on the retention and shape of chromatographic peaks. Still, a comprehensive study of amines with diverse structure is required to determine their usefulness as additives in RPLC, using the guidelines established in this work.
- The estimation of the suppression of the silanol effect by ionic liquids and amines, based on the changes in retention times is shown to be not accurate. The observed changes are not only indicating the masking interaction of silanols, but also the electrostatic interaction of protonated basic compounds with the cation and anion of the additives in both stationary and mobile phases. Instead, the suppression of the silanol effect should be evaluated by measuring the peak shape parameters (width and asymmetry, or related parameters). For this purpose, the representation of half-width plots *versus* the retention time is a good option.

C.3. Optimisation of serially-coupled columns in RPLC

Although a large number of stationary phases with different selectivity have been marketed, the optimisation of the column nature is rarely carried out during method development. The usual practice is to select, first, the stationary phase by trial and error, based on the expected interactions, previous experience or literature recommendations. Usually, continuous factors, such as the mobile phase composition, pH or temperature, are optimised. In this section, the interest of optimising the stationary phase by the serial combination of columns of different nature and length is shown. With comparative purposes, all studies were conducted with the same set of compounds (15 sulphonamides).

C.3.1. Comparison of two serially-coupled column systems and optimisation software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures

- The classical strategy in HPLC that employs a single chromatographic column and optimises the mobile phase composition to resolve a mixture of compounds is often unsuccessful. The capability of columns coupled in series is here demonstrated as a simple strategy that increases enormously the range of selectivity, providing excellent separations for complex problems.
- The basic theory for the serially coupling of columns is quite simple, but its implementation can be very problematic from the technical point of view: the connection of the columns in series should ideally not change the sum of the behaviours of the individual columns.

- Initially, the POPLink system marketed by Bischoff Chromatography was used. This makes use of PEEK holders to connect stainless steel segments of several lengths of similar or different nature directly to each other. However, the robustness of this system was found very poor and its handling difficult, resulting in deficiencies in the prediction of retention times, due to the presence of significant dead volume in the connections between columns.
- An alternative system is proposed in this work with successful results, consisting of the connection of conventional chromatographic columns through zero dead volume fingertight couplers, which are screwed directly to the columns. This is a universal system that has the advantage of allowing the connection of columns from different manufacturers. Note that the PopLink approach needs dedicated columns. A detailed comparative study of the two systems has shown the superiority of the new system.
- The behaviour of five columns of different nature was compared for both the PopLink and fingertight couplers-based systems. No single column was able to resolve completely the mixture of 15 sulphonamides. However, the coupling of 3 or 4 columns succeeded in getting full resolution, especially with the new system.
- The optimisation of the combined columns only required modelling the retention and peak profile for a column with an arbitrarily selected length (the so-called reference column).
- The POPLink system was developed to optimise only the nature and length of the coupled columns (i.e., the composition of the mobile phase was fixed). For a fair comparison, initially the new system was

optimised similarly. It should be noted that the prediction system considers both the retention and profile of the chromatographic peaks, giving rise to highly reliable predictions, with retention errors usually below 1%.

C.3.2. Simultaneous optimisation of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially-coupled columns

- The effect of the composition of the mobile phase has a significant impact on the separation performance, and in addition, it can be finely tuned. As demonstrated, the performance of the serially-coupled columns depends on the composition of the mobile phase, so this factor was decided to be incorporated in the optimisation. It should be indicated that there was no previous report on such type of optimisation.
- Initially, a strategy was developed to optimise the nature and length of the chromatographic columns together with the mobile phase composition in isocratic elution, considering both retention and profile of the chromatographic peaks. The strategy leads unambiguously to the best separation conditions and optimises the selectivity with high accuracy, increasing the chromatographic resolution. In addition, it offers the interesting advantage of a reduction in the analysis time with regard to the separations with the single columns. The results are closer to those offered by two-dimensional liquid chromatography in terms of resolution and to gradient elution in terms of analysis time, using a simpler and more accessible instrumentation.

- The dimensionality of the search space for the serially-coupled columns makes a conventional representation of the results using resolution maps unfeasible. Instead, Pareto plots were used to balance resolution and analysis time, which are opposite response functions.
- In spite of the apparent complexity of the methodology with regard to the single column optimisation, an outstanding agreement was found between experimental and predicted chromatograms. Thus, the prediction algorithm was able to forecast the best separation conditions with high accuracy.
- The exploration of the organic solvent content along the optimisation process allows the reduction of the number of different column lengths required to develop serially-coupled column procedures, without loss of performance, thus reducing the implementation cost. On the other hand, the connection of a smaller number of column segments prevents an undesirable increase in the system dead volume.

C.3.3. Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns.

Part I: Simple linear gradients

- Serially-coupled columns decrease the analysis time, but sometimes not sufficiently. Hence, the next proposal of developing a methodology that optimises gradient elution with the combined columns. Initially, linear gradients were implemented.
- For the simulation of the chromatograms in the gradient mode, a predictive system based on numerical integration was developed. The realism of the predictions was improved including in the calculations the

delays associated to the transit through previous columns and the portion of column in which the solute is eluting, besides the extra-column effects.

- Two different strategies were studied: the optimisation of the combination of columns (nature and length) using a pre-selected gradient profile (which was proposed by De Beer *et al.*), and the optimisation of the gradient program using a pre-selected combination of columns optimised in isocratic elution (developed for this work). The pre-selection of the combination of columns, followed by gradient optimisation was found to give more efficient results.
- Pareto plots were again used to select the most suitable separation conditions in gradient elution. These plots showed that the method that pre-selects the combination of columns offers several solutions with complete resolution for the mixture of 15 sulphonamides.
- A stepwise working protocol is recommended. Column coupling should be implemented only when the optimisation with several single columns is unable to resolve the sample. In this case, the information collected can be reused to find the best combination of columns and solvent content in the isocratic mode. If the analysis time is not convenient, the same column combination in isocratic elution and system modelling can be applied to find the best gradient separation.

C.3.4. Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns.

Part II: Multi-linear gradients

- The methodology developed to implement simple linear gradients with serially-coupled columns was extended to optimise multi-linear gradients. The strategy that pre-selects the optimal combination of columns in isocratic elution using Pareto plots was followed again. This selection is not critical, since several combinations were shown to give satisfactory results.
- If the connection between the serially-coupled columns is correct, the analysis time and resolution are independent of the order of the columns in isocratic elution. However, in gradient elution, the permutation of the columns can yield significant changes in behaviour. Therefore, the column order was included as a factor in the optimisation algorithm.
- The usefulness and reliability of serially-coupled columns depends on the possibility of performing a rigorous optimisation of the chromatographic parameters for both isocratic and gradient elution. In gradient elution, the complexity of the optimisation increases owing to the number of parameters involved: the initial and final eluent compositions, the slope of the gradient program, and at least, the location of the nodes for multi-linear gradients, besides the nature and length of the coupled columns. The development of a unique predictor system that implements the different strategies with single or serially-coupled columns in isocratic and gradient elution was found essential.
- Performing a systematic search of the best separation conditions is unfeasible with multi-linear gradients, due the high number of candidate solutions. However, satisfactory results are obtained with a probabilistic

search using genetic algorithms, which explore efficiently the search space, reducing the computation time to minutes, to which the time required to find the best column combination should be added.

- The optimal solution was found using an unconventional Pareto plot, which is built with all populations generated along the genetic algorithm exploration. Some of these solutions offer the performance that was looked for: those offering sufficiently good resolution and short analysis time. Therefore, the final solution of the genetic algorithm search (that one with the highest resolution) is not the aim of the search. Instead, the solution can be one previously discarded in the search process.
- Finally, it should be noted that the implementation of serially-coupled columns is a powerful methodology that can lead to a breakthrough in the separation possibilities of HPLC in many different application fields, to solve environmental, pharmaceutical, clinical and food monitoring problems, among others. However, its full potential can only be reached with the development of a powerful interpretive optimisation strategy, such as the one developed for this work.

PUBLISHED WORK

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	<input type="checkbox"/>
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	<input type="checkbox"/>
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

9

Modeling of Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography

M.C. García-Alvarez-Coque, G. Ramis-Ramos, J.R. Torres-Lapasió, and C. Ortiz-Bolsico

9.1

Introduction

Interpretive optimization strategies in liquid chromatography are based on the accurate description (modeling) of the chromatographic behavior [1,2]. The first step in these strategies consists of gathering information about the compounds in the sample, usually attending only to retention and covering reasonably wide regions of the factors involved. For this purpose, either isocratic or gradient experiments can be used. For each solute, a relationship that describes the retention is obtained as a function of the experimental factors. This function (conventionally an empirical or mechanistic algebraic expression) will allow the prediction of isocratic or gradient retention times for a given solute under different conditions.

The accuracy of predictions is decisive for the reliability of optimizations [3,4]. For a given solute, the prediction quality depends on the information richness provided by the experimental design (i.e., the number and distribution of the experiments within the factor domain), the equation selected to fit the training data, and the fitting procedure. The ranges of the experimental factors and the elution mode (isocratic or gradient) can also influence the accuracy. An overview of retention modeling in reversed phase liquid chromatography (RPLC) is next presented. The most widely used models for stationary-phase characterization are also outlined.

9.2

Isocratic Elution

9.2.1

Polynomial Models to Describe Retention Using Modifier Content as a Factor

The organic solvent (the modifier) content in the mobile phase is the factor most frequently optimized in RPLC [5]. It has not only a large impact on both elution

strength and relative retention (selectivity) but it can also be easily and accurately modified over wide ranges. Hence, the importance of obtaining reliable retention models involving the modifier content as a factor. In RPLC, the retention for a solute i can be expressed in terms of solubility parameters as follows [6]:

$$\ln k_i = \ln \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} = \frac{\nu_i}{RT} [(\delta_M - \delta_i)^2 - (\delta_S - \delta_i)^2] + \ln \frac{n_S}{n_M}, \quad (9.1)$$

where k_i is the retention factor (or relative retention) of the solute; t_{Ri} the corresponding isocratic retention time; t_0 the dead time; R the gas constant (1.9865 cal K/mole); T the absolute temperature (K); ν_i the solute molar volume (cm^3/mole); δ_M , δ_S , and δ_i ($\text{cal}^{0.5}/\text{cm}^{1.5}$) the solubility parameters of mobile phase, stationary phase, and solute, respectively; and n_M and n_S the number of moles of mobile phase and stationary phase, respectively, in the column. For a binary mixture of water (w) and organic solvent (o), the mobile-phase polarity can be calculated as follows:

$$\delta_M = (1 - \phi)\delta_w + \phi\delta_o, \quad (9.2)$$

where ϕ is the modifier content (usually expressed as the volume fraction). If Equation 9.2 is substituted in Equation 9.1, a quadratic relationship is obtained between the logarithm of the retention factor (usually expressed as a decimal logarithm) and the modifier volume fraction [7]:

$$\log k = c_0 + c_1 \phi + c_2 \phi^2. \quad (9.3)$$

The fitting parameters $c_0 - c_2$ gather all the constants and solute/mobile-phase/stationary-phase parameters outlined in Equation 9.1, with particular values for a given solute and chromatographic system (column/modifier). In narrow modifier content ranges, the quadratic term can be dropped. This simplifies the model to the usual linear relationship:

$$\log k = c_0 + c_1 \phi = \log k_w - S \phi. \quad (9.4)$$

The intercept of the fitted straight-line refers to the extrapolated $\log k$ -value if water were used as mobile phase ($\log k_w$). The slope indicates the sensitivity of retention to changes in the modifier content, that is, the solvent elution strength (S). In wide ranges of modifier, deviations from linearity are observed, which are especially significant at the highest and lowest modifier contents. Equations 9.3 and 9.4 are also valid in the presence of specific interactions produced by mobile-phase additives at fixed concentration.

Retention in ternary solvent systems, composed of water and two organic solvents (usually methanol and acetonitrile), has been described with similar equations:

$$\log k = c_0 + c_1 \phi_1 + c_2 \phi_2 + c_{12} \phi_1 \phi_2 + c_{11} \phi_1^2 + c_{22} \phi_2^2, \quad (9.5)$$

where ϕ_1 and ϕ_2 are the contents for the two organic solvents in the mobile phase [8,9]. The main purpose of using ternary systems in RPLC is the possibility of extending the fine-tuning of the selectivity with regard to binary systems.

The search for improved models has not yet finished. The topic was reviewed in 2009 by Nikitas and Pappa-Louisi [10]. The most reported models are logarithmic. However, there are other proposals. In this regard, the excellent accuracy, when applied to RPLC, of a nonlogarithmic model proposed by Jandera for normal-phase liquid chromatography, deserves to be mentioned [11]:

$$\frac{1}{k} = [a + b\phi]^n. \quad (9.6)$$

9.2.2

Polarity Models

Good linear relationships have also been found by relating $\log k$ to polarity parameters other than the solubility parameter, and that also depends on ϕ , such as the Dimroth–Reichardt parameter, E_T (30), or its normalized value, E_T^N (30). Its range of linearity is, however, limited (e.g., 0–80% v/v for acetonitrile and 20–100% v/v for methanol). A derived normalized parameter (P_M^N) was proposed by Bosch and Rosés [12,13] to extend the linearity to the full range of mobile-phase compositions (0–100%). For acetonitrile–water mixtures, P_M^N is defined as

$$P_M^N = 1.00 - \frac{2.068\phi}{1 + 1.341\phi} \quad (9.7)$$

and for methanol–water as

$$P_M^N = 1.00 - \frac{1.33\phi}{1 + 0.47\phi}. \quad (9.8)$$

It is possible to describe the retention with a linear model that isolates the polarity contributions of the three agents involved in the separation process (i.e., solute, stationary phase, and mobile phase):

$$\log k = (\log k)_0 + p_S(P_M^N - P_S^N), \quad (9.9)$$

where p_S and P_M^N are polarity descriptors for the solute and mobile phase, respectively, and $(\log k)_0$ and P_S^N account for the stationary-phase polarity. The term $(\log k)_0$ represents the retention in a hypothetical mobile phase with the same polarity as the stationary phase ($P_M^N = P_S^N$). However, the separation of the polarities of solute, mobile phase, and stationary phase in Equation 9.9 is not

perfect: although p_S mainly gathers the solute contributions, it is not an absolute value, rather a relative measurement that depends on the column environment (mobile phase and stationary phase). The same holds for $(\log k)_0$ and P_S^N .

An interesting advantage of Equation 9.9 is that it includes only one solute descriptor, p_s , and two column descriptors, $(\log k)_0$ and P_S^N (P_M^N is obtained from the mobile-phase composition). This facilitates the transfer of k -values to other columns and modifiers by establishing simple correlations between p_S values, for small sets of selected reference compounds. When $(\log k)_0$ and P_S^N are fitted individually for each solute, Equation 9.9 is simplified to

$$\log k = q + p_s P_m^N = c_0 + c_1 P_m^N. \quad (9.10)$$

Equations 9.4 and 9.10 are both two-parameter models, but the polarity model (Equation 9.10) is valid for a wider range of modifiers. In fact, the prediction accuracy of this model is comparable to that of the quadratic model (Equation 9.3) (Figure 9.1) [13].

9.2.3

pH as an Experimental Factor

For ionizable compounds, the pH is an additional experimental factor with a large influence on retention and selectivity. When the analyzed mixture contains one or more compounds with acid–base behavior, pH tuning can offer unique opportunities to improve resolution. However, modeling the changes in retention with pH is particularly cumbersome [14,15]. Not surprisingly, a widely extended practice consists of fixing the pH at a convenient value, which means that the benefits of this experimental factor on selectivity are limited.

At fixed modifier content, RPLC retention of ionizable compounds is a weighted mean of the behavior of the basic and acidic species:

$$k = k_A \delta_A + k_{HA} \delta_{HA} = k_A \frac{1}{1 + K h} + k_{HA} \frac{K h}{1 + K h} = \frac{k_A + k_{HA} K h}{1 + K h}, \quad (9.11)$$

where k is the measured retention factor, k_A and k_{HA} are the retention factors for the basic and acidic species, respectively, δ_A and δ_{HA} are their molar fractions, and h is the molar proton concentration. For convenience, the acid–base equilibrium is here characterized by the apparent protonation constant, which is the reciprocal of the acid–base dissociation constant ($K = K_a^{-1}$). This constant is affected by all interactions of both the acidic and the basic species with the components of the mobile phase and stationary phase.

Since the retention for each species (k_A and k_{HA}) is different, a sudden change in retention will happen at pH values close to $\log K$ (Figure 9.2). Depending on the charge and polarity of the acidic and basic species, the retention may decrease, increase, or remain constant with the pH (note that the charged species

Color Fig.: 9.1

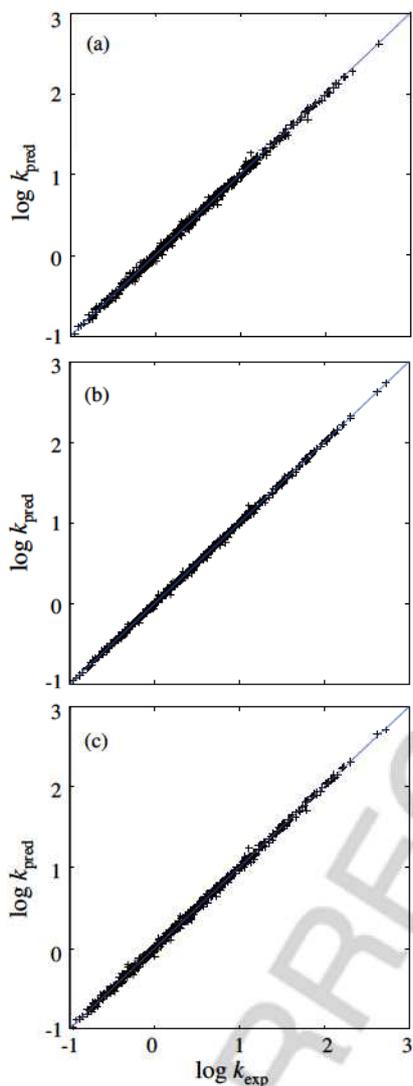


Figure 9.1 Comparison of the accuracy of predictions of the retention of 152 compounds, eluted with methanol–water mixtures ($n = 745$), provided by several retention models: (a) Equation 9.4, (b) Equation 9.3, (c) Equation 9.10. (Reproduced with permission from Ref. [13].)

are less retained). The protonation of a solute is produced along at least two pH units (within $\text{pH} = \log K \pm 1$). Therefore, for conventional RPLC columns, where the working pH range is relatively narrow (3–7), the change in retention will be fully sampled only for some solutes. As a result of the incomplete information, the retention of the acidic and basic species should be extrapolated.

Color Fig.: 9.2

204 | 9 Modeling of Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography

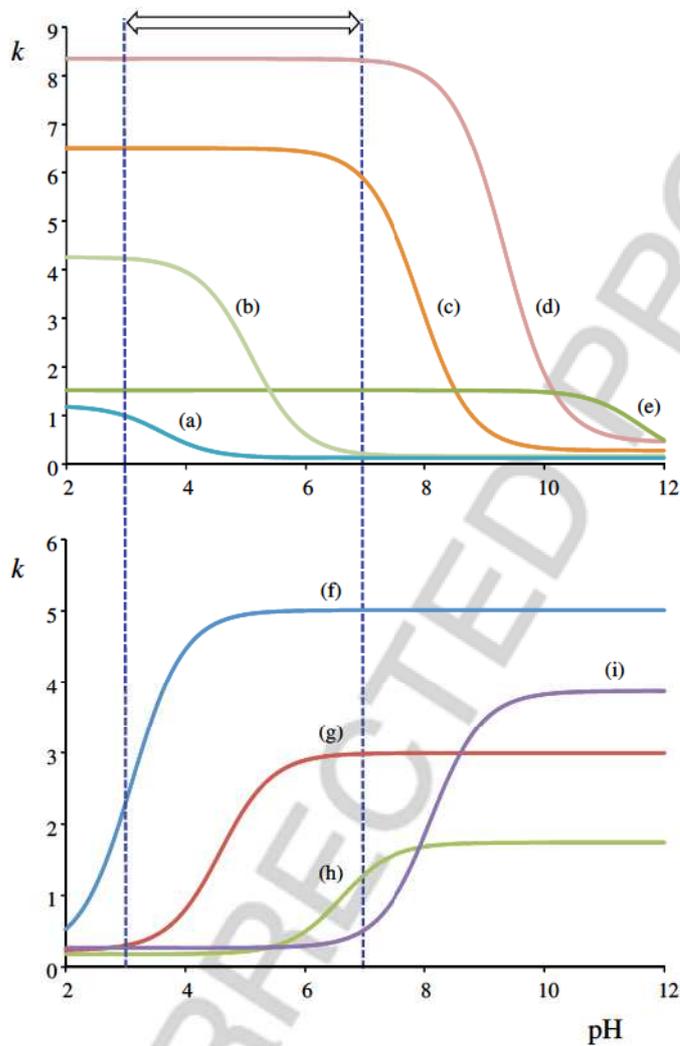


Figure 9.2 Dependence of the retention with pH for several acidic (a–e) and basic (f–i) compounds, eluted with 40% acetonitrile. Compounds ($\log K$ in 40% acetonitrile is given): (a) 2-nitrobenzoic acid (3.59), (b) naphthoic acid (5.09), (c) 2-nitrophenol (7.91), (d) 3,5-dichlorophenol (9.34), (e) phenol (11.61), (f) 4-chloroaniline (3.11), (g) 4-methylaniline (4.58), (h) 2,4,6-trimethylpyridine (6.59), and (i) *N,N*-dimethylbenzylamine (8.11). The working pH range for conventional columns is marked. (Data reproduced from Ref. [15].)

The following transformations of Equation 9.11 allow a more convenient fitting:

$$\begin{aligned} k &= \frac{(k_A/k_{HA}) + K h}{1 + K h} k_{HA} = \frac{f + K h + f K h - f K h}{1 + K h} k_{HA} \\ &= \left(f + \frac{K h}{1 + K h} (1 - f) \right) k_{HA}. \end{aligned} \quad (9.12)$$

$$\begin{aligned} \log k &= \log k_{HA} + \log \left[f + \frac{K h}{1 + K h} (1 - f) \right] \\ &= \log k_{HA} + \log \left(f + \frac{10^{\log K} h}{1 + 10^{\log K} h} (1 - f) \right). \end{aligned} \quad (9.13)$$

To account for the simultaneous effect of the modifier content and pH, the equations that describe retention with regard to both factors should be combined. Also, the influence of the modifier content on the protonation constant should be considered. The interaction of both modifier content and pH twists and shifts the retention surfaces, complicating the treatment notably. A linear function of $\log k$ and $\log K$ versus modifier content can be assumed for simplicity:

$$\begin{aligned} \log k &= \log k_{HA} + \log \left[f + \frac{10^{(\log K_w + m \phi)} h}{1 + 10^{(\log K_w + m \phi)} h} (1 - f) \right] \\ &= (\log k_{w,HA} - S \phi) + \log \left[f + \frac{10^{(\log K_w + m \phi)} h}{1 + 10^{(\log K_w + m \phi)} h} (1 - f) \right], \end{aligned} \quad (9.14)$$

where $k_{w,HA}$ and K_w are the retention of the acidic species and protonation constant in pure water. If the dependence of the retention factor and protonation constant on the modifier content is assumed to be quadratic,

$$\log k = \log k_w + S \phi + T \phi^2, \quad (9.15)$$

$$\log K = \log K_w + Q_1 \phi + Q_2 \phi^2, \quad (9.16)$$

From Equation 9.11, it follows:

$$k = \frac{k_{w,A} 10^{(S_A \phi + T_A \phi^2)}}{1 + K_w 10^{(Q_1 \phi + Q_2 \phi^2)} h} + \frac{k_{w,HA} K_w 10^{[(S_{HA} + Q_1) \phi + (T_{HA} + Q_2) \phi^2]} h}{1 + K_w 10^{(Q_1 \phi + Q_2 \phi^2)} h}, \quad (9.17)$$

where S , T , Q_1 , and Q_2 are model parameters. The fitting is numerically easier if Equation 9.17 is rewritten as follows:

$$k = \frac{10^{(R_A + S_A \phi + T_A \phi^2)} + 10^{(R_{HA} + S_{HA} \phi + T_{HA} \phi^2)} h}{1 + 10^{(Q_0 + Q_1 \phi + Q_2 \phi^2)} h}. \quad (9.18)$$

The dependence of retention on pH can be established most conveniently by using the polarity model (Equation 9.10). Thus, the combination of Equation 9.10 and the left-hand term in Equation 9.14 gives rise to

$$\log k = c_0 + c_1 P_M^N + \log \left(f + \frac{10^{(\log K_w + m \phi) h}}{1 + 10^{(\log K_w + m \phi) h}} (1 - f) \right), \quad (9.19)$$

where c_0 and c_1 correspond to the acidic species.

9.3

Dead Time Estimation

The void volume in liquid chromatographic systems has been defined as “the volume of mobile phase that fills the space between the injector and the detector cell, which includes the accessible interstitial or interparticle volume (the volume between packed particles) and the intraparticle volume (the volume of the particle pores accessible to the mobile phase), as well as the volume of tubing and any other component in the system (the extra-column volume)” [16,17]. Related with this concept is the dead time, which is the time that an ideal unretained compound (i.e., a compound that does not interact with the stationary phase) needs to cross the distance between the injector and the detector cell when eluted at a constant flow rate.

The dead time estimation in chromatographic systems is the basis for the calculation of retention factors (left-hand term in Equation 9.1). The calculation of the retention factor implies moving the origin of retention times to the time for an unretained compound, and division of the resulting net time by the dead time. The retention factor normalizes the retention and allows for comparisons among different column lengths or different flow rates for the same column.

An accurate knowledge of retention factors is needed in the prediction of retention and resolution for the optimization of chromatographic separation, in the estimation of partition coefficients, selectivity factors, and other thermodynamic parameters, and in the establishment of correlations with several chemical-physical properties. However, dead time estimation involves two main difficulties, especially in RPLC, as follows:

- i) The stationary phase adsorbs a certain amount of modifier, forming a layer and thus reducing the accessible volume inside the packing.
- ii) Solute molecules may be partially or completely excluded from the particle pores. Since this exclusion effect is due to the volume and shape of the solute molecules, different solutes may have different associated dead times. To this size exclusion effect, the electrostatic exclusion of charged solutes should be added.

The methods that have been reported for dead time estimation have been classified as static and dynamic. In static methods, there is no flow and the column is kept at atmospheric pressure. In dynamic methods, the mobile phase is flowing, and there is a decreasing linear pressure gradient along the column. The results yielded by different methods differ because different properties are measured, to which the experimental uncertainties should be added. The discussion and controversy on dead time estimation have been kept alive along decades. It can be said that there is no universally accepted method for the accurate estimation of dead time yet.

9.3.1

Static Methods

Static methods are not commonly used owing to several problems that are discussed next. The most usual static method is the pycnometry or weight difference method. This consists in filling the packed column successively with two solvents of sufficiently different density, such as carbon tetrachloride and methanol, and weighting. The dead volume is then obtained from the differences in density and weight. In another method, the column is flushed with water and dried with a nitrogen stream, followed each by weighting. Both methods ignore the solvation of the stationary phase by the components of the mobile phase. Thus, unless a correction is made for the solvation layer, an error in column dead volume arises. In addition, a small difference between two large measurements (i.e., the weight of the column filled with two different solvents, or filled with water and dried) has a large uncertainty. The one solvent method (with water) is also impractical because, once the column is dried, it is often irreversibly damaged.

9.3.2

Dynamic Methods

Dynamic methods are divided into direct and indirect. Direct methods include the injection of unretained compounds, such as mobile-phase solvents or markers [17]. Thus, a baseline disturbance is obtained by injecting water, an organic solvent, or a solution with a composition slightly different from the mobile phase. A refractive index detector is not necessary to measure the disturbance, since UV detectors frequently evidence changes in the refractive index at low wavelengths.

The injection of markers, either organic (e.g., acetone, *N,N*-dimethylformamide, nitrobenzene, picric acid, or uracil) or inorganic (e.g., KI, KNO₃, NaCl, NaNO₃, and NaNO₂), is the most widespread method owing to its simplicity. Usually, the possible retention of the marker is neglected. The ideal marker should be small enough to penetrate the whole accessible volume in the stationary phase, and hydrophilic enough to be unretained. However, in practice, all

markers are either partially excluded from the particle pores or slightly retained. Uracil and KBr seem to be the best markers.

Indirect methods are also called “mathematical methods.” These methods obviate the difficulties associated with the selection of truly unretained compounds. The most known indirect method is based on the elution of homologous series [16,17]. The approach is based on an assumed linear relationship between the logarithm of retention factor and the homolog carbon number, n_C :

$$\log k = c_0 + c_1 n_C, \quad (9.20)$$

which is combined with the left-hand term of Equation 9.1, as follows:

$$t_R = t_0(1 + k) = t_0(1 + k_0 e^{c_1 n_C}), \quad (9.21)$$

where k_0 is the residual retention factor for $n_C=0$, and c_1 the slope in Equation 9.20. The parameters t_0 , k_0 , and c_1 in Equation 9.21 are fitted by non-linear regression.

The homologous series method is more time-consuming than dynamic methods based on unretained compounds, and the assumed linear relationship is not always valid along the whole series. Deviations from linearity have been observed for both the smaller homologs and the homologs exceeding the alkyl chain length of the bonded phase. The choice of the homologous series is based on their availability, solubility in the mobile phase, retention, and detection. The estimated dead time depends significantly on the number and choice of homologs. Furthermore, since the dead time is an extrapolated value, it is strongly influenced by small errors in the retention times of the homologues (it requires highly precise and accurate data) and by the applied mathematical approach.

The retention times of compounds eluted at several mobile-phase compositions can also be used to estimate the dead time [18]. The compounds used for the estimation can be those for which there is an interest to calculate the retention factor. For this purpose, a variety of retention models can be used, but the linear relationship between $\log k$ and ϕ is the most convenient (Equation 9.4). The dead time is obtained from

$$t_R = t_0(1 + k) = t_0(1 + k_0 e^{c_1 \phi}). \quad (9.22)$$

The model parameters can be obtained through nonlinear regression, by fitting the retention times at several mobile-phase compositions within a narrow modifier content range, where the linear retention model fits properly and the column dead time is negligibly affected by the change in modifier content. The approach is strongly affected by the magnitude of the retention times being processed, as is the case for the homologous series approach. In order to get reliable estimations, the retention data of several compounds eluting under the same conditions (rather than the data of a single compound) should be treated

altogether. It is, thus, implicitly accepted that the measured void volume is the space accessible to the solutes during elution, the accessibility to the pores of the solutes treated simultaneously is similar, and the void volume is not affected by changes in the modifier content. The approach includes an iterative algorithm to compensate for the lack of accuracy or inadequacy of some data.

9.4 Effect of Temperature

9.4.1 Van't Hoff Equation

The influence of temperature on retention is described by the Van't Hoff equation [19]:

$$\ln k = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} + \ln \phi, \quad (9.23)$$

where ϕ is the system phase ratio, ΔH and ΔS are the standard enthalpy and entropy changes, respectively, R is the universal gas constant, and T is the absolute temperature. For sufficiently narrow temperature ranges (of about 90 °C), where ΔH and ΔS are constant, Equation 9.23 can be transformed into a simple two-parameter equation:

$$\ln k = c_0 + \frac{c_1}{T}, \quad (9.24)$$

where c_0 and c_1 are the model parameters. For wider ranges, due to the dependence of ΔH and ΔS on temperature, the plots are curvilinear and a third term is needed:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} + \frac{c_2}{T^2}. \quad (9.25)$$

Nonlinear plots are also obtained for mixed retention mechanisms, for changes in the conformation of solute molecules (case of large molecules) or bond chains in the stationary phase, which influence adsorption processes, or for retention mechanisms affected by secondary chemical equilibria in the mobile phase.

The usefulness of temperature as a factor to improve separations is controversial [20]. At increasing temperature, retention decreases, longitudinal diffusion increases (which deteriorates the efficiency at low flow rates), and mass transfer kinetics is stimulated (which improves the efficiency at large flow rates) [21]. The slope of the Van't Hoff equation for several analytes may also differ to

significantly affect the selectivity, occasionally giving rise to peak reversals with varying temperature. Usually, these changes in selectivity are larger for ionizable or polar compounds. The changes are particularly intense for large molecules, such as proteins and soluble polymers that can exhibit diverse conformations depending on temperature.

The effects of temperature and elution strength (modifier content) on the selectivity are approximately orthogonal to each other. Therefore, a pair of solutes, which are difficult to resolve by optimizing the elution strength, may be separated by optimizing the temperature. Although generally not exercising as much influence on the selectivity as the organic modifier nature and content do, gradient slope or pH, temperature optimization can be very useful in method development to improve selectivity while saving analysis time.

9.4.2

Combined Effect of Modifier Content, pH, and Temperature

For ionizable compounds, synergic interactions between the modifier content, the pH, and the temperature can be expected [22]. Modeling of retention including all significant interactions for a group of target compounds is challenging, since a unique design with a necessarily rather large number of experiments is needed to satisfy the information requirements of several compounds simultaneously (often, some compounds may be deficiently sampled, Figure 9.2). The dependence of the protonation constant on temperature through the van't Hoff equation,

$$\log K = c_0 + \frac{c_1}{T}, \quad (9.26)$$

should be considered when combining Equations 9.13 and 9.24 to account for the simultaneous effects of pH and temperature on retention:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} + \log \left(c_2 + \frac{10^{c_3+(c_4/T)} h}{1 + 10^{c_3+(c_4/T)} h} (1 - c_2) \right), \quad (9.27)$$

where the model parameters are characteristics for a given solute and chromatographic system.

The combined effect of the three factors (modifier content, pH, and temperature) can be expressed by the following eight-parameter ($c_0 - c_7$) equation built using the polarity model:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} + c_2 P_M^N + \log \left(c_3 + \frac{10^{c_4+c_5\phi+(c_6/T)+c_7(\phi/T)} h}{1 + 10^{c_4+c_5\phi+(c_6/T)+c_7(\phi/T)} h} (1 - c_3) \right). \quad (9.28)$$

As can be observed, Equations 9.19 and 9.27 are particular cases of the general description given by Equation 9.28.

9.5 Effect of Pressure

9.5.1 Deviations of Retention Factors

In an ideal chromatographic system, the mobile-phase properties, the packing and column cartridge geometries, and other system parameters are not affected by pressure. When the system departs from ideality (at increasing pressure), deviations in retention times are observed owing to [23,24]: (i) changes in the mobile-phase volume and viscosity; (ii) deviations in Darcy's law, which describes the flow of a fluid through a porous medium, relating the local linear velocity of an unretained solute to the specific permeability, external porosity, mobile-phase viscosity, and local pressure gradient; (iii) column expansion and packing compression, which makes the dead volume to increase; (iv) perturbation of the equilibria inside the column when the partial molar volumes of the two species involved in the partition equilibrium are different, which is especially significant for large molecular mass compounds; (v) generation of a certain amount of heat (frictional heating) produced by the high velocity of a liquid through a low-permeability bed, which affects the partition equilibria, decreasing the retention and diminishing the efficiency.

Discriminating the contributions of the different sources to the observed deviations from ideality is not easy. Also, the deviations in retention are only evidenced when working at varying flow rates or at varying pressures with constant flow rate (which is unusual in practice). The effects of pressure are particularly intense in fast chromatography. In this context, a particular behavior is observed with silica-based monolithic columns. These columns are made of a silica skeleton rod encapsulated in a polyether ether ketone (PEEK) tube, resulting in a network of macropores interconnected by channels through which the mobile phase percolates [25]. The volume of the channels in a monolithic column is larger than the volume between the particles in microparticle packed columns, the channel structure being also less tortuous. This allows larger flow rates, beyond those feasible for conventionally packed columns at relatively low pressures. Flow rate becomes, therefore, an important factor to be considered with monolithic columns, in addition to the mobile-phase composition, in order to achieve good resolution at sufficiently low analysis time.

As a result of the bed and tube elasticity, mobile-phase linear velocity for any column may vary with pressure to a certain extent. The initially cylindrical column at atmospheric pressure may be deformed under the influence of the pressure gradient and becomes approximately a truncated cone. The deformation is, however, usually negligible for columns made of stainless steel tube and pressures up to 100 MPa (it amounts only to some tenths percentage). However, the Young modulus of PEEK is 3.6 GPa compared to 210 GPa for stainless steel, meaning that PEEK is 50 times more elastic. Therefore, a column encapsulated

in PEEK undergoes a larger stress with pressure, which tends to inflate it [26]. This decreases the linear velocity, and increases the retention at relatively low pressures (<20 MPa, which is the maximal pressure for the PEEK material). In contrast, frictional heating, which is an issue for packed columns, seems to be less significant for monolithic columns, owing to the smaller resistance to the flow [27].

9.5.2

Correction of Pressure Effects

As commented above, the retention factors should not depend on the flow rate. However, for silica-based monolithic columns encapsulated in PEEK, they increase slightly when the flow increases (Figure 9.3a). Also, in the ideal behavior, a plot of retention time versus the inverse of the delivered flow rate (F_d , the flow rate measured by the instrument) should exhibit zero intercept ($c_0 = 0$):

$$t_R = c_0 + \frac{c_1}{F_d}. \quad (9.29)$$

However, for a silica-based monolithic column, $c_0 > 0$ (Figure 9.3b), with more significant differences from zero for the most retained compounds (i.e., c_0 increases as the solute polarity decreases). Therefore, in RPLC, the pressure-dependent deviation in retention time for dead time markers is smaller than for retained solutes. This makes the retention factors (k) depend on the flow rate. The t_R versus $1/F_d$ lines for all solutes in a sample converge approximately at a common point on the $1/F$ -axis. This crossing point allows the estimation of an apparent flow rate (F_{app}) as follows:

$$\frac{1}{F_{app}} = \frac{1}{F_d} + \frac{1}{\Delta F_c}. \quad (9.30)$$

ΔF_c being the flow rate deviation.

Several authors have reported retention models for RPLC packed columns, such as the following:

$$y = c_0 + c_1 \phi + c_2 F + c_{12} \phi F + c_{11} \phi^2 + c_{22} F^2, \quad (9.31)$$

which includes the modifier content and flow rate as factors, with either k or $\log k$ as the response (y). However, independently of the origin of the deviations, the retention factors can be corrected to the ideal behavior as follows:

$$k_i^c = \frac{t_{R,i}^c - t_0^c}{t_0^c} = \frac{(t_{R,i} - c_{0,i}) - (t_0 - c_{0,0})}{(t_0 - c_{0,0})}, \quad (9.32)$$

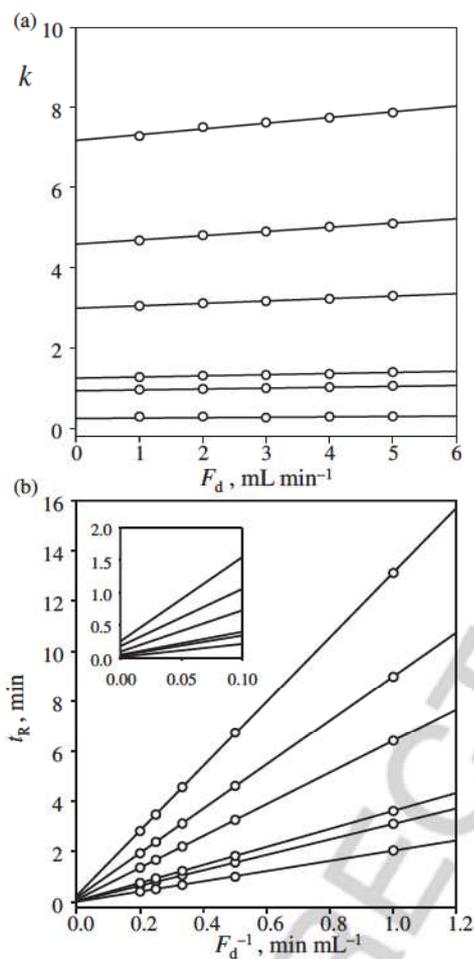


Figure 9.3 Dependence of the retention factor and retention time on the delivered flow rate for a set of compounds eluted with 20% acetonitrile from a silica-based monolithic column encapsulated in PEEK (a). Compounds

(from bottom to top): Nadolol, metoprolol, acebutolol, oxprenolol, labetalol, and propranolol. The inner plot in (b) magnifies the region at short retention times. (Reproduced with permission from Ref. [28].)

where t_0 and t_0^c are the experimental and corrected dead time at each flow rate, and $c_{0,i}$ and $c_{0,0}$ the deviations in retention time for a retained compound and marker, respectively. Once the retention factors are corrected, retention models (e.g., Equations 9.3 or 9.10) do not need to include the flow rate as a factor, since k_i^c values do not depend on the flow rate anymore [28].

9.6

Enhancing the Prediction of Retention

9.6.1

Practical Considerations

In chromatographic practice, replicated measurements of retention times at a given mobile-phase composition always fluctuate within a certain range. The possible reasons of these fluctuations are the uncertainty in injection valve operation, flow rate variations produced by defective pumping, changes in temperature, insufficient power supply stabilization, insufficient stationary-phase re-equilibration, stationary-phase degradation (a long-term effect), and deviations from the nominal mobile-phase composition (e.g., due to errors in the preparation of the mobile phase or organic solvent evaporation), among others. These sources of error can deteriorate the accuracy of predictions [29].

Another point to consider in the measurement of retention times is the incorrect peak assignment when mixtures of standard compounds are injected. This can be carried out by the one-at-a-time injection of standards. Multistandard solutions can be used, provided the differences in retention allow for identifying the peaks correctly. If needed, peak tracking can be applied by varying the concentration of the injected standards or with the aid of a selective detection technique.

The reduction of the experimental effort, without deteriorating the quality of the prediction model, is also important. Usually, when only the modifier content or the temperature is taken as factors, models yielding accurate predictions will be constructed (such as Equations 9.3, 9.4 and 9.24), even using minimal experimental designs with only one degree of freedom. Moreover, since the reliability of the models has been extensively demonstrated, in many practical instances, experimental designs with no degrees of freedom are used [1]. Only when significant deviations are found in a further prediction, more experiments than those strictly required to construct the model are included in the design to reduce the uncertainty of the predictions.

In comparison to the modifier content and temperature, the robustness of the predictions is poorer when the pH is used as a factor [22], owing to

- i) the complexity of modeling the retention of ionizable compounds, due to the sudden solute-dependent logarithmic drops, which requires extensive experimental designs to assure accurate descriptions.
- ii) the frequent different acid–base properties of the solutes in a mixture, which forces to explore different pH regions. The complexity of the required experimental design increases with the number of solutes .

Therefore, designs involving the pH and one or more additional experimental factors should usually consider the data from 12 to 15 or more mobile phases (e.g., three mobile-phase compositions, each at four or five pH levels).

Frequently, for complex mixtures, the retention will remain unchanged for some solutes all along the sampled pH region, while sudden drops will be observed for others. This can result in multiple peak crossings along the pH range, and unrobust separations at those pH values close to the $\log K$ of the ionizable compounds (Figure 9.2). Therefore, the experimental reproduction of a predicted separation will probably require small corrections of the mobile-phase pH.

9.6.2

Influence of Model Regression Process on Quality of Predictions

The regression process builds the best possible relationship between response and predictors. This is done by minimizing the sum of squared residuals (i.e., the squared difference between the actual and the predicted responses, extended to the whole set of training experiments) [1,29].

Under the perspective of its mathematical resolution, the retention models can be classified into linear and nonlinear, for which appropriate linear and nonlinear regression procedures, respectively, are required. Some nonlinear models can be transformed in general linear models, by modifying the response variable. Once this transformation is made, linear regression procedures (which are universal, safer, and easier) can be applied. It should be clarified that in this context, "linear" means "linear combinations of predictor variables," where each term in the summation can be linear, quadratic, and so on, or a product of factors (see Equation 9.5 as an example).

It should be noted that all equations describing the retention in RPLC with k as response variable are nonlinear. When the response variable is transformed (e.g., $\log k$) to get a simpler linear model, the distribution of the uncertainties associated with the solution is affected: the set of optimal (regressed) parameters will minimize the residuals for the transformed response (e.g., $\log k$), but not for the original response (k), which is the actual interest. Naturally, this problem does not exist if the regression is carried out nonlinearly with the original response variable. Nevertheless, there is a generalized practice of ignoring these effects on regression.

The fitting bias can be fully compensated through the introduction of weights (Figure 9.4), which can be obtained by the application of the error theory:

$$w = \left(\frac{\partial F}{\partial f} \right)^2 = \frac{1}{\left(\frac{\partial \log k}{\partial k} \right)^2} = (2.303 k)^2, \quad (9.33)$$

where F and f are the nonlinearized and linearized functions, respectively. To reduce the uncertainty of predictions, the use of weights is recommended as a general rule. Weighted regression, however, deteriorates the accuracy of mobile phases of large elution strength.

216 | 9 Modeling of Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography

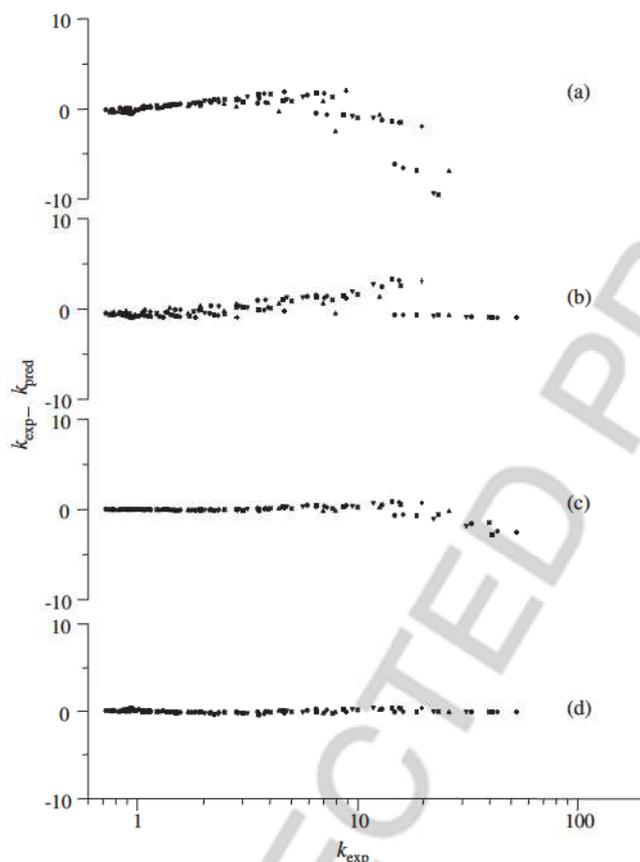


Figure 9.4 Uncertainty in the prediction of the retention factors for a set of 13 phenols eluted with 9 mobile phase in the 20–100% acetonitrile range, according to Equation 9.4 (a, c) and Equation 9.3 (b, d), after unweighted (a, b) and weighted (c, d) linear regression. (Reproduced with permission from Ref. [3].)

9.7 Gradient Elution

9.7.1 Integration of Fundamental Equation for Gradient Elution

The effect of a gradient of organic modifier on retention is usually described through an integral equation, which is called the fundamental equation for gradient elution [30,31].

$$t_0 = \int_0^{t_s - t_0} \frac{dt}{k(\phi(t))}, \tag{9.34}$$

where ϕ is the modifier content at the solute location along its migration inside the column and t_g the target variable (the time the solute needs to reach the column outlet), which can be calculated for any gradient provided the composite function $k(\phi(t))$ is known. This implies two nested equations: the dependence of the retention factor on the modifier content (i.e., the retention model) and the change in the modifier content with time (i.e., the gradient program).

Equation 9.34 can be solved analytically only in a few cases. The most simple case is presented when both $\log k(\phi)$ and $\phi(t)$ functions are linear. This is the basis of the linear solvent strength theory [31], which has been widely used to model gradient elution. This theory can be easily extended to the construction of several consecutive linear segments (i.e., multilinear gradients).

From Equation 9.4 and considering a linear gradient:

$$\phi = \phi_0 + m t \quad (9.35)$$

the following equation is obtained:

$$k = k_w e^{-S \phi} = k_w e^{-S(\phi_0 + m t)} = k_w e^{-S \phi_0} e^{-S m t} = k_0 e^{-S m t}, \quad (9.36)$$

where k_0 is the retention factor at the beginning of the gradient. Equation 9.34 assumes that the gradient front reaches instantaneously the column inlet. However, actually, the solute is eluted isocratically until the gradient reaches it (i.e., during the so-called dwell time, t_d). Taking into account Equations 9.34 and 9.36:

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g - t_0} \frac{dt}{k_0 e^{-S m(t - t_d)}} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{1}{S m k_0} [e^{S m(t_g - t_0 - t_d)} - 1]. \quad (9.37)$$

From Equation 9.37, the retention time in gradient elution is obtained:

$$t_g = \frac{\ln[1 + S m(k_0 t_0 - t_d)]}{S m} + t_0 + t_d. \quad (9.38)$$

This outline can be applied to other integrable equations, such as Equation 9.6.

9.7.2

Nonintegrable Retention Models

As commented, the linear retention model (Equation 9.4) is valid only within narrow ranges of modifier content. For wider ranges, a quadratic term (Equation 9.3) should be added to make a proper description of the retention. A drawback of the quadratic equation, when used in gradient elution, is that the analytical integration of Equation 9.34 is not possible or at least not straightforward. Also, independent of the retention model, the analytical integration cannot be applied with nonlinear gradient programs. However, these can be satisfactorily

emulated by approximating them to summations of several consecutive linear gradients.

In any case, the numerical integration is a suitable solution [1], preferred by some analysts independent of the retention model and gradient program. In this case, t_g is calculated by splitting the integral into multiple small isocratic steps:

$$t_0 = \int_0^{t_g-t_0} \frac{dt}{k(t)} = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k(t)} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k(t)}. \quad (9.39)$$

Since $k(t)$ can be assumed to be constant inside each step, t_0 can be approximated to

$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} \quad (9.40)$$

with

$$k_{i,i+1} = \frac{k(t_i) + k(t_{i+1})}{2}. \quad (9.41)$$

The precision in t_g can be increased to any desired level by just reducing the time intervals ($t_{i+1} - t_i$). However, the higher the required precision, the longer the computation time. Also, there is a limitation associated with the pumping system, since gradients are generated by the instruments by approximating changes in composition to small steps. Therefore, investing effort in obtaining a precision level in t_g beyond the instrument performance is useless.

9.8

Computer-Assisted Interpretive Optimization

When the chromatographer faces a new problem, some decisions should be first taken concerning nonadjustable factors (e.g., the column nature and length, and the solvent and the buffer nature). These factors are usually selected by trial and error or on the basis of prior knowledge. Next, the effects of readily adjustable properties, such as the modifier content, pH, temperature, or the gradient program, are examined by varying one or more of these factors. When the results are not satisfactory, a major change in the chromatographic system is required. This panorama suggests that finding the best chromatographic separation conditions is not easy.

Several strategies for optimizing the experimental conditions have been proposed to assist the resolution of complex elution problems [1,3,4,32]. In spite of being particularly slow and inefficient, trial-and-error strategies are still frequent.

Many samples are, however, so complex that the protocol can be too long, and often, the best (or at least acceptable) conditions are missed.

Fortunately, method development can be notably expedited with more reliable results by applying computer-assisted interpretive optimization strategies. This kind of optimization includes two steps: system modeling based on training data and prediction of the resolution through computer simulation [4]. In order to carry out a rigorous optimization, it is convenient that not only the retention but also the peak profile defined by their left and right half-widths (and eventually, the peak height) is modeled [33,34]. In the first step, the chromatographer develops a number of experiments as reduced and informative as possible, in order to fit equations that will allow the prediction of chromatograms under any new condition within the modeled experimental space. In the second step, the separation quality is prospected for a large number of separation conditions, to find out the set of conditions giving the maximal (or at least an appropriate) resolution. This is done by simulating the chromatograms for a prefixed distribution of the experimental factors being optimized. For this purpose, synthetic chromatograms constituted by the predicted individual signals of the targeted compounds in the analyzed mixture are built.

The search of the best conditions implies the reduction of the information contained in the simulated chromatograms to a numerical value depicting the achieved overall separation level, which is monitored throughout the separation space. Ideally, to be meaningful, this value should correlate with the analyst's appraisal of resolution. The mathematical function that allows the evaluation of the separation quality is called "chromatographic objective function," which is maximized throughout the optimization process. Usually, the objective function considers only the resolution, but it may achieve additional aims, such as a short analysis time, low cost, or desirable peak profiles (i.e., high efficiencies and low asymmetries) [1,35].

Very often only one factor (e.g., the modifier content in isocratic elution) is enough to succeed in the separation. The optimization of two or more factors (e.g., the modifier content, pH, and/or temperature, or the concentration of two modifiers and pH) is less frequent, due to the increased experimental effort needed to achieve accurate predictions. Gradient elution implies finding the suitable gradient program, which is, numerically speaking, more complex. The factors that should be determined are the gradient time, the gradient shape, the initial value of the experimental factor(s), or number of nodes and coordinates in a multilinear gradient.

The resolution of a mixture is usually faced in a first trial by looking for a unique experimental condition, able to resolve all compounds in the sample. If this is not possible, the problem can be outlined with less ambitious aims, focusing on only some compounds. In an extreme case, a single analyte can be individually optimized [4]. Optimization oriented to subsequent deconvolution is also possible in case of unavoidable partial coelution. Several software packages have been marketed to facilitate the implementation of interpretive methodologies, especially for RPLC. The development of analytical methods can be

greatly benefited with these packages, which in addition can assist untrained users to set up separations. Some examples are DryLab [36], ChromDream [37], PREOPT-W [38], and OSIRIS [39]. The user can also develop his or her own software with the aid of a spreadsheet, programming languages, preferably an efficient computing environment such as MATLAB or R. These tools give freedom to the analyst to implement new developments and strategies.

9.9 Stationary-Phase Characterization

The wide variety of stationary phases commercially available (several hundreds) may make the appropriate selection for method development extremely difficult. The decision is often based on previous experience, stationary-phase availability in the laboratory, or advice and availability from customary suppliers. In some cases, as commented above, trial-and-error or screening approaches are applied, which are time-consuming and expensive. More rational and less labor-intensive approaches are based on the prediction of differences in absolute retention and selectivity, considering the relative importance of the intermolecular interactions between analytes and stationary phases [40]. Ideally, the approaches should help in identifying alternative stationary phases that can provide either equivalent selectivity for routine assay procedures or very different selectivity for orthogonal separations. In any case, the analyst should be guided in the selection of the best option for a given separation. Regrettably, this possibility remains still a grand challenge in separation science, although some interesting initiatives have been developed. In any case, the developed approaches have helped in understanding the intermolecular interactions governing the separation process (see Chapter 8). The approaches enjoying more acceptability are described next.

9.9.1 Linear Solvation Energy Relationships

Linear solvation energy relationship (LSER) is a specific subset of a broader class of thermodynamic relationships known as linear free energy relationships (LFERs), which describe the transfer of a solute between two solvents. The most widely accepted LSER model was developed by Abraham and coworkers [41]:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV. \quad (9.42)$$

In Equation 9.42, SP can be any free energy-related property. In chromatography, it is any measure related to solute partitioning (most often taken as $\log k$), and c is a system constant independent of the probe solutes [42,43]. The capital letters (the solute dependent input parameters E , S , A , B , and V) represent solute descriptors that account for specific intermolecular interactions: the solute's polarizability in excess with regard to a comparably sized n -alkane (E), dipolarity

(with some contribution from polarizability) (S), hydrogen bond acidity (proton-donating ability) (A), hydrogen bond basicity (proton-accepting ability) (B), and molecular size (specifically, the McGowan characteristic molar volume of the solute) (V). The lower case letters (the coefficients) are system constants, which depend on the nature of both mobile phase and stationary phase. These coefficients are determined by measuring the solute property (SP) for a wide range of solutes with known E , S , A , B , and V values, spanning a reasonably wide range of interaction abilities, and then performing multiparameter linear least regression. The interpretation of the coefficients is based on their magnitude, sign, and chemical meaning. The magnitude estimates the difference in the interaction ability of the two phases, and the sign indicates which phase has the greater ability. Regarding the chemical meaning, the coefficients represent a complementary property of the solute (e.g., solute basicity/solvent acidity). Once a column has been characterized, it is possible to predict the retention for other solutes for which the solute descriptors are known.

It is important to realize that the origin of the LSER solute descriptors is not chromatographic but much more general. The LSER model treats both mobile phase and stationary phase as homogenous bulk phases akin to simple pure solvents. Clearly, this is an oversimplification for RPLC, where the bonded alkyl chains, the silanol groups, and clusters of sorbed solvent and water molecules embedded in the stationary phase establish a very heterogeneous environment. Also, not all kinds of interactions inside a column are considered, such as those accounting for differences in the retention for isomers or shape selectivity observed on some RPLC columns, the enhanced retention of highly fluorinated species on highly fluorinated bonded phases, and metal complexation interactions such as those taking place in zirconia-based stationary phases with certain solutes, among others.

9.9.2

Local Models for Characterizing RPLC Columns

The Abraham LSER approach yields a general model that contributes to our understanding of the retention process, but the predictions of solute retention are not sufficiently accurate. Snyder, Dolan, and coworkers created a new approach entirely based on solute properties captured from the analysis of RPLC data: the hydrophobic subtractive model [44,45]. This is thus a local model restricted to RPLC that has shown more successful predictions compared to the LSER model.

Essentially, the information in the hydrophobic subtractive approach was obtained from RPLC retention data for a large set of solutes (about 80 solutes) on different columns, which were correlated with each other. The model recognizes that hydrophobic retention is the dominant process in RPLC, and in the absence of other retention mechanisms, plots of $\log k$ for one column versus another for solutes having different polarities should be a straight line. However, the presence of other types of interactions gives rise to scatter in the plots.

222 | 9 Modeling of Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography

Deviations from the primary correlation are then assigned to specific properties of the solutes and columns. The hydrophobic subtractive model is outlined as follows:

$$\log \alpha = \log \left(\frac{k_i}{k_{\text{ethylbenzene}}} \right) = \eta' H - \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + \kappa' C. \quad (9.43)$$

Greek letters represent properties of the solute relative to the values for ethylbenzene, which is taken as reference. Capital letters represent column properties relative to a hypothetical average type B C₁₈ column. Any column which behaves identically to the hypothetical reference column will have $H=1$, with the value for all other parameters being zero. The $\eta'H$ term describes the hydrophobicity contribution to the relative retention; the $\sigma'S$ term indicates the contribution from the steric resistance to the insertion of the analyte into the stationary phase or inability of solute molecules to penetrate freely into the solvated stationary-phase volume because of its size and/or shape (σ' represents the solute bulkiness); A is the stationary-phase hydrogen bond acidity, which combines with the solute hydrogen-bond basicity β' , while the term in B represents the stationary-phase hydrogen-bond basicity and α' the solute hydrogen bond acidity. The last term ($\kappa'C$) reflects the ion-exchange properties of the packing, which are attributed to the surface silanols. The five parameters are of primary practical interest because they determine the selectivity and applicability of most RPLC stationary phases. The H , S , A , B , and C parameters for at least 400 stationary phases have been evaluated, mainly of type-B-based silica C₁₈. For phenylpropyl and cyanopropyl columns, two additional terms are required, $\pi'P$ and $\mu'D$, referring to p-p and dipole-dipole interactions, respectively.

The limitation of the hydrophobic subtractive approach lies on the fact that the stationary-phase properties were initially obtained in a single type of mobile phase (50% v/v acetonitrile). Later on, it was found that for columns that are similar to each other the solvent effect can be ignored. It should be also noted that all model parameters are temperature dependent, and the $\kappa'C$ term is pH dependent. Therefore, C -values at both pH 3 and 7 were obtained.

Another popular method for stationary-phase characterization was proposed by Tanaka and collaborators [40]. The initial test was modified by Euerby and has been established as an industrial standard test to assess selectivity and performance differences between HPLC columns. In the so-called Tanaka-Euerby test, the probes are pentylbenzene, butylbenzene, triphenylene, *o*-terphenyl (whose retention is measured with 80% methanol), and benzylamine, phenol, and caffeine (whose retention is measured with 30% methanol). Columns are characterized by six parameters: retention capacity or absolute hydrophobicity, which depends on the carbon load and stationary-phase surface area, measured by the k -value for pentylbenzene; hydrophobic selectivity or methylene group selectivity, indicated as the ratio of k -values for pentylbenzene and butylbenzene; shape selectivity as the ratio of k -values for triphenylene and *o*-terphenyl; hydrogen bonding as the ratio of k -values for caffeine and phenol measured in

unbuffered mobile phase; and total and acidic ion-exchange capacity as the ratio of k -values for benzylamine and phenol at two pH values (2.7 and 7.6). The latter three tests are of particular interest for the analysis of basic solutes.

References

- 1 García-Alvarez-Coque, M.C., Torres-Lapasió, J.R., and Baeza-Baeza, J.J. (2006) Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **579**, 125–145.
- 2 Baeza-Baeza, J.J., Ortiz-Bolsico, C., Torres-Lapasió, J.R., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2013) Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1284**, 28–35.
- 3 Torres-Lapasió, J.R., Rosés, M., Bosch, E., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2000) Interpretive optimisation strategy applied to the isocratic separation of phenols by reversed-phase liquid chromatography with acetonitrile–water and methanol–water mobile phases. *J. Chromatogr. A*, **886**, 31–46.
- 4 Torres-Lapasió, J.R. and García-Alvarez-Coque, M.C. (2006) Levels in the interpretive optimisation of selectivity in high-performance liquid chromatography: a magical mystery tour. *J. Chromatogr. A*, **1120**, 308–321.
- 5 Ramis-Ramos, G. and García-Alvarez-Coque, M.C. (2013) Solvent selection in liquid chromatography, in *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation* (eds S. Fanali, P. Haddad, C.F. Poole, P.J. Schoenmakers, and D. Lloyd), Elsevier, Amsterdam, pp. 223–249.
- 6 Schoenmakers, P.J., Billiet, H.A.H., and de Galan, L. (1982) The solubility parameter as a tool in understanding liquid chromatography. *Chromatographia*, **15**, 205–214.
- 7 Schoenmakers, P.J., Billiet, H.A.H., and de Galan, L. (1983) Description of solute retention over the full range of mobile phase compositions in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **282**, 107–121.
- 8 Pappa-Louisi, A., Nikitas, P., and Karageorgaki, M. (2005) Retention prediction in ternary solvent reversed-phase liquid chromatography systems based on the variation of retention with binary mobile phase composition. *J. Chromatogr. A*, **1091**, 21–31.
- 9 García-Lavandeira, J., Martínez-Pontevedra, J.A., and Cela, R. (2012) A binary-like approach for the computer assisted method development of isocratic and programmed ternary solvent elutions in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **50**, 33–42.
- 10 Nikitas, P. and Pappa-Louisi, A. (2009) Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1737–1755.
- 11 Jandera, P. (1998) Optimisation of gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **797**, 11–22.
- 12 Bosch, E., Bou, P., and Rosés, M. (1994) Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Anal. Chim. Acta*, **299**, 219–229.
- 13 Torres-Lapasió, J.R., García-Alvarez-Coque, M.C., Rosés, M., and Bosch, E. (2002) Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute–mobile phase–stationary phase polarity parameters. *J. Chromatogr. A*, **955**, 19–34.
- 14 Schoenmakers, P.J. and Tijssen, R. (1993) Modelling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes. *J. Chromatogr. A*, **656**, 577–590.
- 15 Torres-Lapasió, J.R., García-Alvarez-Coque, M.C., Bosch, E., and Rosés, M. (2005) Considerations on the modelling and optimisation of resolution of ionisable compounds in extended pH-range

- columns. *J. Chromatogr. A*, **1089**, 170–186.
- 16 Rimmer, C.A., Simmons, C.R., and Dorsey, J.G. (2002) The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **965**, 219–232.
- 17 Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J.R., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2009) Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **32**, 1065–1083.
- 18 Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J.R., Baeza-Baeza, J.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2009) Alternating iterative regression method for dead time estimation from experimental designs. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 625–636.
- 19 Dolan, J.W. (2002) Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **965**, 195–205.
- 20 Heinisch, S. and Rocca, J.L. (2009) Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 642–658.
- 21 Baeza-Baeza, J.J., Dávila, Y., Fernández-Navarro, J.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2012) Measurement of the elution strength and peak shape enhancement at increasing modifier concentration and temperature in RPLC. *Anal. Bioanal. Chem.*, **404**, 2973–2984.
- 22 Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J.R., Baeza-Baeza, J.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2007) Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. *J. Chromatogr. A*, **1163**, 49–62.
- 23 Martin, M. and Guiochon, G. (2005) Effects of high pressure in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1090**, 16–38.
- 24 Fekete, S., Veuthey, J.L., McCalley, D.V., and Guillarme, D. (2012) The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1270**, 127–138.
- 25 Svec, F. and Huber, C.G. (2006) Monolithic materials: promises, challenges, achievements. *Anal. Chem.*, **78** (2006), 2100–2107.
- 26 Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J.R., Ruiz-Angel, M.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2010) Origin and correction of the deviations in retention times at increasing flow rate with Chromolith columns. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5440–5443.
- 27 Fallas, M.M., Hadley, M.R., and McCalley, D.V. (2009) Practical assessment of frictional heating effects and thermostat design on the performance of conventional (3 μm and 5 μm) columns in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3961–3969.
- 28 Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J.R., Ruiz-Angel, M.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2011) Correction of the deviations in the retention times with Chromolith columns associated to the flow rate: implications in the modelling of the retention behaviour. *J. Sep. Sc.*, **34**, 931–938.
- 29 Concha-Herrera, V., Vivó-Truyols, G., Torres-Lapasió, J.R., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2004) Enhancement of retention predictions in reversed-phase liquid chromatography using reference compounds. *Anal. Chim. Acta*, **518**, 191–197.
- 30 Snyder, L.R. and Dolan, J.W. (2007) *High-Performance Gradient Elution*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- 31 Snyder, L.R. and Dolan, J.W. (1998) The linear solvent strength model of gradient elution. *Adv. Chromatogr.*, **38**, 115–185.
- 32 Cela, R., Ordoñez, E.Y., Quintana, J.B., and Rodil, R. (2013) Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1287**, 2–22.
- 33 Torres-Lapasió, J.R., Baeza-Baeza, J.J., and García-Alvarez-Coque, M.C. (1997) A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks. *Anal. Chem.*, **69**, 3822–3831.
- 34 Baeza-Baeza, J.J., Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., and García-Alvarez-Coque, M.C. (2013) Half-width plots, a simple tool to predict peak shape, reveal column

- kinetics and characterize chromatographic columns in liquid chromatography: state of the art and new results. *J. Chromatogr. A*, **1314**, 142–153.
- 35 Siouffi, A.M. and Phan-Tan-Luu, R. (2000) Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **892**, 75–106.
- 36 Molnár, I. (2002) Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software. *J. Chromatogr. A*, **965**, 175–194.
- 37 Galushko, S.V., Kamenchuk, A.A., and Pit, G.L. (1994) Calculation of retention in reversed-phase liquid chromatography. IV. ChromDream software for the selection of initial conditions and for simulating chromatographic behaviour. *J. Chromatogr. A*, **660**, 47–59.
- 38 Cela, R. and Lores, M. (1996) PREOPT-W: a simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC. I. Fundamentals and overview. *Comput. Chem.*, **20**, 175–191.
- 39 Heinisch, S., Lesellier, C., Podevin, C., Rocca, J.L., and Tchaplá, A. (1997) Computerized optimization of RP-HPLC separation with nonaqueous or partially aqueous mobile phases. *Chromatographia*, **44**, 529–537.
- 40 Lesellier, E. and West, C. (2007) Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification. *J. Chromatogr. A*, **1158**, 329–360.
- 41 Vitha, M. and Carr, P.W. (2006) The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1126**, 143–194.
- 42 Put, R. and Vander Heyden, Y. (2007) Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure-retention relationships. *Anal. Chim. Acta*, **602**, 164–172.
- 43 Neue, U.D. (2007) Stationary phase characterization and method development. *J. Sep. Sc.*, **30**, 1611–1627.
- 44 Snyder, L.R., Dolan, J.W., and Carr, P.W. (2007) A new look at the selectivity of RPC columns. *Anal. Chem.*, **79**, 3254–3262.
- 45 Zhang, Y. and Carr, P.W. (2009) A visual approach to stationary phase selectivity classification based on the Snyder–Dolan hydrophobic-subtraction model. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6685–6694.

UNCORRECTED PROOF



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography

J.J. Baeza-Baeza*, C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2012
Received in revised form 16 January 2013
Accepted 17 January 2013
Available online 25 January 2013

Keywords:

Reversed-phase liquid chromatography
Gradient elution
Integration of the general gradient equation
Semi-empirical integration approach
Peak profile prediction

ABSTRACT

The optimisation of the experimental conditions in gradient reversed-phase liquid chromatography requires reliable algorithms for the description of the retention and peak profile. As in isocratic elution, the linear relationship between the logarithm of the retention factor and the solvent contents is only acceptable in relatively small concentration ranges of modifier. However, more complex models may not allow an analytical integration of the general equation for gradient elution. Alternative approaches for modelling the retention in linear gradient elution are here proposed. Those based on the quadratic logarithmic model and a model proposed for normal liquid chromatography yielded accurate predictions of the retention time for a wide range of initial concentrations of organic modifier and gradient slopes, with errors usually below 1–2%. Based on the half-width changes of chromatographic peaks along one or more gradients, an approach is also reported to predict the peak profile with low errors (usually below 2–3%). The proposed approaches were applied to two sets of probe compounds (diuretics and flavonoids), eluted with acetonitrile–water gradients. The changes in retention and peak shape in isocratic and gradient elution are illustrated through diagrams that define triangular regions including all possible values of retention factors or peak half-widths (or widths) inside the selected working ranges.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In reversed-phase liquid chromatography (RPLC), the separation of mixtures of compounds covering a wide range of polarities cannot be performed within practical analysis times using isocratic elution. Reasonable times require gradient elution [1–3]. In the last decade, several authors have proposed approaches for the prediction of the retention in this elution mode [4–14] that complement and improve previous reports in the field [2,15]. The sources of uncertainty in gradient predictions [16–21], or the transference of data between isocratic and gradient elution [18,22,23], have been also topics of interest.

The general equation for gradient elution, derived from work carried out by Freiling [24,25] and Drake [26], and later presented by Snyder [22], requires solving the following integral equation:

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \left(\frac{dt_c}{k(\varphi(t_c))} \right) \quad (1)$$

where t_c is a corrected time that considers the changes in the concentration of organic modifier (φ) at the point where the solute is located inside the column at a given time, t_0 is the retention time for

an unretained solute, and t_g the retention time under gradient conditions (the variable that should be predicted). The function $k(\varphi(t_c))$ describes the variation of the retention factor (k) as a function of the composition of the mobile phase along the solute migration inside the column. Note that Eq. (1) is considering that the gradient reaches instantaneously the column inlet (i.e. there is no delay associated to the dwell time). Later, this effect will be added to the treatment.

Eq. (1) can be solved analytically only in a few cases; for instance, when both $\ln k(\varphi)$ and $\varphi(t_c)$ functions are linear:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (2)$$

$$\varphi = \varphi_0 + mt_c \quad (3)$$

where k_w is the retention factor in water, S the so-called elution strength, φ_0 the initial concentration of modifier at the column inlet, and m the gradient slope:

$$m = \frac{\Delta\varphi}{t_G} \quad (4)$$

where $\Delta\varphi$ is the difference between the final and initial concentrations of organic modifier during the gradient, and t_G the total gradient time. The combination of Eqs. (2) and (3) is the basis of the linear solvent strength theory [1–3,27], which may be extended to the construction of several consecutive linear segments (i.e. multi-linear gradients) [5,12,17,28].

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3184; fax: +34 96 354 4436.
E-mail address: Juan.Baeza@uv.es (J.J. Baeza-Baeza).

Eq. (2) describes the retention accurately only in relatively narrow organic modifier concentration ranges [16,18,21,29]. For wider ranges, a quadratic term should be added to get a proper description:

$$\ln k = \ln k_w - a\varphi + b\varphi^2 \quad (5)$$

where a and b are model parameters (one more parameter with respect to Eq. (2)). A limitation of this equation when used in gradient elution is that the analytical integration of Eq. (1) depends on the error function [30]. Other models present similar limitations. One example is a model that has attracted some attention in recent time that considers the difference in polarity of mobile phase and stationary phase [31]. For acetonitrile–water mixtures:

$$\ln k = \ln a - b \frac{2.068\varphi}{1 + 1.341\varphi} \quad (6)$$

where a and b are model parameters.

Independently of the retention model, the analytical integration cannot be performed when the change in the concentration of organic modifier with time is non-linear (i.e. non-linear gradients). It should be noted, however, that the problem with non-linear gradients can be satisfactorily solved by approximating them as summations of several linear segments [5,12,28]. In an interesting approach, proposed by Cela et al., non-linear gradients are assimilated to multi-step gradients [32–34].

In any case, when the analytical integration of Eq. (1) is not possible, the numerical integration is still a suitable solution [35,36], which is a fully flexible universal approach, and therefore, it is preferred by some analysts. However, its computation is somewhat slower and requires programming skills. In contrast, the analytical integration (when possible) is rapid, and the expressions are relatively simple. In this work, we present an alternative approach to predict the retention in RPLC with linear gradients, using the quadratic and polarity models. An approach that estimates with high accuracy the peak half-widths under gradient elution is also proposed to enhance the reliability of the predicted chromatograms.

2. Theory

2.1. Analytical equations based on integrable retention models to describe gradient elution

2.1.1. Solvent strength model

Let us revise the integration of Eq. (1) when the gradient elution is described by the linear solvent strength model (i.e. linear retention model and linear elution profile). From Eqs. (2) and (3):

$$k = k_w e^{-S\varphi} = k_w e^{-S(\varphi_0 + m t_c)} = k_w e^{-S\varphi_0} e^{-S m t_c} = k_0 e^{-S m t_c} \quad (7)$$

In Eq. (1), we have assumed that the gradient front reaches instantaneously the column inlet. However, actually, the solute is eluted isocratically until the gradient reaches it. Therefore, the elution will consist of at least two steps: an initial isocratic step, and the gradient itself. From Eqs. (1) and (7):

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt_c}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g-t_0} \frac{dt_c}{k_0 e^{-S m (t_c - t_d)}} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{1}{S m k_0} [e^{S m (t_g - t_0 - t_d)} - 1] \quad (8)$$

where t_d is the dwell time, and k_0 the retention factor for the initial gradient conditions:

$$k_0 = e^{\ln k_w - S\varphi_0} \quad (9)$$

From Eq. (8), the retention time in gradient elution will be obtained as:

$$t_g = \frac{\ln [1 + S m (k_0 t_0 - t_d)]}{S m} + t_0 + t_d \quad (10)$$

A practical way to compute the retention in gradient elution is considering a retention factor analogous to that for isocratic elution:

$$k_g = \frac{t_g - t_0}{t_0} = \frac{\ln [1 + S m (k_0 t_0 - t_d)]}{S m t_0} + \frac{t_d}{t_0} = \frac{\ln [1 + S m t_0 (k_0 - f)]}{S m t_0} + f \quad (11)$$

2.1.2. Jandera's model for normal-phase liquid chromatography

It is worth to comment here the performance of a model proposed by Jandera for normal-phase liquid chromatography [37,38], which also allows an analytical integration of Eq. (1):

$$\frac{1}{k} = [a + b\varphi]^n \quad (12)$$

where a , b and n are model parameters. In this work, we apply Eq. (12) to RPLC. From Eq. (1):

$$t_0 = \int_0^{t_d} \frac{dt_c}{k_0} + \int_{t_d}^{t_g-t_0} \frac{dt_c}{[a + b(\varphi_0 + m(t_c - t_d))]^n} = \frac{t_d}{k_0} + \frac{[a_0 + b m (t_g - t_0 - t_d)]^{n+1} - a_0^{n+1}}{(n+1) b m} \quad (13)$$

where

$$a_0 = a + b\varphi_0 \quad (14)$$

The retention factor under gradient conditions will be computed as:

$$k_g = \frac{[(t_0 - t_d/k_0)(n+1) b m + a_0^{n+1}]^{1/(n+1)} - a_0}{b m t_0} + \frac{t_d}{t_0} \quad (15)$$

2.2. Approaches to describe gradient elution based on more complex retention models

When the retention in RPLC is extended to wide ranges of concentration of organic modifier, the behaviour is non-linear. Nonetheless, its complexity is not much greater than the linear behaviour (see Fig. 1). Under this consideration, we thought in the possibility of developing a new approach to describe the retention under gradient elution, based on the integral equation obtained for the linear model (Eq. (11)). In this approach, it is assumed that:

- (i) The retention behaviour under gradient elution is formally similar to Eq. (11).
- (ii) A similar parameter to S , the minus slope of the logarithmic linear model (Eq. (2)), is the derivative of $\ln k(\varphi)$ for the non-linear models (Eqs. (5) and (6)), at the initial gradient condition, S' . For Eq. (5):

$$S' = - \left(\frac{d \ln k}{d \varphi} \right)_0 = (a - 2b\varphi_0) \quad (16)$$

We found that the following hyperbolic relationship between f (see Eq. (11)) and φ_0 improved the model performance:

$$f = \frac{1 - \varphi_0}{\varphi_0} \frac{c}{t_0} \quad (17)$$

where c is a model parameter. This relationship was found by fitting gradient experimental measurements to Eq. (11) with variable

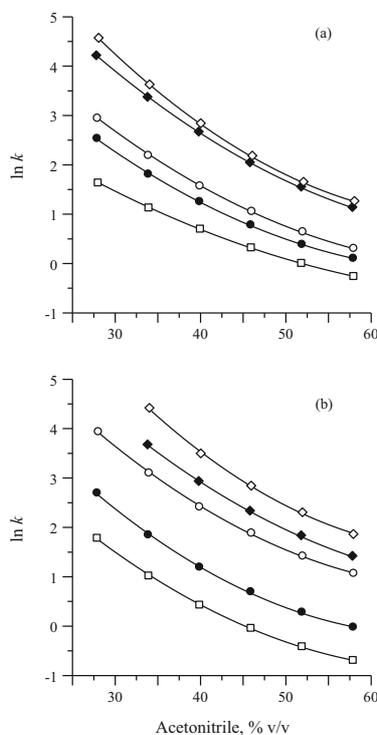


Fig. 1. Retention behaviour in isocratic elution for: (a) diuretics, and (b) flavonoids. Diuretics: trichloromethiazide (\square), althiazide (\bullet), furosemide (\circ), xipamide (\blacklozenge) and ethacrynic acid (\diamond). Flavonoids: quercetin (\square), baicalein (\bullet), flavone (\circ), 3-hydroxyflavone (\blacklozenge), and 5-hydroxyflavone (\diamond). The points are experimental data and the lines correspond to the fitting to Eq. (5).

gradient slopes and the same initial concentration of organic modifier.

According to assumptions (i) and (ii), and Eq. (17), we propose the following equation to describe the gradient retention factor based on Eq. (5):

$$k_g = \frac{\ln [1 - (d \ln k / d \varphi)_0 m t_0 (k_0 - f)]}{-(d \ln k / d \varphi)_0 m t_0} + f$$

$$= \frac{\ln [1 + (a - 2b\varphi_0) m t_0 (k_0 - (1 - \varphi_0)c / (\varphi_0 t_0))]}{(a - 2b\varphi_0) m t_0}$$

$$+ ((1 - \varphi_0)c / (\varphi_0 t_0)) \quad (18)$$

where

$$k_0 = e^{\ln k_w - a\varphi_0 + b\varphi_0^2} \quad (19)$$

Similarly, for the polarity model:

$$k_g = \frac{\ln [1 + (2.068b / (1 + 1.341\varphi_0^2)) m t_0 (k_0 - (1 - \varphi_0)c / (\varphi_0 t_0))]}{(2.068b / (1 + 1.341\varphi_0^2)) m t_0}$$

$$+ ((1 - \varphi_0)c / (\varphi_0 t_0)) \quad (20)$$

where

$$k_0 = e^{\ln a - b \frac{2.068\varphi_0}{1 + 1.341\varphi_0^2}} \quad (21)$$

3. Experimental

3.1. Reagents and columns

The isocratic and gradient elution was studied for two sets of probe compounds: the diuretics furosemide (FURO), althiazide (ALT), and trichloromethiazide (TCLM), purchased from Sigma (St. Louis, MO); ethacrynic acid (ETHA), kindly donated by Merck, Sharp & Dohme (Madrid, Spain); and xipamide (XIPA), kindly donated by Lacer (Barcelona, Spain); and the flavonoids baicalein (BAI), flavone (FLA), 3-hydroxyflavone (3OH), 5-hydroxyflavone (5OH), and quercetin (QUE), purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The diuretics and flavonoids were dissolved in a few millilitres of HPLC-grade methanol and acetonitrile, respectively, both from Scharlau (Barcelona, Spain). These solutions were further diluted with water to reach the concentrations of the stock and injected solutions (100 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively), and stored in the darkness at 4 °C.

In all cases, the mobile phases were prepared with HPLC-grade acetonitrile. For diuretics, the acetonitrile concentration in isocratic elution ranged between 28% and 56% (v/v). In gradient elution, the initial acetonitrile concentration ranged between 22% and 52% (v/v), and the gradient slopes between 0.2% and 1.33% acetonitrile/min. For flavonoids, both acetonitrile concentration in isocratic elution and initial acetonitrile concentration in gradient elution ranged between 28% and 58%, and the gradient slopes between 0.4% and 1.6% acetonitrile/min. The eluents were buffered at pH 3 using 0.01 M citric acid from Panreac (Barcelona) and NaOH from Scharlau.

Nanopure water obtained with a Barnstead purification system from Sybron (Boston, MA) was used throughout. Mobile phases and probe compound solutions were filtered through 0.45 μm Nylon membranes with a diameter of 47 mm (Magna) and 17 mm (Cameo), respectively, from Osmonics (Herentals, Belgium).

For diuretics, the separation was carried out with a Spherisorb ODS-2 C18 column (125 mm \times 4.6 mm, 5 μm particle size) from Scharlau. For flavonoids, a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (150 \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) from Agilent (Waldbronn, Germany) was used. Both columns were protected with pre-columns of similar characteristics (30 mm \times 4.0 mm, 5 μm particle size). The dead time was measured from the first perturbation in the chromatogram, with mean values of 0.84 and 1.18 min for the Spherisorb and Zorbax columns, respectively. The dwell time was 0.88 min.

3.2. Apparatus

The HPLC system was equipped with the following modules from Agilent quaternary pump, autosampler, thermostated column compartment and UV-visible detector (Series 1100, 1200 and 1260). The signals were monitored at 254 nm and the temperature was 25 °C. The flow rate was in all cases 1 ml/min. Triplicate injections (10 μL) were carried out for all compounds.

The pH was measured with a precision of ± 0.002 pH units, using a potentiometer from Crison (Model MicropH 2002, Barcelona), and a combined glass electrode containing Ag/AgCl reference electrodes with 3.0 M KCl aqueous solution as salt bridge from Orion (Model 8102, Barcelona). The electrode was calibrated with aqueous buffers, and the pH of the mobile phases was measured after the addition of the organic solvent.

Table 1
Fitting relative errors (%) in the prediction of retention in isocratic elution using different retention models.^a

Compound	Eq. (2)	Eq. (12)	Eq. (5)	Eq. (6)
Diuretics				
TCLM	5.70	0.42	0.64	2.08
ALT	7.91	0.32	1.11	4.05
FURO	6.94	0.37	0.81	3.17
XIPA	5.64	0.42	0.43	2.09
ETHA	6.51	0.55	0.55	3.15
Flavonoids				
QUE	9.03	0.37	1.36	5.25
BAI	8.75	0.58	1.19	5.26
FLA	7.27	0.48	0.81	3.81
3OH	5.28	0.17	0.53	2.53
5OH	7.40	0.48	1.59	4.68

^a Six points were fitted. The number of model parameters was two for Eqs. (2) and (6), and three for Eqs. (5) and (12).

Data acquisition was carried out with an HPChemStation from Agilent. The algorithms were implemented in Basic using the QB64 compiler (free software) and the Solver tool of the Excel spreadsheet.

4. Results and discussion

The retention time ranges for the probe compounds, eluted under isocratic and gradient elution, were rather wide: between 1.5 min and 83 min for diuretics, and between 1.7 min and 94 min for flavonoids. The asymmetry factors at 10% peak height (ratio of the right to the left half-width, B/A) were usually below 1.5. The quality of the fittings of the experimental data of diuretics and flavonoids to the models described in Section 2 is first indicated. Next, the description of peak profiles in isocratic and gradient elution will be discussed.

4.1. Retention behaviour and models in isocratic elution

Fig. 1 depicts, for the two sets of probe compounds, the change in the logarithm of the retention factor as a function of the acetonitrile concentration in isocratic elution. The fitting errors for the four retention models considered in this work (Eqs. (2), (5), (6) and

Table 2
Fitting relative errors (%) in the prediction of retention in gradient elution using different integrated equations.^a

Compound	Eq. (11)	Eq. (15)	Eq. (18)	Eq. (20)
Diuretics^b				
TCLM	6.56 (6.86)	0.42 (0.49)	0.75 (0.83)	1.74 (1.79)
ALT	5.51 (5.84)	0.50 (0.53)	0.82 (0.84)	1.89 (2.36)
FURO	3.89 (4.53)	0.53 (0.56)	0.78 (0.78)	1.19 (1.83)
XIPA	1.70 (4.02)	0.45 (0.49)	0.47 (0.47)	0.79 (1.67)
ETHA	1.89 (5.27)	0.39 (0.45)	0.46 (0.55)	1.19 (2.69)
Flavonoids^c				
QUE	7.45 (7.79)	1.38 (1.66)	1.11 (1.65)	4.82 (4.29)
BAI	6.05 (7.57)	0.86 (1.13)	0.88 (1.71)	3.09 (4.66)
FLA	3.81 (8.12)	0.49 (0.74)	0.67 (1.20)	2.22 (4.38)
3OH	2.89 (4.33)	0.33 (0.67)	0.71 (1.00)	1.93 (2.50)
5OH	2.01 (6.43)	0.27 (0.81)	0.77 (1.29)	1.74 (3.83)

^a Data in parenthesis correspond to the fitting of the whole set of isocratic and gradient data. The number of model parameters was three for Eqs. (11) and (20), and four for Eqs. (15) and (18).

^b 26 Points were fitted (or 32 points including the isocratic data).

^c 23 Points were fitted (or 29 points including the isocratic data).

(12)) are compared in Table 1. The errors were evaluated according to:

$$\varepsilon_r(\%) = \frac{\sum_i^n |k_i - \hat{k}_i|}{\sum_i^n k_i} \times 100 \quad (22)$$

where k_i refers to the retention factors of solutes in either isocratic and gradient elution. The mean fitting errors with Eqs. (2), (12), (5), and (6) were 6.5%, 0.4%, 0.7% and 2.9% for diuretics, and 7.5%, 0.4%, 1.1% and 4.3% for flavonoids, respectively. The parabolic fittings with Eq. (5) were highly satisfactory, as shown in Fig. 1. However, Eq. (12) yielded the most accurate fittings. It should be noted that to get these results, the a parameter in Eq. (12) should be allowed to have negative values.

4.2. Retention behaviour in gradient elution

Fig. 2a and b illustrate, for xipamide and 3-hydroxyflavone, the change in the logarithm of the retention factor for different gradients, as a function of the initial concentration of acetonitrile. The lines correspond to different gradient slopes (indicated on each line). The upper and lower lines correspond to isocratic elution and the fastest gradient, respectively. These lines define a triangular region ("elution triangle") delimiting all possible values of retention factor for a given solute in the working conditions. Fig. 2c and d show the "elution triangles" for probe compounds of diverse polarity (only the data for the extreme conditions are shown).

The "elution triangle" constitutes a simple global description of the effect of the gradient conditions on the retention (i.e. the progressive decrease in retention). As should be known, the effect of the gradient is larger for the most retained solutes, and practically null for those weakly retained. In consequence, the triangle is wider for more apolar compounds. On the other hand, the diagrams in Fig. 2 illustrate that the gradient will be more effective (i.e. the relative reduction of retention will be larger) when the initial percentage of the organic modifier, φ_0 , is smaller. Hence, the triangular shape of the diagram. Thus, for xipamide, the effect of different gradients is similar for $\varphi_0 > 40\%$, whereas for a more strongly retained solute (ethacrynic acid) and a less retained solute (furosemide), the φ_0 value below which the gradient is effective will be larger or smaller, respectively (Fig. 2c). For example, in the case of ethacrynic acid, for $\varphi_0 = 28\%$, the retention factor will decrease from $k = 97.6$ in isocratic elution ($m = 0$) to 25.9 for $m = 0.8\%/min$ ($\Delta k_g = 72.7$), whereas if $\varphi_0 = 52\%$ it will decrease only $\Delta k_g = 5.27 - 4.99 = 0.28$. For xipamide, the retention factor will decrease $\Delta k_g = 66.2 - 23.6 = 42.6$, and $4.62 - 4.41 = 0.21$, and for furosemide, $19.1 - 12.6 = 6.5$ and $1.89 - 1.86 = 0.03$, for $\varphi_0 = 28\%$ and 52%, respectively, and the same gradient slope range (from $m = 0$ to 0.8%/min).

4.3. Accuracy of the retention models in gradient elution

The implementation of the four models discussed in this work (the linear and quadratic models, the model proposed by Jandera and the polarity model) is similar (i.e. the difficulties are similar), with the difference that the minimal number of experiments needed to fit the models is three for Eqs. (11) and (20), and four for Eqs. (15) and (18) (the same number as model parameters). Note that for all models, t_g was considered an adjustable parameter. This increased the accuracy of the predictions. As for any non-linear fitting, the initial values of the parameters should be conveniently selected. For this purpose, the isocratic parameters (if available)

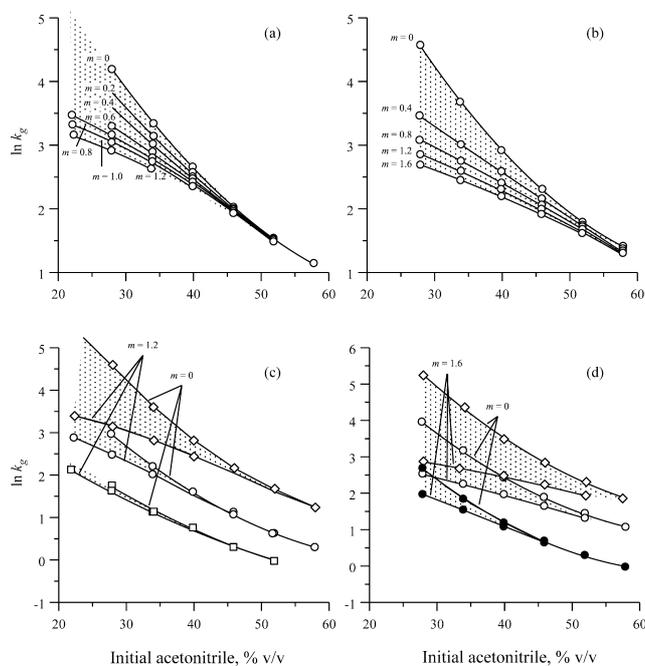


Fig. 2. Retention behaviour in gradient elution at different initial concentrations of acetonitrile (φ_0) and different gradient slopes (m): (a) xipamide, (b) 3-hydroxyflavone, (c) the diuretics trichloromethiazide, furosemide, and ethacrynic acid; and (d) the flavonoids baicalein, flavone and 5-hydroxyflavone. See Fig. 1 for symbols in (c) and (d). The gradient slopes (% acetonitrile/min) are indicated on each line, which were fitted according to Eq. (18). For isocratic elution, $m=0$.

can offer good initial values. The whole process can be carried out with the Solver tool of the Excel spreadsheet.

The fitting errors for the four retention models given in Section 2.1 for gradient elution (Eqs. (11), (15), (18) and (20)) are compared in Table 2. Either the gradient data or both gradient and isocratic data altogether were fitted (note that isocratic elution is a particular case of gradient elution, where $m=0$). For avoiding indeterminations, the fitting of isocratic data to the gradient equations was performed assigning a small value to the gradient slope, such as $m=10^{-6}$, instead of $m=0$.

The mean fitting errors with Eqs. (11), (15), (18) and (20) were 3.9%, 0.5%, 0.7% and 1.4% for diuretics, and 4.4%, 0.7%, 0.8% and 2.8%

for flavonoids, respectively. When the data obtained in isocratic elution were also included, the mean fitting errors were somewhat larger: 5.3%, 0.5%, 0.7% and 2.1% for diuretics, and 6.8%, 1.0%, 1.4% and 3.9% for flavonoids, respectively. As observed, the results of the fitting of the experimental data to Eqs. (15) and (18), which are derived from Eqs. (12) and (5), respectively, were excellent, with errors usually below 1%. The accuracy of the fitting to Eq. (18) can be also appreciated in Fig. 2. On the other hand, if the initial concentration of acetonitrile is kept constant (i.e. k_0 and φ_0 are fixed), a simpler gradient model, with only three parameters (q , p

Table 3
Fitting relative errors (%) in the prediction of gradient retention from isocratic data.

Compound	Eq. (15) ^a	Eq. (18) ^b
Diuretics		
TCLM	1.79	1.58
ALT	1.33	2.34
FURO	1.31	2.23
XIPA	0.89	0.78
ETHA	0.64	1.78
Flavonoids		
QUE	2.42	3.88
BAI	1.80	4.22
FLA	2.17	1.59
3OH	2.30	2.21
5OH	3.35	6.19

^a Fitted $t_d = 1.5$; ^b $c = 0.12 \ln k_w$.

Table 4
Fitting relative errors (%) in the prediction of half-widths and width using Eq. (29).^a

Compound	A	B	W
Diuretics ^b			
TCLM	1.08	1.23	1.11
ALT	0.89	1.97	1.39
FURO	1.11	1.43	1.27
XIPA	1.59	4.04	1.89
ETHA	1.50	2.51	2.11
Flavonoids ^c			
QUE	2.44	3.13	2.62
BAI	2.30	1.84	1.84
FLA	1.96	4.55	2.81
3OH	0.87	2.37	1.56
5OH	2.61	2.28	1.70

^a When no available, the isocratic retention time was predicted with Eq. (12).

^b 32 Points were fitted.

^c 29 Points were fitted.

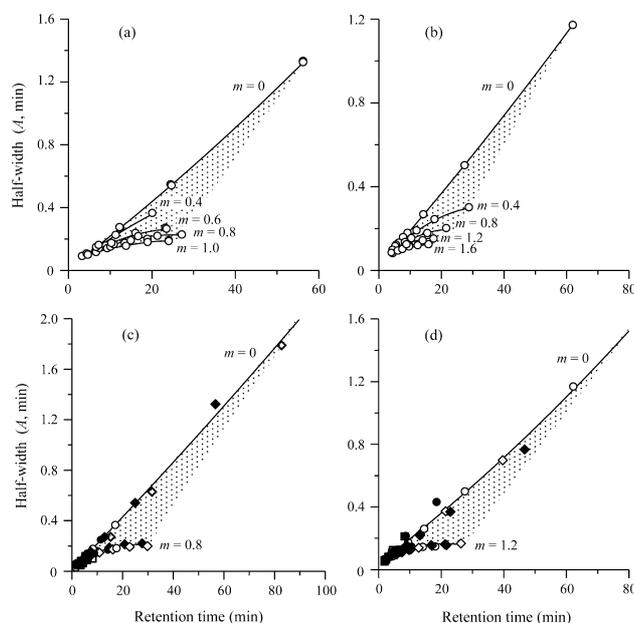


Fig. 3. Left half-width plots (at 10% peak height) at different initial concentrations of acetonitrile (points along the lines) and gradient slopes (different lines) for: (a) xipamide, (b) 3-hydroxyflavone, (c) whole set of diuretics, and (d) whole set of flavonoids. See Fig. 1 for symbols in (c) and (d). The gradient slopes (% acetonitrile/min) are indicated on each line. For isocratic elution, $m=0$.

and f), can be derived from Eqs. (11), (18) and (20). For example, from Eq. (11):

$$k_g = \frac{\ln[1 + St_0(k_0 - f)m]}{St_0m} + f = \frac{\ln(1 + qpm)}{qm} + f \quad (23)$$

The performance of this equation for xipamide (eluted under different gradient slopes and initial concentrations of acetonitrile (φ_0)) was checked to be highly satisfactory, with relative errors (ε_r) of 0.18, 0.05, 0.34, 0.25 and 0.28%, for $\varphi_0 = 28, 34, 40, 46$ and 52% acetonitrile, respectively. In practice, a good way of developing a gradient plan consists of finding an appropriate φ_0 value to retain reasonably the most polar solute, and in a further step, optimize the gradient slope. This calculation can be carried out easily with Eq. (23).

It should be remarked that the proposed models for gradient elution describe the two elution modes (isocratic and gradient), with small errors. This fact suggested the possibility that the model parameters could be obtained using exclusively isocratic retention data to further predict the retention in gradient elution. Table 3 shows the predictive capability of Eqs. (15) and (18) (mean prediction errors for all gradient data obtained for this work), when the retention factors for gradient elution are predicted using isocratic data to fit the model. As observed, the predictions were rather satisfactory.

4.4. Description of peak profiles

Gradient elution can give rise to a significant reduction of peak width, owing to the compressibility effect [39–41]. Fig. 3a and b show the change in the left peak half-width at 10% peak height versus the retention time, for xipamide and 3-hydroxyflavone

eluted under different initial concentrations of acetonitrile and gradient slopes. Similar diagrams can be drawn for the right half-width and width. As observed, the plots are almost linear for isocratic elution ($m=0$), where the intercept corresponds mainly to the extra-column broadening. The peak half-widths decrease remarkably when the gradient slope is increased, but above a given slope, the changes with the retention time become non-significant. The figures depict “peak profile triangles”, which delimit all half-width or width values in the working condition range. The triangle describes in a simple and global way the known behaviour in gradient elution: for highly retained solutes, an increased gradient slope is very effective to decrease the peak width, whereas for weakly retained solutes, no changes are obtained. The behaviour is similar to that observed with the retention. The peak half-widths for the whole set of diuretics and flavonoids are plotted in Fig. 3c and d, respectively. As observed, the experimental points could be fitted to the same line as in the case of eluting a compound with different acetonitrile concentrations (Fig. 3a and b), although some scattering is here observed (especially for flavonoids), which can be interpreted as due to different solute partitioning kinetics. For solutes with a particular kinetics, the peak half-widths should be described using specific models for each solute. With compounds exhibiting similar kinetics, fitting all data to the same trend is more practical.

4.5. Modelling of peak profiles in isocratic and gradient elution

To evaluate the resolution of complex samples and achieve reliable optimal experimental conditions in gradient elution, not only the retention should be accurately predicted, but also a proper

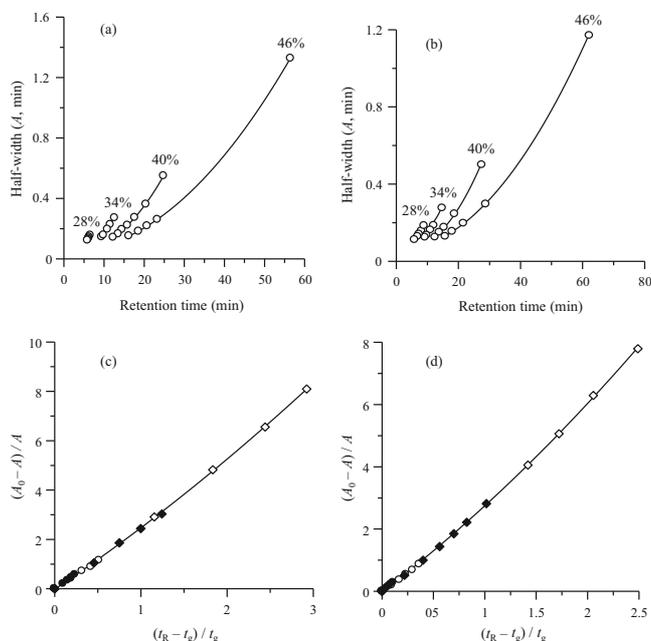


Fig. 4. Left half-width plots (at 10% peak height) at different gradient slopes (points along the lines) and initial concentrations of acetonitrile (different lines) for: (a) xipamide, and (b) 3-hydroxyflavone. The whole set of data (isocratic and gradient elution) are represented in (c) and (d) for diuretics and flavonoids, respectively. See Fig. 1 for symbols in (c) and (d). The initial concentrations of acetonitrile (% v/v) in (a) and (b) are indicated on each line, and the curves in (c) and (d) were fitted according to Eq. (29). In (c) and (d), A_0 and t_{R0} and A and t_R are the left half-width and the retention time in isocratic and gradient conditions, respectively.

prediction of the peak width (or half-widths) is convenient, in spite of the peak compressibility effect. In previous work, we proposed an empirical dependence to predict with good accuracy the half-widths at a given retention time under isocratic conditions [42,43]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_{11} t_R^2 \quad (24)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_{11} t_R^2 \quad (25)$$

where t_R is the retention time, and a_0 , a_1 , a_{11} , b_0 , b_1 and b_{11} are model parameters. A similar equation can be written for the peak width:

$$W = w_0 + w_1 t_R + w_{11} t_R^2 \quad (26)$$

The parabolas described by Eqs. (24)–(26) can be often approximated to straight-lines (upper lines in Fig. 3). In contrast, in gradient elution the half-widths (or widths) are described by parabolas that tend to constant values for high gradient slopes and sufficiently high retention times (all other lines in Fig. 3). The lines in these figures were obtained by keeping the gradient slope constant and varying the initial concentration of acetonitrile. A parabolic behaviour was also observed by keeping the initial concentration of acetonitrile constant and varying the gradient slope (Fig. 4a and b). From this observation, we have derived the following model to describe the peak profile in gradient elution (a similar model can be written for the right half-width and width):

$$\frac{A_0 - A}{A} = b \left(\frac{t_R - t_{R0}}{t_g} \right) + c \left(\frac{t_R - t_{R0}}{t_g} \right)^2 \quad (27)$$

where A_0 and t_{R0} , and A and t_R are the left half-width and retention time in isocratic and gradient conditions, respectively. In the equation, the percentage of organic modifier in isocratic conditions is assumed to be the same as that one at the beginning of the gradient. The data in Fig. 4a and b are redrawn in Fig. 4c and d to show how $(A_0 - A)/A$ changes against the ratio $(t_R - t_{R0})/t_g$. A unique curve (almost linear for diuretics) was obtained for the whole set of probe compounds, eluted using different initial concentrations of organic modifier and gradient slopes, including the isocratic data. This behaviour agrees with the Jandera's comment in Ref. [44], indicating that "the width of a solute band eluted under gradient conditions can be considered to be approximately equal to the band width in isocratic chromatography with a mobile phase of the same composition as the instantaneous composition in gradient elution chromatography, at the time of the elution maximum of the solute band".

Eq. (27) can be rearranged as:

$$A = \frac{A_0}{1 + a(t_R - t_{R0})/t_g + b((t_R - t_{R0})/t_g)^2} \quad (28)$$

Such equation has the drawback of requiring the isocratic values A_0 and t_{R0} . However, it may happen that all available data correspond to gradient elution. In this case, the following equation can be used:

$$A = \frac{a_0 + a_1 t_R + a_{11} t_R^2}{1 + a(t_R - t_g)/t_g + b((t_R - t_g)/t_g)^2} \quad (29)$$

which combines Eqs. (24) and (28), a_0 , a_1 , a_{11} , a and b being model parameters. In Eq. (29), the t_R and t_g data at different initial concentrations of acetonitrile and gradient slopes can be obtained from the equations describing the gradients (Eqs. (11), (15), (18) or (20)). Alternatively, if several isocratic data are available, t_R can be obtained from the fitted retention models for isocratic elution. The fitting errors for Eq. (29) using all available data for diuretics and flavonoids are given in Table 4. The mean fitting errors for the left and right half-widths, and for the width, were 1.2%, 2.2%, and 1.5% for diuretics, and 2.0%, 2.8%, and 2.1%, for flavonoids, respectively.

5. Conclusions

Although the linear logarithmic model (Eq. (2)) is widely used to predict the retention in gradient liquid chromatography due to its simplicity, at least three other models allow better accuracy, especially in wide ranges of organic modifier contents (Eqs. (5), (6), and (12)). The most familiar of these models is the quadratic logarithmic model (Eq. (5)), which is widely used in isocratic elution. However, its analytical integration to describe gradients is not straightforward. A semi-empirical integration is here proposed, based on the similarities of the linear and quadratic trends, with prediction errors similar to those obtained in isocratic elution. The approach can be also applied to other models, as the so-called polarity model (Eq. (6)). Another model, which allows an analytical integration, initially proposed by Jandera for normal liquid chromatography (Eq. (12)), offers excellent predictions in RPLC gradient elution. This work also demonstrates that a unique equation (Eq. (29)) allows the prediction of peak profiles in both elution modes with low errors. The same fitted model can be used for a set of compounds exhibiting similar partitioning kinetics in a given column.

The range of retention times and peak widths expected in isocratic and gradient elution can be conveniently illustrated through plots of the logarithm of the retention factor versus the concentration of organic modifier at the beginning of the gradient (similar to the familiar plots of the logarithm of the retention factor versus fixed organic modifier concentration in isocratic elution), and plots of the peak half-widths or widths versus the gradient time (the retention time in isocratic elution), respectively. The plots include all possible behaviours found for a solute or groups of solutes separated with a given column, and represent a kind of irregular triangles. An "elution triangle" can be drawn for each solute, whose wider region corresponds to low organic modifier concentrations (larger times). The more retained the compound, the wider the triangle. In contrast, when the solutes in a mixture elute with similar partitioning kinetics, a unique triangle ("peak width triangle") describes the peak width behaviour for all of them, whose wider region corresponds to situations of high retention (the most retained compounds or the lowest modifier contents).

Acknowledgements

This work was supported by Project CTQ2010-16010/BQU (Ministerio de Economía y Competitividad, MEC, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks a FPI grant from MEC.

References

- [1] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, J. Chromatogr. 165 (1979) 3.
- [2] J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.A. Meyers (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 2000.
- [3] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, 2007.
- [4] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 283.
- [5] V. Concha-Herrera, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1063 (2005) 79.
- [6] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 279.
- [7] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papageorgiou, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 178.
- [8] A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chem. 81 (2009) 9135.
- [9] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1737.
- [10] J. Stahlberg, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3172.
- [11] U.D. Neue, H.J. Kuss, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3794.
- [12] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agraftotou, A. Mansour, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5658.
- [13] A. Andrés, A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1247 (2012) 71.
- [14] H. Gika, G. Theodoridis, F. Mattivi, U. Vrhovsek, A. Pappa-Louisi, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 701.
- [15] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 32 (2009) 1527.
- [16] L.R. Snyder, M.A. Quarry, J. Liq. Chromatogr. 10 (1987) 1789.
- [17] D.D. Lisi, J.D. Stuart, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 555 (1991) 1.
- [18] J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Walcott, P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L.C. Sander, J. Chromatogr. A 857 (1999) 41.
- [19] J.W. Dolan, L.R. Snyder, T.H. Jupille, N.S.J. Wilson, J. Chromatogr. A 960 (2002) 51.
- [20] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 169.
- [21] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1057 (2004) 31.
- [22] L.R. Snyder, J. Chromatogr. 13 (1964) 415.
- [23] M. Wang, J. Mallette, J.F. Parcher, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8630.
- [24] E.C. Freiling, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 2067.
- [25] E.C. Freiling, J. Phys. Chem. 61 (1957) 543.
- [26] B. Drake, Arkiv Kemi 8 (1955) 1.
- [27] L.R. Snyder, J.W. Dolan, Adv. Chromatogr. 38 (1998) 115.
- [28] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agraftotou, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 299.
- [29] M.A. Quarry, R.L. Grob, L.R. Snyder, Anal. Chem. 58 (1986) 907.
- [30] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. de Galan, J. Chromatogr. A 149 (1978) 519.
- [31] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19.
- [32] R. Cela, M. Lores, Comput. Chem. 20 (1996) 175.
- [33] R. Cela, M. Lores, Comput. Chem. 20 (1996) 193.
- [34] R. Cela, E. Leira, O. Cabaleiro, M. Lores, Comput. Chem. 20 (1996) 315.
- [35] S.A. Tomellini, R.A. Hartwick, H.B. Woodruff, Anal. Chem. 57 (1985) 811.
- [36] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, Anal. Chem. 77 (2005) 5670.
- [37] P. Jandera, M. Jandarová, J. Churáček, J. Chromatogr. 148 (1978) 79.
- [38] P. Jandera, J. Chromatogr. A 797 (1998) 11.
- [39] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder, J. Chromatogr. A 1111 (2006) 32.
- [40] F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 79.
- [41] P. Jandera, Z. Kučerová, J. Urban, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8874.
- [42] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17.
- [43] J.J. Baeza-Baeza, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 119.
- [44] P. Jandera, J. Chromatogr. 485 (1989) 113.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

New approaches based on modified Gaussian models for the prediction of chromatographic peaks



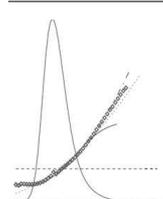
J.J. Baeza-Baeza*, C. Ortiz-Bolsico, M.C. García-Álvarez-Coque

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

HIGHLIGHTS

- ▶ Modified Gaussian models expressed as a function of experimental halfwidths.
- ▶ Enhancement of peak models through the application of restrictions.
- ▶ Peak models checked on chromatographic peaks of diverse origin and asymmetry.
- ▶ Increased reliability of the peak models in tasks requiring peak fitting and prediction.
- ▶ Parabolic-Lorentzian Gaussian improved applicability for optimisation of peak resolution.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2012

Received in revised form 17 October 2012

Accepted 22 October 2012

Available online 1 November 2012

Keywords:

Liquid chromatography

Peak profile

Modified Gaussian models

Peak prediction

Peak halfwidths

ABSTRACT

The description of skewed chromatographic peaks has been discussed extensively and many functions have been proposed. Among these, the Polynomially Modified Gaussian (PMG) models interpret the deviations from ideality as a change in the standard deviation with time. This approach has shown a high accuracy in the fitting to tailing and fronting peaks. However, it has the drawback of the uncontrolled growth of the predicted signal outside the elution region, which departs from the experimental baseline. To solve this problem, the Parabolic-Lorentzian Modified Gaussian (PLMG) model was developed. This combines a parabola that describes the variance change in the peak region, and a Lorentzian function that decreases the variance growth out of the peak region. The PLMG model has, however, the drawback of its high flexibility that makes the optimisation process difficult when the initial values of the model parameters are far from the optimal ones. Based on the fitting of experimental peaks of diverse origin and asymmetry degree, several semiempirical approaches that make use of the halfwidths at 60.65% and 10% peak height are here reported, which allow the use of the PLMG model for prediction purposes with small errors (below 2–3%). The incorporation of several restrictions in the algorithm avoids the indeterminations that arise frequently with this model, when applied to highly skewed peaks.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In 2002, according to Cavazzini et al. "obtaining an analytical function that describes the peak profile at the exit of the

chromatographic column is impossible, owing to the complex and numerous physicochemical processes involved" [1]. In 2012, according to Gao et al. "the detailed understanding of the different steps in the mass transfer process in chromatographic columns is a difficult and important problem, . . . our cognition of these processes is still limited" [2]. In spite of these difficulties, there is an impressive theoretical and experimental work aimed at elucidating the complexity of the peak shape problem, based on different

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3176; fax: +34 96 354 4436.
E-mail address: Juan.Baeza@uv.es (J.J. Baeza-Baeza).

theories [1,3–11]. From these studies and other reports by different authors, a great number of mathematical functions (theoretical, semiempirical and empirical) have been reported in the literature to fit chromatographic peaks, with different success [12–26]. Particularly interesting is the large compilation of peak models reported by Di Marco and Bombi [18]. The most frequent applications of peak functions are the deconvolution of partially resolved peaks [15,19–21], the evaluation of peak overlapping [13,14,19], and the prediction of peak profiles at different retention times [12,22,23,26]. This work deals with semiempirical modified Gaussian models, which have shown a particular good behaviour in the description of chromatographic peak profiles with diverse asymmetry.

A Gaussian is usually appropriate to describe the profile of symmetrical chromatographic peaks:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{\sigma_0^2}\right) \quad (1)$$

where H_0 is the peak height at the maximum, σ_0 the standard deviation (the halfwidth at 60.65% peak height), and $t_c = t - t_m$, t_m being the time at the peak maximum (for symmetrical peaks, the retention time). This simple model is used as reference considering the improvement in column manufacturing in liquid chromatography, with the reduction of peak tailing. However, skewed peaks are still obtained at short retention times, mainly due to the extra-column contributions, and for compounds that experience complex interactions with the stationary phase. In such cases, models able to cope with the peak skewness are needed. Several Gaussian modified functions have been reported to model chromatographic peaks with different asymmetry degrees [15,17,19,21,22]. Among them, those that modify the peak standard deviation [15], or variance [21,22] in the Gaussian function have proved good fitness and great flexibility.

The Polynomially Modified Gaussian models (PMG) are a family of functions based on the polynomial modification of the standard deviation of a pure Gaussian peak [15]. A first-degree polynomial (LMG model) is adequate to describe peaks of moderate asymmetry:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{(\sigma_0 + mt_c)^2}\right) \quad (2)$$

where σ_0 is the standard deviation on a Gaussian basis for a peak that behaves as the asymmetrical one in the maximum neighbourhood, and m a model parameter that accounts for the skewness. However, for peaks showing high asymmetry, higher degree polynomials are preferable to describe the peak profiles.

In a comparison study, Nikitas et al. [19] pointed out that the PMG approach was the only one able to describe almost any peak. However, it has the drawback that the functions are undefined when the polynomials equal zero. Another problem is the uncontrolled growth of the predicted signal outside the elution region. This problem is easily overcome (when possible) by making $h(t_c) = 0$ outside the peak region [15]. Another practical solution is the use of a mixed exponential-PMG function, obtained by adding two exponential decays at both sides of the PMG peak at 10% peak height, hold to the restriction that the slopes of the Gaussian and exponential functions at the respective connecting points should coincide [22,27].

Alternatively, other peak equations have been suggested to solve the drawbacks of the PMG approach [19,21,22,26]. One such

model is the so-called Parabolic-Lorentzian modified Gaussian (PLMG) [21]:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{\sigma_m^2 + m \left(\frac{(t_c+d)^2}{1+\frac{(t_c+r)^2}{w^2}}\right)}\right) \quad (3)$$

The parameters σ_m^2 , m and d correspond to the parabolic function, and r and w to the Lorentzian. The parabolic component accounts for the non-Gaussian region of the peak profile, and the Lorentzian cancels the increase of the variance out of the elution region. This model has been shown to fit accurately a wider range of peaks in comparison to other models [21,28]. However, fitting experimental data to the PLMG model may be a complex task, or may not converge if the initial values used to fit the model are far from the optimal ones [29]. Therefore, the results it provides need to be closely monitored to guarantee that the best parameters derived by the software make physical sense [30].

The Parabolic-Variance Modified Gaussian (PVMG) is a simplified model, where the Lorentzian is eliminated [22]. This model is useful for most peaks with moderate asymmetry:

$$h(t_c) = H_0 \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{t_c^2}{\sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2}\right) \quad (4)$$

where b and c are model parameters. It also provides a highly accurate fitting of peak profiles above a peak ratio of 0.6.

We can conclude that, currently, accurate models have been developed to describe almost every peak. However, it is still convenient to have practical models to predict peaks in a wide range of asymmetries, needed for the optimisation of chromatographic resolution, where the model parameters are a function of easily measurable peak properties, as the peak halfwidths. This work makes some advances in this direction, based on the LMG, PVMG and PLMG models. Also, some new recommendations are given to get reliable fittings of experimental chromatographic peak profiles to the PLMG model, independently of the peak skewness.

2. Experimental

2.1. Reagents

Mobile phases were prepared with acetonitrile (Scharlab, Barcelona, Spain) or with sodium dodecyl sulfate (SDS, 99% purity, Merck, Darmstadt, Germany) and 1-butanol (Scharlab). The pH was buffered with 0.01 M citric acid (Panreac, Barcelona) and NaOH (Scharlab). The electrode was calibrated using aqueous buffers, and the pH of the mobile phases measured after the addition of the organic solvent.

The probe compounds were: benzoic acid, butylbenzene (Sigma, St. Louis, MO, USA), the antibiotic tetracycline (Sigma), the diuretics benzthiazide, bumetanide, furosemide, ethacrynic acid (Sigma), bendroflumethiazide (Davur, Madrid), and xipamide (Lacer, Barcelona), the β -blockers alprenolol, acebutolol (Sigma), and celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, Spain), and the flavonoid chrysin (Sigma). The drugs were dissolved in a few millilitres of acetonitrile or SDS solution, assisted by an ultrasonic bath. Dilution was made with water. The concentrations of the injected solutions, which were stored in the darkness at 4 °C, were ca. 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nanopure water (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA) was used throughout. The mobile phases and the solutions of the probe compounds were filtered through 0.45 μm Nylon membranes with

a diameter of 47 mm (Magna) and 17 mm (Cameo), respectively (Osmonics, Herental, Belgium).

2.2. Apparatus and columns

The HPLC system (Agilent, Series 1100, Waldbronn, Germany) consisted of an isocratic pump, an autosampler, a UV–visible detector, and a temperature controller. The signals were monitored at 254 nm. Data acquisition was carried out with an HPChemStation (Agilent).

Several 5- μm particle size chromatographic columns were used: Zorbax SB C18, Zorbax Eclipse C18 (Agilent, 150 \times 4.6 mm I.D.), XTerra MS C18 (Waters, MA, USA, 150 \times 4.6 mm I.D.), Spherisorb S5 ODS-2 (Scharlab, 125 \times 4.6 mm I.D.) and Nucleosil 120 C18 (Scharlab, 150 \times 4.6 mm I.D.), all protected with a similar C18 guard column (Scharlab, 30 \times 4.0 mm I.D.). Also, a Chromolith Performance RP-18e (Merck, Darmstadt, Germany, 100 \times 4.6 mm I.D.), preceded by a Chromolith guard column RP-18e (5.0 \times 4.6 mm I.D.) was used. The probe compounds were injected after the guard columns. The peaks were obtained in either isocratic or gradient elution modes, the former at several flow-rates.

3. Theory

3.1. Approaches for the prediction of peak profiles

The most convenient way to assess the performance of different models for the prediction of chromatographic peaks is to apply them to experimental peaks obtained in different conditions. It is expected that the predicted peaks fit as much as possible the experimental ones. On the other hand, in order to facilitate the predictions, the models should include easily measurable parameters, as the peak halfwidths measured at a given peak height. In the approaches developed for this work, the halfwidths measured at 60.65% and 10% peak height were used.

Next, different approaches for the prediction of peak profiles, some of them developed for this work are described.

3.1.1. Approach I: pure Gaussian model

From Eq. (1):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{\sigma_0^2} \quad (5)$$

and substituting t_c by the values of the left and right halfwidths ($t_c = -A$, and $t_c = B$):

$$p\sigma_0^2 = A^2 \quad (6)$$

$$p\sigma_0^2 = B^2 \quad (7)$$

A good estimation of the standard deviation can be obtained from the square root of the product of Eqs. (6) and (7):

$$\sigma_0^2 = \frac{AB}{p} \quad (8)$$

As observed in Eq. (5), p depends on the height at which the halfwidths are measured. Thus, $p = 1$ at 60.65% peak height ($h = 0.6065H_0$), and $p = 4.605$ at 10% peak height ($h = 0.1H_0$). As there is usually more interest to predict the lower part of the peak, which is mostly affected by peak overlapping, it is convenient to use the halfwidths at 10% peak height to estimate the variance at the peak maximum, σ_0^2 . From Eq. (8):

$$\sigma_0^2 = \frac{A_0B_{10}}{4.605} \quad (9)$$

3.1.2. Approach II: LMG model

From Eq. (2):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{(\sigma_0 + mt_c)^2} \quad (10)$$

from which after making $t_c = -A$, and $t_c = B$:

$$\sqrt{p} = \frac{A}{\sigma_0 - mA} \quad (11)$$

$$\sqrt{p} = \frac{B}{\sigma_0 + mB} \quad (12)$$

By resolving the system of equations:

$$\sigma_0 = \frac{2}{\sqrt{p}} \frac{AB}{A+B} \quad (13)$$

$$m = \frac{1}{\sqrt{p}} \frac{B-A}{A+B} \quad (14)$$

Since at 10% peak height, $\sqrt{p} = \sqrt{4.605} = 2.416$:

$$\sigma_0 = \frac{2}{2.416} \frac{A_0B_{10}}{A_0+B_{10}} \quad (15)$$

$$m = \frac{1}{2.416} \frac{B_{10}-A_0}{A_0+B_{10}} \quad (16)$$

3.1.3. Approach III: PVMG model

From Eq. (4):

$$p = -2 \ln \frac{h}{H_0} = \frac{t_c^2}{\sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2} \quad (17)$$

As observed, the variance term in the PVMG model has three parameters (σ_0^2 , b and c), which makes the calculation somewhat more complex than in previous cases. It is again convenient to express the model parameters as a function of the peak halfwidths. By substituting the values of the halfwidths at a certain peak height in Eq. (17):

$$p\sigma_0^2 + pbA + pcA^2 = A^2 \quad (18)$$

$$p\sigma_0^2 - pbB + pcB^2 = B^2 \quad (19)$$

and resolving the system of equations:

$$b = \frac{\sigma_0^2}{AB} (B - A) \quad (20)$$

$$c = \frac{1}{p} - \frac{\sigma_0^2}{AB} \quad (21)$$

In order to avoid any indetermination, the parabolic function in Eq. (17) should be always positive. This requires that both c and the parabola minimum be above zero (it should be here noted that the parabola minimum for the LMG model, Eq. (2), has a null value). These conditions are fulfilled when:

$$b^2 < 4\sigma_0^2c \quad (22)$$

We should still calculate σ_0^2 , the variance at the peak maximum. By developing the variance equation for the LMG model, and making it equal to the variance in the PVMG model:

$$(\sigma_0 + mt_c)^2 = \sigma_0^2 + 2\sigma_0mt_c + m^2t_c^2 = \sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2 \quad (23)$$

it can be seen that the LMG model coincides with the PVMG model when:

$$b^2 = 4\sigma_0^2m^2 = 4\sigma_0^2c \quad (24)$$

Based on this consideration, an expression derived from Eq. (13) can be used to calculate σ_0^2 in the PVMG model:

$$\sigma_0^2 = \frac{d}{p} \frac{A^2 B^2}{(A+B)^2} \quad (25)$$

For the LMG model, $d = 4$ (see Eq. (13)), whereas for the PVMG model and according to Eqs. (20)–(24), Eq. (25) is only valid when $d < 4$. We fitted a large number of experimental peaks according to Eq. (4), for different compounds eluted from different columns, and obtained the value $d = 3.82 \pm 0.06$ when the halfwidths were measured at 60.65% peak height, and $d = 3.6 \pm 0.4$ when they were measured at 10% peak height. These mean values indicate that the upper part of the experimental peaks fitted more properly to the LMG model ($d = 3.82 \approx 4$) than the lower part ($d = 3.6$). Also, the standard deviation of the d mean values suggested a larger similarity among the peaks in the upper part. Since, usually, an accurate description of the lower part is needed, we decided to use the halfwidths at 10% peak height, and the ratio $d/p = 3.6/4.605 = 0.79 \approx 0.8$ to calculate the variance in the PVMG model (Eq. (4), see also Eq. (25)):

$$\sigma_0^2 = 0.8 \frac{A_{10}^2 B_{10}^2}{(A_{10} + B_{10})^2} \quad (26)$$

The other two parameters in the PVMG model were calculated as (see Eqs. (20) and (21)):

$$b = \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (27)$$

$$c = 0.2171 - \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} \quad (28)$$

where $1/p = 1/4.605 = 0.2171$.

3.1.4. Approach IV: PLMG model

In order to simplify the treatment and relate the PLMG model (Eq. (3)) with previous approaches, it is more convenient to rewrite it as:

$$h(t_c) = H_0 \exp \left(-\frac{1}{2} \frac{1 + wt_c + zt_c^2}{\sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2} \right) \quad (29)$$

From Eq. (29):

$$p = \frac{t_c^2 + wt_c + zt_c^2}{\sigma_0^2 + bt_c + ct_c^2} \quad (30)$$

and:

$$p\sigma_0^2 - t_c^2 = -bpt_c - cpt_c^2 + wt_c^3 + zt_c^4 \quad (31)$$

The variance in the PLMG model (Eq. (29)) contains five parameters: three for the parabola (σ_0^2 , b and c), and two for the Lorentzian function (w and z). Therefore, two pairs of halfwidths are now needed to estimate the model parameters. We propose the halfwidths measured at 60.65% (A_{60} and B_{60}), and 10% (A_{10} and B_{10}) peak height. The model parameters b , c , w and z can be obtained by resolving a system of four equations with b , c , w and z as variables. In matrix form:

$$\begin{pmatrix} b \\ c \\ w \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{60} & -A_{60}^2 & -A_{60}^3 & A_{60}^4 \\ -B_{60} & -B_{60}^2 & B_{60}^3 & B_{60}^4 \\ pA_{10} & -pA_{10}^2 & -A_{10}^3 & A_{10}^4 \\ -pB_{10} & -pB_{10}^2 & B_{10}^3 & B_{10}^4 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sigma_0^2 - A_{60}^2 \\ \sigma_0^2 - B_{60}^2 \\ p\sigma_0^2 - A_{10}^2 \\ p\sigma_0^2 - B_{10}^2 \end{pmatrix} \quad (32)$$

where $p = 4.605$. Eq. (25) was again applied to calculate σ_0^2 , using the halfwidths at 60.65% ($p = 1$) and the corresponding experimental value $d = 3.8$ (see Section 3.1.3).

3.1.5. Approaches V: simplified approaches for the PLMG model

As commented, the PVMG model, which is simpler than the PLMG model, fits accurately the upper part of chromatographic peaks (above a peak ratio of approximately 0.6). With the peaks of the probe compounds used in this work, the mean relative errors were always below 0.2%. Based on this result, two simplified approaches were developed, based on the PLMG model.

In the first approach (Approach Va), the parabola parameters in Eq. (29) were evaluated using the halfwidths at 60.65% peak height, where $p = 1$ (compare with Eqs. (20), (21) and (25)):

$$\sigma_0^2 = 3.8 \frac{A_{60}^2 B_{60}^2}{(A_{60} + B_{60})^2} \quad (33)$$

$$b = \frac{2}{3} \frac{\sigma_0^2}{A_{60} B_{60}} (B_{60} - A_{60}) \quad (34)$$

$$c = 1 - \frac{\sigma_0^2}{A_{60} B_{60}} \quad (35)$$

The 2/3 factor in Eq. (34) is empirical and was checked to improve the fittings of the experimental peaks examined in this work (Table 1). Once the parabola parameters (σ_0 , b and c) are known, the Lorentzian parameters (w and z) are calculated from Eq. (30) for the right and left halfwidths at 10% peak height, by resolving a system of two equations:

$$\alpha_A = 4.605(\sigma_0^2 - bA_{10} + cA_{10}^2) - A_{10}^2 = -wA_{10}^3 + zA_{10}^4 \quad (36)$$

$$\alpha_B = 4.605(\sigma_0^2 + bB_{10} + cB_{10}^2) - B_{10}^2 = wB_{10}^3 + zB_{10}^4 \quad (37)$$

from which:

$$w = \frac{A_{10}^4 \alpha_B - B_{10}^4 \alpha_A}{(A_{10} + B_{10}) A_{10}^3 B_{10}^3} \quad (38)$$

$$z = \frac{A_{10}^3 \alpha_B + B_{10}^3 \alpha_A}{(A_{10} + B_{10}) A_{10}^3 B_{10}^3} \quad (39)$$

As observed, Approach Va makes use of the halfwidths at both 60.65% (Eqs. (33), (34) and (35)), and 10% (Eqs. (38) and (39)) peak height. A more simplified treatment (Approach Vb) would consider only the halfwidths at 10% peak height to predict all model parameters in Eq. (29):

$$\sigma_0^2 = 0.76 \frac{A_{10}^2 B_{10}^2}{(A_{10} + B_{10})^2} \quad (40)$$

$$b = 0.72 \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (41)$$

$$c = 0.217 - 0.86 \frac{\sigma_0^2}{A_{10} B_{10}} \quad (42)$$

$$w = -\frac{A_{10}^2 + B_{10}^2 - 0.5A_{10}B_{10}}{(A_{10} + B_{10})^2 A_{10} B_{10}} (B_{10} - A_{10}) \quad (43)$$

$$z = \frac{A_{10}^2 + B_{10}^2 - 1.5A_{10}B_{10}}{(A_{10} + B_{10})^2 A_{10} B_{10}} \quad (44)$$

The coefficients in Eqs. (40)–(42) were obtained empirically. Eqs. (43) and (44) were obtained by resolving the system of Eqs. (36) and (37).

3.2. Fitting of experimental peaks

Fitting of the experimental points in a chromatographic peak to the PLMG model (Eq. (29)) has the drawback of needing initial values of the model parameters sufficiently close to the optimal ones. Due to the flexibility of the model, it can easily converge to local minima without physical meaning [30]. On the other hand,

Table 1
Experimental conditions used in the elution of the probe compounds, and peak properties.

Peak	Compound	Elution conditions ^a	t_m (min)	A_{60} (min)	B_{60} (min)	$(B/A)_{60}$	A_{10} (min)	B_{10} (min)	$(B/A)_{10}$
1	Alprenolol	Zorbax SB, 45% AcN, pH 3, 30°C	2.10	0.0305	0.0515	1.69	0.0583	0.146	2.50
2	Bendroflumethiazide	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	2.38	0.0303	0.0486	1.61	0.0603	0.144	2.39
3	Tetracycline	Spherisorb, 0.05M SDS, 5% 1-butanol, pH 3, 25°C	10.16	0.303	0.440	1.45	0.592	1.398	2.36
4	Alprenolol	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	3.40	0.0430	0.0639	1.40	0.0785	0.163	2.07
5	Bendroflumethiazide	Zorbax SB, 30% AcN, pH 3, 30°C	2.74	0.0373	0.0552	1.48	0.0754	0.152	2.02
6	Ethacrynic acid	Spherisorb, 46% AcN (gradient: 0.4%/min), pH 3, 25°C	7.61	0.0660	0.0881	1.34	0.132	0.263	2.00
7	Acetazolol	Chromolith, 15% AcN (0.4 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	13.38	0.119	0.159	1.34	0.235	0.437	1.86
8	Bumetanide	Chromolith, 35% AcN, pH 3, 30°C	10.96	0.102	0.117	1.15	0.213	0.348	1.63
9	Butylbenzene	Nucleosil, 70% AcN (0.6 mL min ⁻¹), 25°C	10.74	0.100	0.115	1.14	0.209	0.312	1.49
10	Benzoic acid	Chromolith, 15% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	3.85	0.0392	0.0435	1.11	0.0820	0.120	1.47
11	Benzoic acid	Nucleosil, 20% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	3.78	0.0455	0.0523	1.15	0.0935	0.138	1.47
12	Celliprolol	Chromolith, 15% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	5.91	0.0676	0.0809	1.20	0.139	0.201	1.44
13	Benzoic acid	Spherisorb, 25% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	2.66	0.0311	0.0344	1.11	0.0660	0.0848	1.29
14	Benzoic acid	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 40°C	8.18	0.0781	0.0870	1.12	0.166	0.211	1.27
15	Benzoic acid	Xterra, 15% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 25°C	7.14	0.0648	0.0695	1.06	0.177	0.219	1.24
16	Benzoic acid	Xterra, 15% AcN (2 mL min ⁻¹), pH 3, 30°C	8.74	0.0985	0.105	1.06	0.204	0.236	1.16
17	Furosemide	Spherisorb, 40% AcN (gradient: 1.0%/min), pH 3, 25°C	4.62	0.0442	0.0460	1.04	0.0949	0.104	1.10
18	Furosemide	Zorbax SB, 35% AcN, pH 3, 30°C	16.84	0.150	0.153	1.02	0.325	0.341	1.05
19	Chlorsin	Zorbax Eclipse, 35% AcN, pH 3.5, 25°C	20.71	0.185	0.181	0.98	0.407	0.393	0.97
20	Furosemide	Zorbax SB, 25% AcN, pH 3, 20°C	25.96	0.262	0.245	0.79	0.740	0.531	0.72

^a When not indicated, the flow-rate was 1.0 mL min⁻¹.

any peak model requires highly accurate estimations of the time at the peak maximum, and rather accurate values for the height and variance at the peak maximum. If the quality of these values is not enough, the fitting may not converge.

In addition to the above problems, a fully free fitting to the PLMG model (and in a lesser extent to the PVMG model) may yield indeterminations that stop the minimisation process. In order to improve the applicability of these approaches and avoid negative values for the peak variance, condition (22) should be fulfilled. This is guaranteed with Eqs. (33)–(35). However, in order to increase the fitting capability, the variance at the peak maximum given by Eq. (33) was substituted by:

$$\sigma_0^2 = \frac{4}{1 + a^2} \frac{A_{60}^2 B_{60}^2}{(A_{60} + B_{60})^2} \quad (45)$$

An initial value $a = 0.23$ (to give a 3.8 coefficient in Eq. (33)) is convenient to perform the non-linear optimisation to obtain the model parameters in Eq. (29). Also, the numerator in the exponent of the modified Gaussian function (the Lorentzian) should be always positive, which is guaranteed if:

$$z > \frac{w^2}{4} \quad (46)$$

Eqs. (43) and (44) were checked to fulfil this condition for the experimental peaks studied in this work. However, there is still no guarantee that this happens always along the iterations in an optimisation process carried out to obtain the model parameters, where the values for the halfwidths change continuously. Therefore, we propose the following equation:

$$z = \frac{w^2}{4} + d^2 \quad (47)$$

to guarantee condition (46). In this way, the fitting parameters would be t_m , H_0 , A_{60} , B_{60} , a , w and d (it was found convenient to assign initial values of $w = d = 0$). Eqs. (34), (35) and (45) facilitate the fittings and control the indeterminations. Excellent fittings were obtained as will be observed below. This, however, does not guarantee that the calculated halfwidths (A_{60} and B_{60}) agree with the real values.

4. Results and discussion

4.1. Evaluation of the fitting and prediction performance for the proposed approaches

In order to check the proposed approaches, we selected 20 peaks from our data base, corresponding to several probe compounds showing diverse efficiency and skewness. The experimental peaks were obtained using different chromatographic modes with isocratic or gradient elution, different columns, mobile phase compositions, temperatures, flow-rates and pH values. In Table 1, the values for the halfwidths of the studied peaks at 60.65% (A_{60} and B_{60}), and 10% (A_{10} and B_{10}) peak height are given, together with the asymmetry degrees (B_{60}/A_{60} and B_{10}/A_{10}). Note that the peaks are ordered according to the asymmetry degrees at 10% peak height (the peaks are tailing for $B_{10}/A_{10} > 1$, and fronting for $B_{10}/A_{10} < 1$).

The fitting and prediction performance of the approaches described in the Theory Section were assessed calculating the mean relative errors according to:

$$\varepsilon_r (\%) = \frac{\sum_{i=1}^N |h_i - \hat{h}_i|}{\sum_{i=1}^N |h_i|} \times 100 \quad (48)$$

Table 2
Relative errors (%) obtained in the fitting of the experimental peaks in Table 1 to the PVMG and PLMG models.

Peak	$(B/A)_{10}$	Without restrictions			With restrictions	
		PVMG ^a	PVMG ^b	PLMG ^c	PVMG ^d	PLMG ^e
1	2.50	0.036	4.68	0.75	5.89	0.75
2	2.39	0.081	4.36	1.83	4.61	1.83
3	2.36	0.12	1.90	0.47	1.90	0.47
4	2.07	0.072	1.70	0.49	3.15	0.74
5	2.02	0.048	3.51	1.48	3.51	1.48
6	2.00	0.009	0.75	0.44	0.75	0.44
7	1.86	0.021	0.87	0.67	0.87	0.67
8	1.63	0.029	2.32	0.67	2.32	0.67
9	1.49	0.059	1.20	0.44	1.20	0.44
10	1.47	0.032	2.13	0.68	2.13	0.68
11	1.47	0.038	1.27	0.96	1.27	0.96
12	1.44	0.020	1.40	1.27	1.40	1.36
13	1.29	0.019	1.22	0.71	1.22	0.71
14	1.27	0.019	0.29	0.21	0.29	0.27
15	1.24	0.16	1.26	1.03	1.26	1.03
16	1.16	0.077	0.75	0.52	0.75	0.66
17	1.10	0.002	0.27	0.16	0.27	0.17
18	1.05	0.031	0.63	0.57	0.63	0.57
19	0.97	0.045	0.40	0.33	0.40	0.37
20	0.72	0.047	2.39	0.36	2.39	0.35
Mean		0.051 ± 0.038	1.7 ± 1.3	0.70 ± 0.43	1.8 ± 1.5	0.73 ± 0.42

^a Eq. (4) (only the upper part of the peak was fitted).

^b Eq. (4) (the whole peak was fitted).

^c Eq. (29).

^d Eq. (4) combined with Eqs. (27), (28) and (45).

^e Eq. (29) combined with Eqs. (34), (35), (45) and (47).

where h_i and \hat{h}_i are the experimental and predicted heights for each point in the chromatographic peaks, and N is the number of experimental peak points.

As commented above, models to fit or predict chromatographic peaks are needed for several reasons. Thus, peak fitting is used for peak characterisation or deconvolution, whereas peak prediction is required in the optimisation of chromatographic resolution. Peak fitting is more demanding with regard to the quality of the description, whereas peak optimisation needs highly stable and fast approaches to predict a large number of realistic peaks in a wide range of chromatographic conditions, in practical times. In any case, accurate descriptions are desirable, independently of the peak characteristics (i.e. width and skewness).

4.2. Fitting of experimental peaks

In the literature, several models have been proposed, which yield appropriate fitting and prediction of chromatographic peaks. However, as commented above, there may be convergence problems (especially with highly asymmetric peaks). Also, in a free optimisation (without restrictions), the process can easily produce indeterminations that can stop it after some iterations or produce badly defined peaks. There is, thus, a need to increase the stability of the models by adding some restrictions to the algorithms.

The errors obtained in the fitting of the peaks for the probe compounds in Table 1 to the PVMG (Eq. (4)) and PLMG (Eq. (29)) models, without any restriction or after applying the restrictions described in Sections 3.1 and 3.2, are indicated in Table 2. Without restrictions, a condition of non-negativity was applied to succeed in the fitting of the peak region. For the PVMG model, either the upper part of the peak (above a 0.6 peak ratio), or the whole peak was fitted. For the PLMG model, the whole peak was always fitted.

The errors with the PLMG model were significantly smaller, below 1%. Fig. 1a shows the excellent fitting of the peak of alprenolol (with a significant tailing, $B_{10}/A_{10} = 2.07$) with the PLMG model, whereas Fig. 1b depicts the fitting of the upper part of the peak

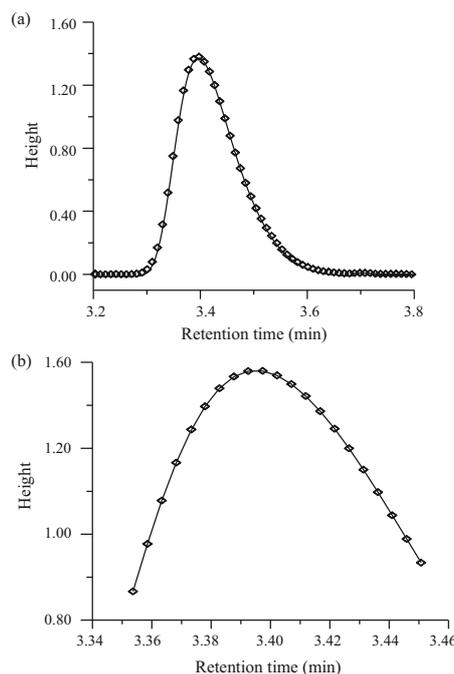


Fig. 1. Fitting of an alprenolol peak (peak 4 in Table 1) to: (a) the PLMG model, and (b) the PVMG model, both without restrictions. In (b), only the upper part of the peak was fitted.

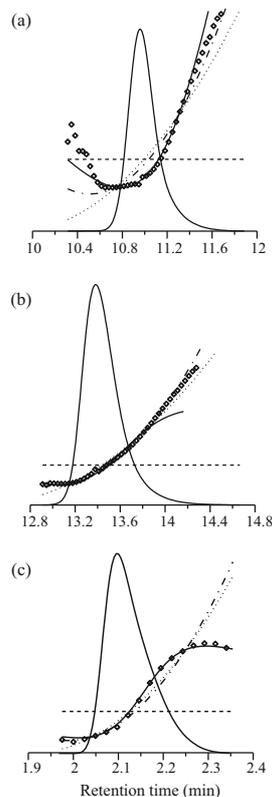


Fig. 2. Chromatographic peaks for: (a) bumetanide (peak 8), (b) acebutolol (peak 7), and (c) alprenolol (peak 1). Experimental (\circ) and predicted variance ($\times 200$) are overlaid for Approaches I (---), II (....), III (-.-.-), and Va (—).

to the PVMG model. Similar good behaviour was observed for the other peaks studied in this work. The addition of restrictions may increase the fitting error, although in most cases there is no difference with the results obtained without restrictions. The special characteristic of using restrictions is that these increase significantly the guarantee of convergence on reliable values, and eliminate the risk of indeterminations.

4.3. Prediction of peak profiles

The optimisation of the chromatographic resolution increases its reliability if the shape of the predicted peak is considered in addition to the retention. This is most conveniently performed based on the peak halfwidths, since these allow considering not only the peak width, but also the peak tailing. The peak halfwidths at any condition in a factor space can be predicted based on the peak halfwidths for the conditions selected to build an experimental design. The process can be carried out following at least two approaches. In the first approach, the halfwidths of the predicted peaks are interpolated from those corresponding to peaks obtained in the closest conditions in the experimental design to those

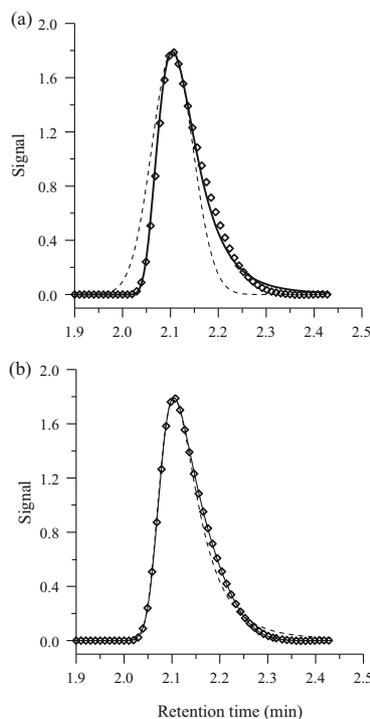


Fig. 3. Performance of the proposed models in the fitting of an alprenolol peak (peak 1): (a) Gaussian model (Approach I, dashed line ---), and LMG model (Approach II, black line —); (b) PVMG model (Approach III, dashed line ---), and PLMG model (Approach Va, black line —). The performance of Approaches IV and Vb were similar to that for Approach Va. Experimental points are depicted as (\circ).

predicted. In the second approach, the halfwidths are predicted from previous correlations, as the following:

$$A = A_0 + at_m + bt_m^2 \quad (49)$$

$$B = B_0 + a't_m + b't_m^2 \quad (50)$$

which are established between the peak halfwidths and the times at the peak maximum for probe compounds eluted using the conditions in the experimental design.

The wide range and number of conditions where the peaks should be predicted in the optimisation of chromatographic resolution require reliable approaches that guarantee the absence of indeterminations. In this work, we have checked six different approaches: the pure Gaussian, the LMG and PVMG descriptions, and three modalities of the PLMG model. Figs. 2 and 3 show the quality of the predictions for several peaks. The prediction errors for the whole set of studied peaks are given in Table 3.

Fig. 2 depicts the experimental variance inside the peak region for peaks obtained for bumetanide, acebutolol and alprenolol, together with the predictions obtained with different approaches. The experimental variance was obtained according to:

$$\sigma^2 = \frac{t_c^2}{-2 \ln \frac{h}{h_0}} \quad (51)$$

Table 3

Relative errors (%) for the prediction of the peak profiles of the probe compounds in Table 1 using the approaches described in Section 3.1.

Peak	(B/A) ₁₀	Approaches					
		I	II	III	IV	Va	Vb
1	2.50	33.8	7.42	8.35	1.50	0.92	2.09
2	2.39	35.1	6.06	6.77	3.02	3.14	2.89
3	2.36	31.8	5.13	3.18	2.76	3.75	6.34
4	2.07	28.2	4.67	6.35	^a	2.35	5.00
5	2.02	28.6	4.76	4.98	2.06	3.00	2.79
6	2.00	27.5	7.75	5.53	3.72	2.78	6.00
7	1.86	23.1	3.75	1.85	3.92	2.51	2.80
8	1.63	19.6	9.38	7.33	^a	2.84	6.83
9	1.49	15.0	5.51	3.89	2.29	1.51	2.78
10	1.47	15.9	8.04	6.09	^a	1.92	5.32
11	1.47	15.0	5.27	3.32	^a	2.01	3.07
12	1.44	15.0	4.44	2.56	4.50	2.19	2.21
13	1.29	10.6	5.54	3.66	4.28	1.89	2.42
14	1.27	9.86	3.82	1.96	2.56	0.80	0.59
15	1.24	8.4	2.21	1.42	^a	1.98	2.59
16	1.16	5.28	1.06	1.54	0.80	1.62	2.95
17	1.10	4.18	2.17	0.52	^a	0.98	1.54
18	1.05	2.96	2.39	0.71	1.45	1.15	1.73
19	0.97	2.09	1.66	0.75	0.98	1.17	2.11
20	0.72	15.4	9.85	7.88	^a	3.74	6.61
Mean		17.4 ± 10.6	5.0 ± 2.5	3.9 ± 2.6	–	2.1 ± 0.9	3.4 ± 1.9

^a The peaks were badly defined due to indeterminations.

For a symmetrical peak, the variance does not change with time. Consequently, the pure Gaussian model (which assumes symmetrical peaks) will consider it invariable, independently of the asymmetry (see Fig. 2). As observed in Table 3, this model (Approach I) yielded very poor predictions (with relative errors usually above 10–20%). Usually, Approaches II and III offered good results with peaks showing small asymmetry. However, it should be said that considering the large variety of chromatographic peaks, symmetrical peaks with a large kurtosis cannot be discarded, for which the predictions will be poorer.

Approach IV (PLMG model applied without restrictions), as commented, is an unstable model owing to the requirement of inverting the matrix, which can be badly defined and highly affected by experimental errors. This is, in fact, the reason of the frequent indeterminations. This drawback is solved in Approaches Va and Vb (PLMG models adapted to avoid indeterminations). Approach Va offered the smallest errors, with predictions that highly agreed with the experimental peaks (relative errors usually below 2–3%). The results with Approaches III and Vb were also satisfactory. Approach Vb was somewhat better, but Approach III is simpler. Therefore, when the accuracy requirement is not high, this approach can be the best option.

5. Conclusions

The PLMG model (Eqs. (3) or (29)) was developed to cope with the description of highly skewed peaks, with fitting purposes [21]. It yields excellent descriptions of chromatographic peaks. However, the stability of the model is not guaranteed for the prediction of peaks, which is required in the optimisation of peak resolution. In this work, the algorithm is modified by including several restrictions and expressing the model parameters as a function of the peak halfwidths to make it practical with prediction purposes. The application of the new algorithm to a wide range of experimental peaks indicates that it succeeded in this aim. Also, some recommendations are given to improve the fitting capability of the PLMG model. This will allow more reliable peak properties, as the area or moments of diverse degree, or the enhancement of the results in peak deconvolution.

The new approaches proposed in this work (based on the PLMG model) use information on the halfwidths at both 60.65% and 10%

peak height, or only at 10% peak height. The former, obviously, offered the best results since it is able to describe properly the upper and lower part of the peaks (it forces the fitting through the halfwidths at 60.65% and 10% peak height, in addition to the peak maximum, H_0). Both approaches avoid indeterminations in the parabola function. No problems were found with the peaks studied in this work, for which the condition (46) was fulfilled. This evidences that the added restrictions increased the expectancies of success. Nevertheless, the absence of indeterminations in the Lorentzian function are not fully guaranteed.

Finally, we should note that this work offers guidelines to develop improved models to fit and predict peaks from any source. These will allow any laboratory elaborate its own approach that best fit to a particular application.

Acknowledgements

This work was supported by Project CTQ2010-16010/BQU (Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN of Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks a FPI grant from MICINN.

References

- [1] A. Cavazzini, F. Dondi, A. Jaulmes, C. Vidal-Madjar, A. Felinger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6269.
- [2] H. Gao, P.G. Stevenson, F. Critti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 81.
- [3] S.C. Pai, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 233.
- [4] A. Felinger, G. Guiochon, *Chromatographia* 60 (2004) S175.
- [5] L. Pasti, A. Cavazzini, A. Felinger, M. Martin, F. Dondi, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2524.
- [6] F. Critti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5329.
- [7] F. Dondi, A. Cavazzini, L. Pasti, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 257.
- [8] K. Kaczmarek, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4648.
- [9] K. Miyabe, Y. Matsumoto, Y. Niwa, N. Ando, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8319.
- [10] L. Pasti, A. Cavazzini, M. Nassi, F. Dondi, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1000.
- [11] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5166.
- [12] G.K.C. Low, P.R. Haddad, A.M. Duffield, *J. Chromatogr. B* 336 (1984) 15.
- [13] E.V. Dose, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 62 (1990) 174.
- [14] M.C. Pietrogrande, F. Dondi, A. Felinger, J.M. Davis, *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 28 (1995) 239.
- [15] J.R. Torres-Lapasó, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
- [16] A. Felinger, *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 97–119.
- [17] A.G. Stromberg, S.V. Romanenko, E.S. Romanenko, *J. Anal. Chem.* 55 (2000) 615.
- [18] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, *J. Chromatogr. A* 931 (2001) 1.

- [19] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 13.
- [20] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A. Garrido-Frenich, M.C. García-Álvarez-Coque, *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 59 (2001) 107.
- [21] R.D. Caballero, M.C. García-Álvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 59.
- [22] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
- [23] P. Moretti, S. Vezzani, E. Garrone, G. Castello, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 171.
- [24] B. Steffen, K.P. Müller, M. Komenda, R. Koppmann, A. Schaub, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 239.
- [25] S.V. Romanenko, A.G. Stromberg, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 343.
- [26] J.J. Baeza-Baeza, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 119.
- [27] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 146.
- [28] M.C. García-Álvarez-Coque, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Sanchis-Mallols, J.J. Baeza-Baeza, *Electrophoresis* 26 (2005) 2076.
- [29] J.J. Baeza-Baeza, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1385.
- [30] P.G. Stevenson, F. Griitti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8255.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Implementation of gradients of organic solvent in micellar liquid chromatography using DryLab[®]: Separation of basic compounds in urine samples

J. Rodenas-Montano, C. Ortiz-Bolsico, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque^{*}

Departament de Química Analítica, Universitat de València, Dr. Moliner 50, Burjassot, 46100 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2014
 Received in revised form 25 March 2014
 Accepted 27 March 2014
 Available online 4 April 2014

Keywords:

Micellar liquid chromatography
 Gradient elution
 Sodium dodecyl sulphate
 1-Propanol
 Basic compounds
 Urine samples

ABSTRACT

In micellar liquid chromatography (MLC), chromatographic peaks are more evenly distributed compared to conventional reversed-phase liquid chromatography (RPLC). This is the reason that most procedures are implemented using isocratic elution. However, gradient elution may be still useful in MLC to analyse mixtures of compounds within a wide range of polarities, decreasing the analysis time. Also, it benefits the determination of moderately to low polar compounds in physiological fluids performing direct injection: an initial micellar eluent with a low organic solvent content, or a pure micellar (without surfactant) solution, will provide better protection of the column against the proteins in the physiological fluid, and once the proteins are swept away, the elution strength can be increased using a positive linear gradient of organic solvent to reduce the analysis time. This work aims to encourage analysts to implement gradients of organic solvent in MLC, which is rather simple and allows rapid analytical procedures without pre-treatment or the need of re-equilibration. The implementation of gradient elution is illustrated through the separation of eight basic compounds (β -blockers) in urine samples directly injected into the chromatograph, the most hydrophobic showing large retention in both conventional RPLC and MLC. The use of the DryLab[®] software to optimise gradients of organic solvent with eluents containing a fixed amount of surfactant above the critical micellar concentration is shown to provide satisfactory predictions, and can facilitate greatly the implementation of gradient protocols.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Micellar liquid chromatography (MLC) is a reversed-phase liquid chromatographic (RPLC) mode, where the mobile phase is basically composed of an aqueous solution of an ionic or neutral surfactant above the critical micellar concentration (CMC). This RPLC mode has evolved from laboratory curiosity in Ref. [1], to its current practical utility. There are more than three decades of MLC experience with several hundreds of reports [2,3]. One of the most outstanding features of MLC is its unique selectivity, often attributed to the ability of micelles to organise solutes at the molecular level. However, the association of surfactant monomers to the bonded phase, forming a structure similar to the exterior of open micelles [4], has deep implications in the chromatographic behaviour (analysis time, selectivity and efficiency). The

adsorption of an approximately fixed amount of surfactant monomers on the stationary phase [5] gives rise to a stable modified packing, with properties remarkably different from those of the underlying bonded phase [6,7].

MLC was first proposed as a chromatographic mode with a mobile phase containing only water, buffer, micelles and a small amount of surfactant monomers [1]. Therefore, micelles played the role of the organic modifier. However, solutions containing only surfactant are too weak and yield poor peak shape. To remediate these problems, Dorsey et al. suggested the addition of a small amount of organic solvent to the mobile phase [8]. Since then, most reported analytical procedures in MLC make use of aqueous solutions of surfactant, mixed with organic solvent (mainly 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol and acetonitrile) [2,3], where the concentration of organic solvent is maintained low enough to allow the formation of micelles. The advantage of increasing the concentration of organic solvent to values producing micelle breakdown has been also addressed in terms of reduced analysis time, larger selectivity and improved peak shape, with respect to MLC

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 963544005; fax: +34 963544436.
 E-mail address: celia.garcia@uv.es (M.C. García-Alvarez-Coque).

and conventional RPLC [9–11]. The technique has been called high submicellar liquid chromatography (HSLC). In HSLC, hydrophobic interaction may be dominant due to the reduction of the ionic surfactant coating on the stationary phase, the disaggregation of micelles and the decrease in mobile phase polarity.

The unique selectivity of MLC, together with the smaller consumption of organic solvent and lower toxicity, with respect to conventional hydro-organic RPLC, may not be compelling reasons for a shift to the use of this chromatographic mode. Perhaps, the major reason of the increasing interest in MLC is the possibility of performing the direct injection of physiological samples through the solubilisation of the protein components by interaction with the micelles in the mobile phase, and the protection of the stationary phase by coating with surfactant monomers to avoid clogging [12–14]. The proteins are thus swept away, eluting with or shortly after the solvent front. Micelles also release protein-bound drugs, which results in higher concentrations in the mobile phase for partitioning to the stationary phase and detection. These features simplify the procedures and increase the sample throughput.

In conventional RPLC without additive, there is a linear dependence between the logarithm of the retention factor ($\log k$) and the solute polarity, usually measured as the logarithm of the octanol-water partition coefficient ($P_{o/w}$) [15]. This relationship gives rise to one of the main problems of the technique, called the “general elution problem of chromatography”: if the polarity range is too wide, it will be difficult to find a set of chromatographic conditions able to balance satisfactory resolution for the least retained solutes and reasonable retention time for the most retained ones [16]. A logical solution to overcome such a situation is gradient elution, where the elution strength is increased gradually as the analysis progresses, by altering at least one experimental factor (usually the organic solvent content).

In MLC, the situation is different due to the more effective removal of highly hydrophobic compounds from the stationary phase transported by the micelles. This gives rise to linear k versus $\log P_{o/w}$ relationships [17], which is translated in a larger number of compounds being eluted per time unit in the isocratic mode with regard to conventional RPLC. Chromatographic peaks are thus more evenly distributed, with longer retention times for the least retained compounds [18]. This behaviour has been called “gradient effect” and is the main reason that almost all reported MLC procedures use isocratic conditions. In spite of this, gradient elution can be useful in MLC to expedite some analyses, or even its application may enhance the separation capability of the technique.

However, after the seminal reports by Dorsey, Khaledi and coworkers [19–22], describing the capability and usefulness of gradient MLC to speed up the elution of strongly retained compounds, only very few authors have been concerned with the development of gradient elution procedures in MLC. Paleologos et al. determined biogenic amines in fish, chicken and wine samples using an eluent with fixed 0.40 M sodium dodecyl sulphate (SDS) and increasing acetonitrile (from 30 to 50% v/v) [23,24]. Ghorbani et al. determined water-soluble vitamins in multi-vitamin tablets with fixed 0.016 M SDS and increasing 1-butanol (from 3.5 to 10%) [25]. Bryant and Altria determined basic drugs and neutral compounds using gradients with increasing SDS and 1-pentanol (a simultaneous increase in both surfactant and organic solvent from 0.006 M SDS/0.7% 1-pentanol to 0.08 M/9.8%, and from 0.011 M/1.4% to 0.11 M/14%, respectively) [26]. Cao et al. separated phenolic compounds with fixed 0.05 M SDS and increasing acetonitrile (from 0 to 30%) [27].

Particularly interesting is the work of Nakao et al., who determined several radio-metabolites in plasma samples during positron emission tomography (PET) to evaluate the pharmacokinetics of the PET ligands using gradients with fixed SDS and increased 1-butanol or acetonitrile [11,28,29]. The high-speed analysis of short-lived radioligands is essential, together with the

possibility of processing a large amount of samples to derive correct metabolite pharmacokinetic functions. The authors demonstrated that MLC overcomes the limitation of conventional RPLC, which only allows metabolite analysis for a limited number of plasma samples. That work was developed guided by the principle of direct injection of the physiological sample in the chromatographic column, in conditions where it is protected (MLC conditions), and the rapid elution of highly retained analytes (after the protein separation, a rapid increase of organic solvent reaching HSLC conditions).

In our opinion, in spite of the advantage of using isocratic elution in MLC, more analysts should consider the improvement of some procedures through the application of gradient elution. To encourage the implementation of gradient MLC, in this work, we show in detail the development of a gradient procedure for the separation of a set of basic compounds (β -blockers) in urine samples with direct injection, using a fixed amount of SDS and a linear increase of organic solvent. The use of the DryLab® software to predict the optimal separation conditions is described.

2. Experimental

2.1. Reagents and columns

The following basic compounds (β -blockers) were analysed (see Table 1): acebutolol, atenolol, carteolol, labetalol, metoprolol and propranolol from Sigma (St. Louis, MO), celiprolol from Rhône-Poulenc Rorer (Alcorcón, Spain), and oxprenolol from Ciba-Geigy (Barcelona, Spain). The drugs were dissolved in a small amount of the organic solvent added to the eluent, and diluted with water. The concentration of the injected solutions was 20 $\mu\text{g/ml}$ for the aqueous mixtures, and 5 $\mu\text{g/ml}$ for the fortified urine samples, which were obtained from human volunteers.

The mobile phases contained sodium dodecyl sulphate from Merck (99% purity, Darmstadt, Germany), and acetonitrile or 1-propanol from Scharlau (Sentmenat, Barcelona). The pH was buffered at 3 with 0.01 M anhydrous sodium dihydrogen phosphate (Fluka, Steinheim, Germany). All experiences were performed with nanopure water, obtained with a Barnstead ultrapure water purification system from Thermo Scientific (Dubuque, IA). The drug solutions and mobile phases were filtered through 0.45 μm Nylon membranes from Micron Separations (Westboro, MA).

Two chromatographic columns were used: Zorbax Eclipse XDB-C8 and Zorbax Eclipse XDB-C18 (both 150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) from Agilent (Waldbronn, Germany).

2.2. Apparatus and software

An Agilent liquid chromatographic system was used, which was equipped with the following modules: a quaternary pump (HP 1200) run at 1 ml/min, an autosampler (HP 1100) with 2 ml vials, and a UV-visible detector (HP 1100) set at 225 nm. The temperature was controlled at 25 °C with a thermostated column compartment (HP 1100). The maximal operating pump pressure was 400 bar.

The system was controlled by an OpenLAB CDS LC ChemStation (Agilent B.04.03). The separation conditions were optimised with the assistance of the DryLab® software (Molnár Institute, Berlin, Germany). The chromatograms were exported into DryLab® with the PeakMatch® software from Agilent in AIA format (*.cdf) for “peak tracking”.

The dwell volume (total volume of plumbing in a gradient system between the point where the gradient is formed and the column inlet) was determined by removing the column from the system and connecting the injector directly to the detector. The midpoint of the signal obtained with a 0–100% linear gradient, formed by mixing water and 0.1% acetone, indicated the dwell

Table 1
Structures, dissociation constants (pKa) and octanol–water partition coefficients for the β -blockers.

Compound	Structure	pKa ^a	log P _{ow} ^b
Acebutolol		9.2	1.19
Atenolol		9.6	-0.026
Carteolol		NA ^a	1.42
Celiprolol		NA ^a	1.93
Labetolol		8.7; 7.4	2.41
Metoprolol		9.7	1.69
Oxprenolol		9.5	1.83
Propranolol		9.5	2.60

^a Ref. [30]; NA = Not available.

^b Ref. [31]; Octanol–water partition coefficients calculated from the compound structures using the on-line interactive LOGKOW program of the Environmental Science Centre of Syracuse Research Corporation.

time (t_D). The mean value from several runs was $t_D = 0.89$ min. The dead time (t_0) in conventional RPLC was obtained from the peak of uracil ($t_0 = 1.42$ min). The first perturbation in the chromatograms allowed the determination of the dead time in MLC ($t_0 = 1.30$ min).

3. Results and discussion

Based on our previous experience with the MLC and HSLC isocratic separation of β -blockers, we have developed this work, which examines and optimises the gradient elution capability of

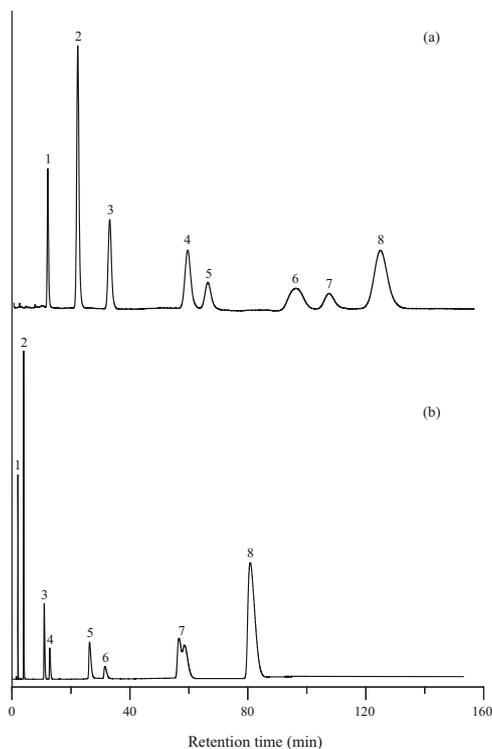


Fig. 1. Chromatograms for an aqueous mixture of the set of β -blockers eluted isocratically using 15% v/v acetonitrile in the presence of 0.10 M SDS (a), and without SDS (b). Column: Zorbax Eclipse XDB-C8. Peak identity: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) acebutolol, (4) metoprolol, (5) celiprolol, (6) oxprenolol, (7) labetalol, and (8) propranolol.

solutions containing SDS and organic solvent. For this purpose, we selected a group of eight β -blockers with different polarities as probe compounds: acebutolol, atenolol, carteolol, celiprolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol, and propranolol. Along this study, the behaviour in MLC was compared with hydro-organic RPLC using the same organic solvent. The aim of this work is not the implementation of a specific procedure to analyse β -blockers, but to show a useful methodology for analysts to implement gradients of organic solvent in MLC for β -blockers (parent drugs and/or metabolites), or other compounds (basic and other types of compounds).

3.1. Isocratic separation of the β -blockers

3.1.1. Preliminary assays

Before implementing gradient elution, it is often convenient to assess the chromatographic behaviour using isocratic conditions. This is especially true for MLC. Thus, we carried out preliminary experiences to separate the eight β -blockers, using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column and mobile phases containing 15% acetonitrile, in the presence of 0.10 M SDS. The retention was too long, especially for the most hydrophobic compounds (oxprenolol, labetalol

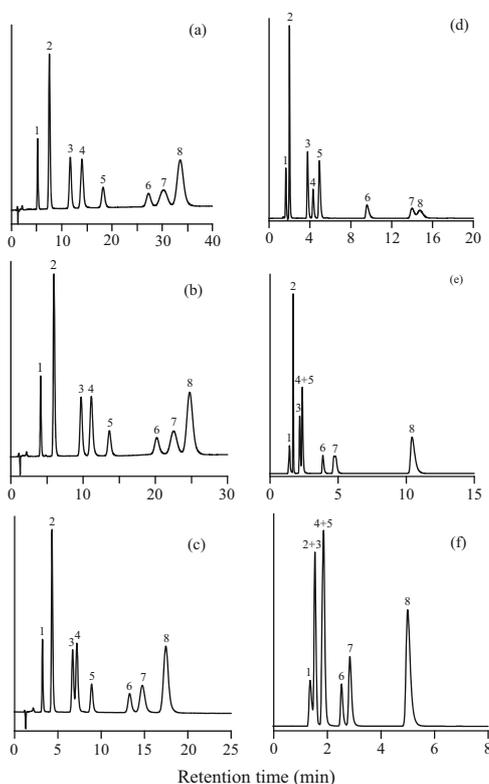


Fig. 2. Chromatograms for an aqueous mixture of the set of β -blockers eluted isocratically with micellar-organic (a–c), and conventional hydro-organic (d–f) mobile phases, containing 10% (a and d), 15% (b and e), and 20% (c and f) 1-propanol. The SDS concentration for the micellar-organic mobile phases was 0.10 M. See Fig. 1 for column and peak identity.

and propranolol), with retention times reaching 300 min or above. We decided to change the column by a similar less hydrophobic (Zorbax Eclipse XDB-C8), for which the retention times decreased significantly, but keeping still too large values, as depicted in Fig. 1a.

For comparison, in Fig. 1b, the chromatogram obtained with 15% acetonitrile (without SDS) is shown. Although the elution order is the same for both chromatographic modes, the particular behaviours for MLC (Fig. 1a) and conventional RPLC (Fig. 1b) are observed: peak distribution is more homogeneous along the chromatogram for the MLC run. Also, the tailing behaviour observed with the acetonitrile-water mixture is less evident with the micellar-organic mobile phase, but in this case the peaks are wider and the retention for all peaks shifted to longer times. The double peak for labetalol in the conventional RPLC chromatogram is noteworthy. This double peak was also observed in other chromatograms obtained with hydro-organic mixtures in this work.

3.1.2. Use of hybrid mobile phases of SDS and 1-propanol

Although 1-propanol is not a usual solvent in conventional RPLC, it has become the solvent of choice in MLC since the early

years of the technique. This solvent gives a solution to the weak elution strength of methanol and acetonitrile in MLC, being particularly useful for moderately polar compounds. Fig. 2a–c depict the chromatograms obtained for the β -blockers with 10, 15 and 20% 1-propanol, respectively, in the presence of 0.10 M SDS. For comparison, in Fig. 2d–f, the chromatograms obtained with 1-propanol at the same concentrations in the absence of surfactant are shown. The elution patterns are different in the two chromatographic modes.

As observed, in the conventional RPLC mode, 1-propanol is too strong: the separation is adequate for 10% 1-propanol, but 15% 1-propanol resulted in coelution of metoprolol and celiprolol. For 20% 1-propanol, carteolol and acebutolol also coeluted. In contrast, the peaks in the chromatograms obtained with the combination of SDS and 1-propanol (Fig. 2a–c) were well or sufficiently well resolved for the three assayed concentrations of organic solvent, although the retention times were still long. Note that the selectivity for 10% and 15% 1-propanol in the MLC mode was similar.

Consequently, the separation of the β -blockers in both chromatographic modes should be conveniently performed in the gradient mode to allow the resolution of the early eluting compounds and/or reduce the analysis time. In the conventional RPLC mode, acetonitrile seems to be more adequate than 1-propanol. Also, the gradients should reach concentrations well above 15% acetonitrile, and considering the distribution of peaks in the isocratic chromatograms, rather complex gradients are needed.

3.2. Preliminary assays in MLC gradient elution

Since the aim of this work was to implement a direct injection procedure, we concentrated our effort to optimise a gradient in MLC. The chromatogram in Fig. 2c indicated the need of 1-propanol contents of at least 20% to elute the most hydrophobic β -blockers in sufficiently short times, but acebutolol and metoprolol showed a small overlapping at this mobile phase composition. On the other hand, the column is better protected from clogging when the physiological sample is injected in an eluent with low organic solvent contents (or without organic solvent). We decided, therefore, to run gradients starting with 0.10 M SDS and increasing 1-propanol linearly from 0 to 30% over different time periods ($t_G = 15$ to 45 min). The gradients were built by mixing gradually a 0.10 M SDS aqueous solution (reservoir A) with 1-propanol (reservoir B). In further runs, we added a 2 min isocratic step with 0.10 M SDS before starting the gradient, in order to increase the protection of the column against the proteins in the physiological fluid.

The use of a pure micellar solution, or a hybrid solution of SDS containing a rather small amount of 1-propanol, at the beginning of the gradient, forced to increase the 1-propanol content in the eluent above 20% at the end of the gradient. The final 1-propanol content was limited to 30% to maintain the system pressure sufficiently below the maximal operating pump pressure. Along the gradients, the pressure ranged between 100 and 250 bar, without apparent differences between the hydro-organic and micellar modes.

It should be noted that above 22% 1-propanol, SDS micelles are disrupted [32]. Therefore, the behaviour is changed to the HSLC mode. However, in previous work we checked that within certain organic solvent ranges, a unique retention model can be used to describe the retention in both MLC and HSLC modes [7]. With the selected gradients (0–30% 1-propanol with or without a previous isocratic step of 2 min with 0.10 M SDS), $t_G > 20$ min was needed to elute all β -blockers. As observed in Figs. 3a–c and 4a and b, in these conditions the chromatograms contain a

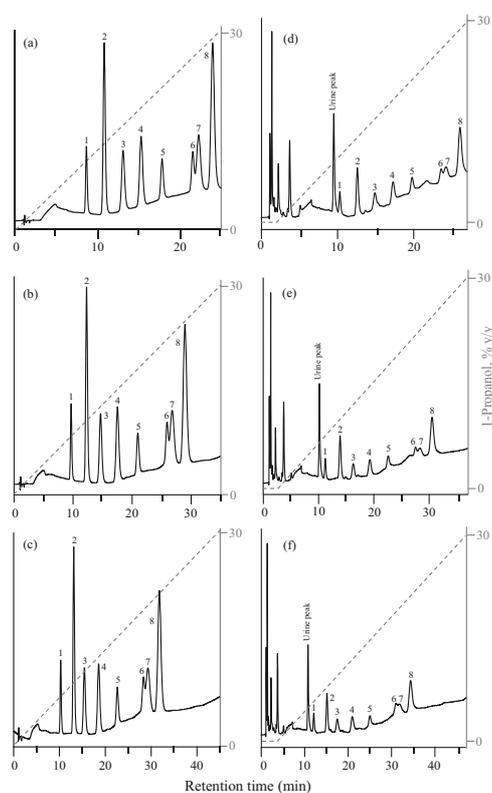


Fig. 3. Chromatograms obtained using gradient elution for an aqueous mixture of the β -blockers (a–c), and a urine sample fortified with the β -blockers (d–f). The concentration of SDS in reservoir A was fixed at 0.10 M, and the 1-propanol content was linearly increased from 0 to 30% over 25 min (a and d), 35 min (b and e), and 45 min (c and f). For the fortified sample, an isocratic step of 2 min with 0.10 M SDS preceded the gradient. See Fig. 1 for column and peak identity. The peaks at retention times shorter than that marked as “Urine peak” (an endogeneous compound) correspond to the elution of matrix proteins and other endogeneous compounds.

critical pair (oxprenolol and labetalol), which in the isocratic mode eluted at close times, but was base-line resolved. It should be noted that at increasing t_G (from 25 to 45 min, Fig. 3a–c), the analysis time increased, but the resolution of the critical pair decreased.

We examined also the effect of the concentration of SDS on the resolution. As observed in Fig. 4a and b, an increase from 0.10 to 0.20 M SDS in reservoir A decreased the analysis time, but the resolution of the critical pair was deteriorated. A smaller SDS concentration would allow better resolution of the critical pair, but we decided to use 0.10 M SDS to guarantee column protection with surfactant monomers. Fig. 4c shows a chromatogram obtained with a similar gradient in the absence of SDS (i.e. conventional RPLC mode). The elution profile is significantly different to the MLC mode. As observed, acebutolol and metoprolol coeluted, and labetalol produced a double peak.

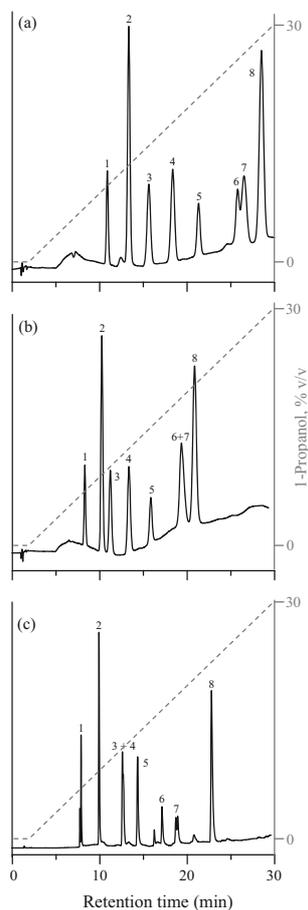


Fig. 4. Chromatograms obtained using a linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 30 min after an isocratic step of 2 min. The gradient was started with: (a) 0.10 M SDS, (b) 0.20 M SDS, and (c) 0 M SDS. See Fig. 1 for column and peak identity.

3.3. Re-equilibration studies

In conventional RPLC, a significant amount of the organic solvent is extracted by the alkyl bonded stationary phase. As the concentration of organic solvent is changed during a gradient run, the composition of the bonded phase may change, being solvated to a varying extent [33,34]. Other possible non-ideal processes are solvent de-mixing due to the preferential uptake of one mobile phase component by the stationary phase, and changes in the column dead time. Failure to regenerate a column completely after a gradient run will produce wide variability in the retention of early eluting peaks, from one injection to the next one. The column will need re-equilibration by flushing through the column some volumes of the initial mobile phase composition, before the next gradient run. Despite the faster gradient separation, the re-equilibration

time (which may be significant) will increase the analysis time.

Because of their extensive use as ion-pairing reagents, the adsorption of surfactant monomers on RPLC stationary phases at concentrations below the CMC has received much attention [35]. In these conditions, equilibration times are quite long. However, above the CMC (micellar conditions), the amount of free surfactant in the mobile phase is approximately constant such that any change in the total surfactant concentration will result only in a change in the micelle concentration. Furthermore, adsorption isotherms have shown that, in these conditions, no or little change occurs in the stationary phase, even in the presence of organic solvent [5]. Therefore, it is possible to speed up the elution of strongly retained compounds with surfactant gradients. Starting the gradient above the CMC, no additional surfactant will adsorb onto the stationary phase as the total surfactant concentration is increased and the surfactant will not be either desorbed when returning to the initial conditions. The only re-equilibration necessary before analysing the next sample is that amount of mobile phase needed to flush the mixer and the injector, together with other pre-column volumes. This gradient capability was first reported by Landy and Dorsey in 1984 [19], and further described by Madamba-Tan et al. in 1994 [21]. It was presented as a much faster approach than conventional RPLC, because of the significant reduction in column re-equilibration after a gradient. In 2003, McCormick et al. demonstrated that the column re-equilibration necessary between injections after a surfactant gradient is as rapid on large-pore columns as on small-pore columns [36,37].

When a gradient of organic solvent is used in MLC, however, the composition of the stationary phase might change since the addition of an organic solvent to a micellar mobile phase may result in significant desorption of the surfactant monomers from the stationary phase [38]. In addition, the surfactant CMC in the mobile phase depends on the organic solvent content [39], and a change in the CMC may lead to a change in the concentration of adsorbed surfactant monomers. This would disturb the equilibration of the column. However, several authors have observed that re-equilibration times for gradients of organic solvent are also short [11,22,23]. According to Madamba-Tan et al., the main reason behind this behaviour is the range of organic solvent content along the gradient, which is too limited to produce any significant effect on the composition of the stationary phase [22]. The re-equilibration time in conventional RPLC after gradient elution with propanol is also short, as first described was Cole and Dorsey, and explained by the consistent solvation of the stationary phase by this solvent [40].

It is worth to show here a representation of some data obtained by Madamba-Tan et al. [22] to illustrate the short re-equilibration time in an MLC procedure with a gradient of organic solvent, in comparison to conventional RPLC (Fig. 5a and b, respectively). The authors injected dansylated phenylalanine on a Nucleosil C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA), using a 3–15% 2-propanol gradient, in the presence and absence of 0.15 M SDS. In that study, the system was flushed with different volumes of the initial concentration of organic solvent in the gradient up to 20 ml, at a flow-rate of 1 ml/min. Note that the column can be considered completely equilibrated when the retention time of the probe compound reaches a constant value. As observed, in the work of Madamba-Tan et al., the signal was stabilised at around 11 min for both conventional RPLC and MLC. The first point in each plot was obtained immediately after the gradient reached its top value (a manual injector was used). Since the dwell time (i.e. the time taken to sense the initial conditions) was 3.5 min, the column re-equilibration time was actually 7.5 min.

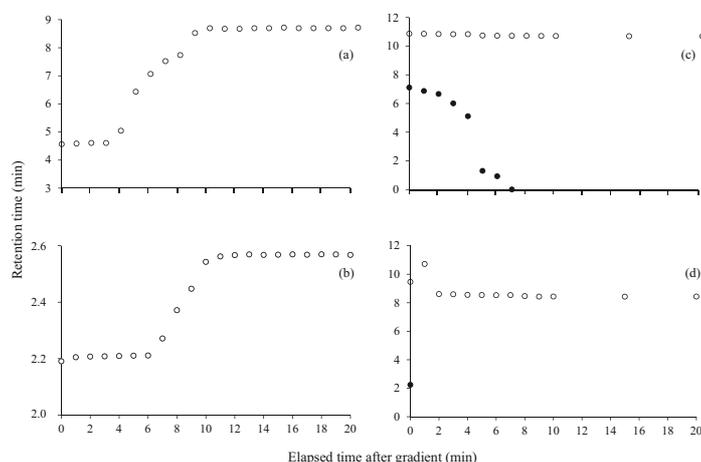


Fig. 5. Experiences carried out to obtain the column re-equilibration time after gradient elution, using a micellar-organic eluent with SDS (a and c), and a hydro-organic eluent (b and d); (a and b) depict data reported by Madamba-Tan et al. [22], and (c and d) correspond to this work. The gradient for (a and b) consisted of a linear increase of 2-propanol from 3 to 15% over 15 min, and for (c and d), a linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 30 min. The plots correspond to: (a and b) danlylated phenylalanine (○), and (c and d) atenolol (○) and the front peak in the chromatogram (●). See text for other details.

Fig. 5c and d depict a similar study carried out in our laboratory by injecting atenolol in the Zorbax Eclipse XDB-C8 column, with the same geometrical characteristics as the Nucleosil C18 column used by Madamba-Tan et al. In our experiences, we used an automatic injector with an injection routine that started just at the time the gradient top value was reached and took around 2 min, which is a value above the dwell time ($t_D = 0.89$ min). It is evident that the re-equilibration time was significantly shorter (less than 2 min) with respect to that reported by Madamba-Tan et al. 20 years ago (around 7.5 min). To appraise this result, it should be noted that the β -blockers are positively charged, and consequently, their retention is very sensitive towards changes in the stationary phase composition, especially the amount of the adsorbed anionic surfactant. Also, note that the gradient starts with pure micellar conditions (a 0.10 M SDS solution) and progressively increases the organic solvent content, which could affect significantly the surfactant thickness on the stationary phase (but this does not seem to happen). The re-equilibration time found in our laboratory with the current technology agrees with the values reported recently by Nakao et al. for MLC, of 1 or 2 min before being ready for the next injection [11,28,29].

Before finishing this section, it is interesting to observe chromatograms taken after several elapsed times once the gradient has finished, between 1 and 10 min (Fig. 6). A sharp signal appears at decreasing times, which corresponds to the front signal. The time at which this signal appears is depicted in Fig. 5c as full circles. A similar signal was observed for the hydro-organic mode, but it appeared always at a time below 1 min (Fig. 5d). Note that the gradient of organic solvent in MLC is built by mixing volumes of a 0.10 M SDS aqueous solution (reservoir A) with volumes of 1-propanol (reservoir B). Specifically, during the gradient, the eluent contained 100–70% of A and 0–30% of B. When the top value was reached, the system was changed immediately to 100% of A (pure SDS), giving rise to the observed front signal.

Therefore, the re-equilibration time in MLC is immediate, but the front signal may interfere in the chromatograms, which would

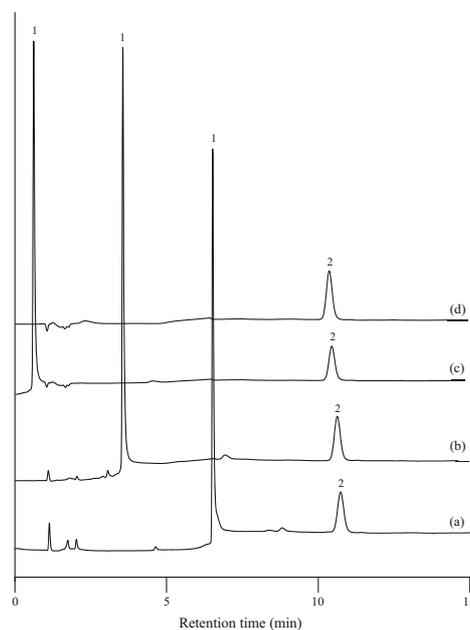


Fig. 6. Chromatograms obtained for the micellar-organic mode with SDS/1-propanol, using different elapsed times after the gradient: (a) 1 min, (b) 5 min, (c) 8 min, and (d) 10 min. Column: Zorbax Eclipse XDB-C8. Gradient: 0.10 M SDS in reservoir A and linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 30 min. Peak identity: (1) front signal, and (2) atenolol.

force to wait ca. 7 min before starting the gradient. However, in the present work, the front signal did not represent any interference, since it appeared in the region before the β -blockers elution (see Section 3.4.2).

3.4. Use of DryLab[®] to optimise gradients of organic solvent in MLC/HSLC after direct injection

3.4.1. The DryLab[®] software

DryLab[®] is a software package extensively used in routine laboratories to optimise protocols in conventional RPLC, using either isocratic or gradient elution [41,42]. In a sufficiently narrow organic solvent concentration range, isocratic elution in RPLC is described by the following linear equation:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (1)$$

where k_w is the retention factor in water, φ the organic solvent concentration, and S the "solvent strength". This equation has been demonstrated to be also valid in MLC [43,44].

Gradient elution is significantly more complex than isocratic elution. The retention behaviour in gradient elution is described using the so-called "fundamental equation for gradient elution":

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \quad (2)$$

where t is a time variable, t_0 the time the mobile phase takes to go through the column (i.e. the dead time), t_g the time a solute requires to reach the column outlet under gradient conditions, and $k(\varphi(t))$ the function that relates the isocratic retention factor with the solvent content, which changes with time according to a gradient program. The simplest approach in gradient elution assumes a linear retention model (Eq. (1)), and a linear gradient program:

$$\varphi = \varphi_0 + mt \quad (3)$$

m being the gradient slope and φ_0 the initial organic solvent content in the gradient. In these conditions, the integration of Eq. (2) is

simple, giving rise to the extensively used "linear solvent strength model" [45,46]:

$$t_g = \left[\frac{t_0}{b} \log 2.3k_0b(1-f) + 1 \right] + t_D + t_0 \quad (4)$$

where k_0 is the isocratic retention factor at the initial mobile phase condition, f the column fraction the solute has already travelled before the gradient reaches it, t_D the dwell time, and b the gradient steepness, calculated as:

$$b = \frac{St_0\Delta\varphi}{t_G} \quad (5)$$

where $\Delta\varphi$ is the change in the volume fraction of organic modifier during the gradient, and t_G the total gradient time.

Madamba-Tan et al. applied Eqs. (1), (4) and (5) to predict the retention in MLC with satisfactory results [22]. These equations are also used in the DryLab[®] software for HPLC method development to describe gradient elution in conventional RPLC [45,46]. The DryLab[®] software implements an interpretive approach, where the retention behaviour is modelled using experimental information from RPLC runs, and the retention times at other conditions are predicted in a selected experimental domain. This allows calculating the resolution for the critical pair, and accordingly, the optimal separation is shown. Also, the software informs about the chromatograms that may be obtained by modifying the recommended gradient for selected linear and multi-linear gradients.

3.4.2. Analysis of urine samples

Because of the facility in obtaining the samples, urine is preferred over other physiological fluids for controlling the intake of drugs. As commented, in MLC, the micelles in the mobile phase solubilise high-molecular-mass proteins in urine samples. Meanwhile, the underlying alkyl-bonded silica phase is protected by a constant layer of surfactant monomers. The proteins are not retained probably due to the formation of protein-surfactant complexes, which are excluded from the pores of the stationary phase packing, appearing as a broad band at the solvent front [13,14]. The

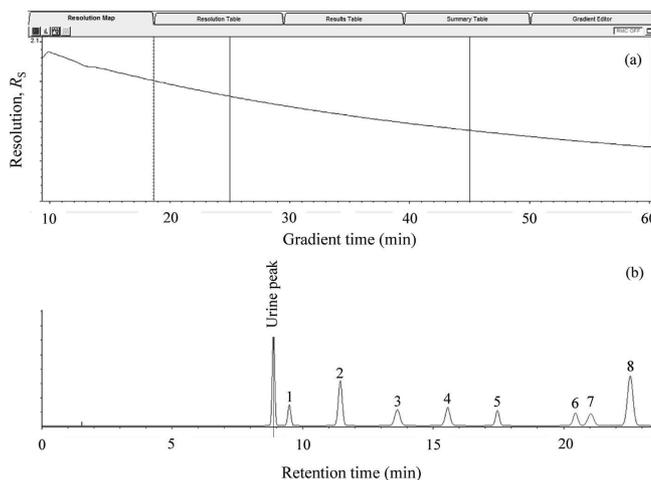


Fig. 7. Optimisation of the gradient separation of the β -blockers in a urine sample assisted by DryLab[®]: (a) resolution map, and (b) recommended chromatogram. See Fig. 1 for column and peak identity. The vertical lines correspond to the training gradients (25 and 45 min), and the recommended separation (18.6 min).

matrix also contains endogenous compounds with peaks at diverse retention times that may overlap the peaks of analytes, resulting in a useless region in the chromatogram. However, frequently, the analytes elute after this region as shown in the chromatograms in Fig. 3d–f, which were obtained with a 0–30% linear gradient of 1-propanol and different gradient times of $t_G = 25, 35$ and 45 min, respectively, after an isocratic step of 2 min with 0.10 M SDS. Atenolol, which is the least retained compound in this work, eluted close to a prominent peak corresponding to an endogenous compound in urine, whose retention time has been checked to vary in less than 4% considering males and females of different ages, diets and weights, although its intensity changes for different individuals [13].

The analyses were performed with 1 ml of urine fortified with the β -blockers, and diluted in a 1:25 factor with water. It should be said here that dilution of the urine sample will keep the column operative for a longer time, but injection of undiluted urine samples to reach smaller limits of detection is in general feasible, provided adequate detection is implemented. The urine solutions were injected into the chromatograph without any other treatment than filtration, made directly in the autosampler vials through a 0.45 μ m Nylon membrane. Note that the 1-propanol content at the elution of the urine peak close to atenolol in Fig. 3d–f was 9.0%, 7.0% and 5.8% 1-propanol, respectively.

3.4.3. Optimisation of the gradient protocol

We show in this section the application of the DryLab[®] software to the optimisation of a gradient of organic solvent in MLC. It should be first indicated that the software needs a training set constituted of two gradients covering the same domain of organic solvent, but different t_G values. These runs allow fitting the retention model (Eq. (4)) for the application.

We should remind that the eluent in MLC contains SDS micelles, which influences the elution strength. Therefore, we checked first the prediction capability of DryLab[®] in the presence of SDS. The retention times for the chromatograms in Fig. 3a and c, corresponding to a gradient using 0.10 M SDS and a 0–30% linear increase of 1-propanol over 25 and 45 min, respectively, were used to train the software. The input dwell time was $t_D = 0.89$ min. Next, the retention data for the intermediate $t_G = 35$ min (Fig. 3b) were predicted. These data are compared with the experimental data for the same conditions in Table 2. As observed, the predicted gradient retention times agreed closely with the experimental values, with small negative errors of up to 0.7 min. We should note that in these experiences, all throughout the gradient, the linear gradient of organic solvent was immediately started. However, the recommended gradient for the analysis of urine samples in this work included a previous isocratic step of 2 min with 0.10 M SDS, which the DryLab[®] software does not consider. In order to predict this situation, we

Table 2

Experimental and predicted retention times (min) obtained with the DryLab[®] software for a gradient using 0.10 M SDS in reservoir A and a linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 35 min. The results for an aqueous mixture of the standards and a urine sample fortified with the standards are given. For the fortified urine sample, a 2 min isocratic step with 0.10 M SDS preceded the gradient.

Peak identity	Standards ^a		Urine + standards ^b	
	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
Urine peak	–	–	10.16	10.28
Atenolol	9.67	9.52	11.21	11.41
Carteolol	12.29	12.06	13.89	14.18
Acebutolol	14.66	14.42	16.27	16.55
Metoprolol	17.52	17.12	19.27	19.62
Celiprolol	20.97	20.47	22.58	23.09
Oxprenolol	25.92	25.25	27.53	28.27
Labetolol	26.79	26.11	28.32	29.00
Propranolol	28.95	28.23	30.50	31.30

^a The real dwell time (0.89 min) was input in the DryLab[®] software.

^b The input dwell time was the summation of the real dwell time and the isocratic step (in total: 2.89 min).

decided to increase the input dwell time in 2 min ($t_D = 2.89$ min). The training retention times corresponded to the chromatograms in Fig. 3d and f with $t_G = 25$ and 45 min, respectively. The data for $t_G = 35$ min were predicted (Fig. 3e) and compared with the experimental data for the urine sample (Table 2). The predictions were again rather satisfactory, with positive errors of up to 0.8 min.

Fig. 7a shows the resolution of the critical pair as depicted by the DryLab[®] software. The vertical lines correspond to the two training gradients ($t_G = 25$ and 45 min), and the recommended gradient, which is the limit of satisfactory extrapolation ($t_G = 18.6$ min in the case of study). The chromatogram below (Fig. 7b) corresponds to the prediction given by the software for this limit. The input dwell time was again $t_D = 2.89$ min. Observe that the peaks of oxprenolol and labetolol are predicted to be resolved.

We further considered the possibility of modifying the recommended gradient to obtain better resolution and/or smaller analysis time. We changed the gradient time successively to $t_G = 15, 13$ and 11 min, keeping the dwell time at $t_D = 2.89$ min, and examined the predicted chromatograms. We also examined a gradient with $t_G = 15$ min and $t_D = 7.89$ min, corresponding to an isocratic step over 7 min with 0.10 M SDS before starting the gradient of organic solvent. Table 3 compares the predicted retention times in these conditions with the experimental values. The largest systematic errors were obtained for the gradient including the long isocratic step (i.e. 7 min), with negative errors of up to 2 min for the least retained compounds, and positive errors of up to 0.5 min for the most retained compounds. Therefore, in these conditions, the role of SDS as eluent decreases significantly the accuracy of the predictions.

Table 3

Experimental and predicted retention times (min) obtained with the DryLab[®] software for a gradient using 0.10 M SDS in reservoir A and a linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 15 min (Experience 1 and 4), 13 min (Experience 2), and 11 min (Experience 3), after an isocratic step of 2 min (Experiences 1 to 3), and 7 min (Experience 4) with 0.10 M SDS. The results correspond to a urine sample fortified with the standards^a.

Peak identity	Experience 1		Experience 2		Experience 3		Experience 4	
	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
Urine peak	8.36	8.44	8.04	8.16	7.73	7.85	11.53	9.96
Atenolol	8.80	8.92	8.40	8.57	8.00	8.19	12.26	10.78
Carteolol	10.52	10.66	9.97	10.17	9.45	9.63	13.69	11.57
Acebutolol	12.45	12.72	11.78	12.15	11.07	11.50	15.07	13.26
Metoprolol	13.78	14.36	12.88	13.82	11.93	12.78	16.15	14.94
Celiprolol	15.07	15.92	13.99	14.97	12.87	13.93	17.06	16.57
Oxprenolol	17.23	18.41	15.90	17.17	14.60	15.86	18.84	19.11
Labetolol	17.58	18.94	16.25	17.67	14.96	16.37	19.07	19.62
Propranolol	19.16	20.30	17.93	19.06	16.70	17.80	20.90	20.93

^a The summation of the real dwell time and the isocratic step was input in the DryLab[®] software: 2.89 min for Experiences 1 to 3, and 7.89 min for Experience 4.

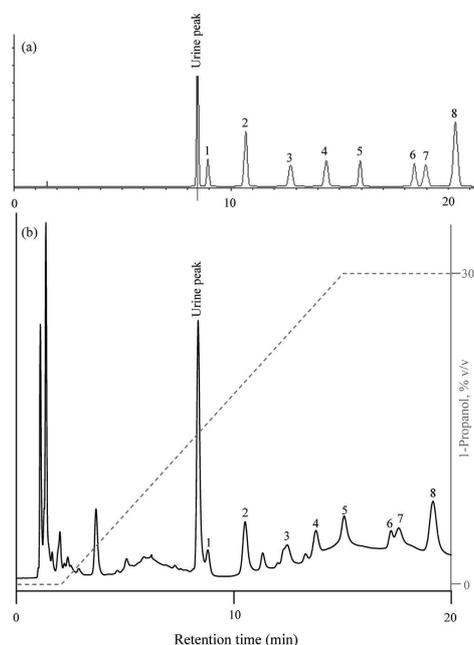


Fig. 8. Predicted chromatogram by DryLab® (a), and experimental chromatogram (b), for a urine sample fortified with the β -blockers at the selected separation conditions. Gradient: 0.10 M SDS in reservoir A and linear increase of 1-propanol from 0 to 30% over 15 min, with a previous isocratic step of 2 min with 0.10 M SDS, followed by an isocratic step of 0.07 M SDS/30% 1-propanol beginning at 15 min. See Figs. 1 and 3 for column and peak identity.

Fig. 8 compares the experimental chromatogram for the 0–30% gradient run over 15 min after a 2 min 0.10 M SDS isocratic step, with the chromatogram predicted by the DryLab® software. Both agree satisfactorily, although the experimental peaks are wider giving rise to larger overlapping of the peaks of oxprenolol and labetalol with respect to the predicted chromatogram.

4. Conclusions

The particular elution behaviour of MLC makes gradient elution often unnecessary. It is, however, surprising that among the hundreds of MLC analytical procedures that have been reported to determine different types of compounds in a variety of samples, only very few make use of gradient elution. This elution mode may be useful to analyse mixtures of compounds within a wide range of polarities, decreasing the analysis time, and as already reported by Nakao et al. [11,28,29], it can benefit the analysis of physiological samples, especially in the case of implementing procedures for moderately to low polar compounds. The use of an initial micellar eluent with a low organic solvent content or just a pure micellar (without surfactant) solution, which would be insufficient to elute moderately to low polar analytes in the isocratic mode, will however provide better protection of the column against the proteins in the physiological fluid. Once the proteins are swept away, the elution strength can be increased using a positive linear gradient of organic solvent.

This work aims to show that the implementation of gradient elution in MLC is rather simple and allows rapid procedures without pre-treatment, or the need of re-equilibration. Also, in the case of performing a gradient of organic solvent, in spite of the presence of surfactant, the optimisation of the separation conditions can be carried out satisfactorily with commercial optimisation software like DryLab®, which has not been reported before in MLC. Therefore, analysts should certainly consider the possibility of using gradient elution in MLC.

The selectivity of the separation in MLC is rather different with respect to conventional RPLC, due to the variety of interactions between solutes, micelles and the adsorbed surfactant monomers on the stationary phase, which give rise to a highly versatile technique, appropriate for a wide range of solutes (from hydrophilic to hydrophobic). Hybrid eluents in MLC have the advantage of requiring significantly smaller amounts of organic solvent with respect to conventional RPLC, especially for apolar compounds, even when using an HSLC procedure where the amount of organic solvent is somewhat larger. This means lower cost, toxicity and environmental impact of hazardous wastes. Also, the stabilisation of organic solvents by micelles in the mobile phase reduces the risk of evaporation. These properties are attractive considering the increasing restriction in the use of organic solvents in the laboratories.

Acknowledgements

This work was supported by Projects CTQ2010-16010/BQU and CTQ2013-42558-P (both from Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, Spain), and FEDER funds. J. Rodenas-Montano thanks the Generalitat Valenciana for a contract for research support inside the Gerónimo Forteza Program (Project CPI 13-173), and C. Ortiz-Bolsico thanks MINECO for an FPI grant. Thanks are due also to K. Monks and I. Molnár (Molnár Institute for Applied Chromatography, Berlin, Germany) for their help in the DryLab® software.

References

- [1] D.W. Armstrong, S.J. Henry, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 657.
- [2] A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, in: Jack Cazes (Ed.), *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, NY, 2000.
- [3] M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, A. Berthod, *Sep. Purif. Rev.* 38 (2009) 45.
- [4] B.K. Lavine, S. Hendayana, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 19 (1996) 101.
- [5] A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1356.
- [6] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasió, E.F. Simó-Alfonso, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 109.
- [7] M.J. Ruiz-Angel, J.R. Torres-Lapasió, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7090.
- [8] J.G. Dorsey, M.T. DeEcheagaray, J.S. Landy, *Anal. Chem.* 55 (1983) 924.
- [9] X. Li, S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 235.
- [10] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, *Sep. Purif. Rev.* 43 (2014) 124.
- [11] R. Nakao, M. Schou, C. Halldin, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3222.
- [12] L.J. Cline-Love, J.J. Fett, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 323.
- [13] E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández, M.C. García-Alvarez-Coque, *Quim. Anal.* 12 (1993) 167.
- [14] M.C. García-Alvarez-Coque, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. B* 736 (1999) 1.
- [15] J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 485.
- [16] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, second ed., Wiley, New York, NY, 1997.
- [17] M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 533.
- [18] M.J. Ruiz-Angel, R.D. Caballero, E. Simó-Alfonso, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 31.
- [19] J.S. Landy, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. Sci.* 22 (1984) 68.
- [20] J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, J.S. Landy, J.L. Lin, *J. Chromatogr.* 316 (1984) 183.
- [21] L.S. Madamba-Tan, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 321.
- [22] L.S. Madamba, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 335.
- [23] E.K. Paleologos, S.D. Chytiri, I.N. Savvaidis, M.G. Kontominas, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 217.
- [24] E.K. Paleologos, M.G. Kontominas, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1289.

- [25] A.R. Ghorbani, F. Momenbeik, J.H. Khorasani, M.K. Amini, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 439.
- [26] S.M. Bryant, K.D. Altria, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1498.
- [27] J. Cao, H. Qu, Y. Cheng, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1946.
- [28] R. Nakao, M. Schou, C. Halldin, *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 76.
- [29] R. Nakao, C. Halldin, *Talanta* 113 (2013) 130.
- [30] C.J. Drayton (Ed.), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [31] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 211.
- [32] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7082.
- [33] R.M. McCormick, B.L. Karger, *J. Chromatogr.* 199 (1980) 259.
- [34] R.M. McCormick, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2249.
- [35] R.F.W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.* 175 (1979) 51.
- [36] T.J. McCormick, J.P. Foley, Ch.M. Riley, D.K. Lloyd, *Anal. Chem.* 72 (2000) 294.
- [37] T.J. McCormick, J.P. Foley, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 1.
- [38] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, W.C. Hamlin, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1353.
- [39] S. López-Grío, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Chromatographia* 48 (1998) 655.
- [40] L.A. Cole, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 62 (1990) 16.
- [41] L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *J. Chromatogr.* 485 (1989) 65.
- [42] L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *J. Chromatogr.* 485 (1989) 91.
- [43] M.G. Khaledi, E. Peuler, J. Ngeh-Ngwainbi, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2738.
- [44] A.S. Kord, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.* 631 (1993) 125.
- [45] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
- [46] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.

C. Ortiz-Bolsico
M. J. Ruiz-Angel
M. C. García-Alvarez-Coque

Departament de Química
Analítica, Universitat de
València, Burjassot, Spain

Received September 25, 2014
Revised October 28, 2014
Accepted November 24, 2014

Research Article

Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate on a C₁₈ column under micellar and high submicellar conditions in reversed-phase liquid chromatography

Micellar liquid chromatography makes use of aqueous solutions or aqueous-organic solutions containing a surfactant, at a concentration above its critical micelle concentration. In the mobile phase, the surfactant monomers aggregate to form micelles, whereas on the surface of the nonpolar alkyl-bonded stationary phases they are significantly adsorbed. If the mobile phase contains a high concentration of organic solvent, micelles break down, and the amount of surfactant adsorbed on the stationary phase is reduced, giving rise to another chromatographic mode named high submicellar liquid chromatography. The presence of a thinner coating of surfactant enhances the selectivity and peak shape, especially for basic compounds. However, the risk of full desorption of surfactant is the main limitation in the high submicellar mode. This study examines the adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate under micellar and high submicellar conditions on a C₁₈ column, applying two methods. One of them uses a refractive index detector to obtain direct measurements of the adsorbed amount of sodium dodecyl sulfate, whereas the second method is based on the retention and peak shape for a set of cationic basic compounds that indirectly reveal the presence of adsorbed monomers of surfactant on the stationary phase.

Keywords: Frontal chromatography / Half-width plots / High submicellar chromatography / Micellar liquid chromatography / Surfactant adsorption
DOI 10.1002/jssc.201401059

1 Introduction

The addition of a surfactant to an aqueous-organic mobile phase in RPLC, above the critical micelle concentration (CMC), gives rise to a particular chromatographic mode named micellar liquid chromatography (MLC), with a significantly different performance in the analysis of compounds of different nature [1]. Among several options, the anionic surfactant SDS is, by far, the most common for this purpose. SDS is notably adsorbed on the surface of nonpolar alkyl-bonded stationary phases, which consequently show a net negative charge able to act as a dynamic ion-exchanger for cationic solutes. Meanwhile, in the mobile phase, the surfactant monomers aggregate to form small clusters or micelles.

It is well known that micellar mobile phases in the absence of organic solvent are weak and yield poor peak shape, with respect to that found with conventional

aqueous-organic mobile phases [2]. The addition of a small amount of organic solvent to the mobile phase was suggested during the initial development of MLC to solve these problems. Organic solvent molecules and surfactant monomers compete for adsorption sites. This reduces the amount of surfactant adsorbed on the stationary phase, with an effect that depends on the surfactant/organic solvent ratio [3]. However, the concentration of organic solvent should be controlled to preserve the integrity of micelles. At high organic solvent concentration, micelles break down [4]. This changes the chromatographic performance, giving rise to a new chromatographic mode first introduced by Li and Fritz [5], which has been recently explored under the name of high submicellar liquid chromatography (HSLC) [6, 7]. HSLC has been observed to offer some attractive advantages with respect to MLC or aqueous-organic RPLC in terms of shorter analysis time, and enhanced selectivity and peak shape, especially for the analysis of cationic basic compounds [8].

When working in the HSLC mode, full desorption of surfactant by the addition of high amounts of organic solvent is considered as a limitation, since it makes this chromatographic mode close to aqueous-organic RPLC. It has been found that moderate amounts of alcohols added to SDS micellar mobile phases are able to reduce significantly the amount of adsorbed surfactant, with a clear trend that depends on the molecular weight of the alcohol [9]. According to Li and Fritz,

Correspondence: Professor María Celia García-Alvarez-Coque, Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, Burjassot, Spain
E-mail: celia.garcia@uv.es
Fax: 34-96-354-4436

Abbreviations: CMC, critical micelle concentration; HSLC, high submicellar liquid chromatography; MLC, micellar liquid chromatography; RI, refractive index

who carried out some experiments with several nonionic and ionic surfactants in the presence of 60% v/v acetonitrile [5], significant surfactant adsorption do not occur under these conditions. The authors reached this conclusion by observing that there was no loss of surfactant from the solution, and no column re-equilibration time was needed to obtain a stable baseline. However, the shorter column equilibration in the presence of SDS [10, 11], using a linear gradient of organic solvent would rather mean that the column is still covered by the surfactant.

This work examines the adsorption of SDS under micellar and high submicellar conditions on a C_{18} stationary phase, using two methods. One of them involves direct measurements of the adsorbed amount of surfactant using a refractive index (RI) detector, which is a conventional technique to control the adsorption of mobile phase additives. The second method reveals the presence of monomers of surfactant adsorbed on the stationary phase, based on the chromatographic retention and peak shape obtained for a set of cationic basic compounds.

2 Materials and methods

2.1 Reagents, apparatus, and column

Ten β -blockers from different sources were used as probe compounds: acebutolol, atenolol, carteolol, celiprolol, esmolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, and timolol. The injected solutions contained 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The mobile phases were prepared with acetonitrile (Scharlab, Barcelona, Spain) and SDS (99% purity, Merck, Darmstadt, Germany). Acetonitrile/water mixtures in the absence of surfactant were also used. In all cases, the mobile phases were buffered at pH 3.0 with 0.01 M disodium hydrogen phosphate from Panreac (Barcelona).

The chromatographic system was from Agilent (Waldbronn, Germany) and consisted of the following modules (HP 1100 and 1260): quaternary pump, autosampler, thermostatted column compartment set at 25°C, and UV-visible detector set at 225 nm for monitoring the β -blockers. For the SDS adsorption experiments, an RI detector was used. This detector has two cells: the reference cell and the sample cell. The reference cell was flushed with an aqueous-organic mobile phase and the sample cell with a micellar-organic mobile phase. The system was controlled by an HPChemStation (Agilent B.03.02). The mathematical treatment was performed with Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, USA). Retention times and peak half-widths were measured with the MICHROM software [12].

A Kromasil C_{18} column (150 mm \times 4.6 mm id, 5 μm particle size) was used (Análisis Vínicos, Ciudad Real, Spain), with the following characteristics: 10 nm pore size, 340 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ surface area, and ~20% carbon content after endcapping, corresponding to a C_{18} bonding density of about 3.1 $\mu\text{mol m}^{-2}$. The flow rate was 1 mL/min for the analysis of β -blockers, and 0.5 mL/min for the adsorption experiments. Duplicate

chromatograms were obtained for β -blockers. Triplicate RI adsorption measurements were made.

2.2 Methodology used in the adsorption studies by frontal chromatography

When the surfactant is added to the mobile phase above its CMC, the adsorbed amount of monomers on an RPLC column increases rapidly and reaches a plateau [13]. In this work, the adsorbed SDS on the stationary phase was estimated using frontal chromatography [14]. This method consists in monitoring the change in the detector signal when a constant concentration of an additive is continuously flushed through the column. The retention volume measured from the breakthrough curve (Fig. 1A), after void volume (V_0) correction, allows determining the amount of additive adsorbed on the stationary phase (Q), at a given concentration of additive in the mobile phase. This can be calculated by:

$$Q_f = V_s(q_f - q_i) = (V_{R,f} - V_0)(C_f - C_i) \quad (1)$$

where q_i and q_f are the initial and final concentrations of additive on the stationary phase, respectively, and C_i and C_f are the initial and final concentrations in the mobile phase, respectively, V_s is the volume of adsorbent in the column, and $V_{R,f}$ the retention volume derived from the inflection point of the breakthrough curve. In our experiments, q_i was zero and V_0 was estimated to be 1.9 mL, which corresponds to the positive or negative sharp signal at 3.8 min observed in all frontal chromatograms.

The chromatographic system was first equilibrated with an acetonitrile/water mobile phase in the absence of SDS, which as commented was also used to fill the reference cell of the RI detector. The experiment started by flushing during 10 min the aqueous-organic mobile phase to get the zero level. Then, the system was switched to a mobile phase containing the same amount of acetonitrile in the presence of SDS. Once the breakthrough curve was obtained, the chromatographic system was rinsed following the usual protocol in MLC to desorb a surfactant [15], before carrying out the next experiment with another acetonitrile concentration.

3 Results and discussion

3.1 Adsorbed amount of SDS using frontal chromatography

The aim of this study was to determine how the adsorbed amount of SDS on a Kromasil column is affected in MLC as the concentration of acetonitrile in the mobile phase increases to achieve HSLC conditions, which seems to take place above 30% acetonitrile [6]. For this study, nine mobile phases with acetonitrile concentrations in the range 5–60% v/v and a fixed concentration of SDS (0.075 M) were explored. With aqueous-micellar mobile phases (without organic solvent), the amount

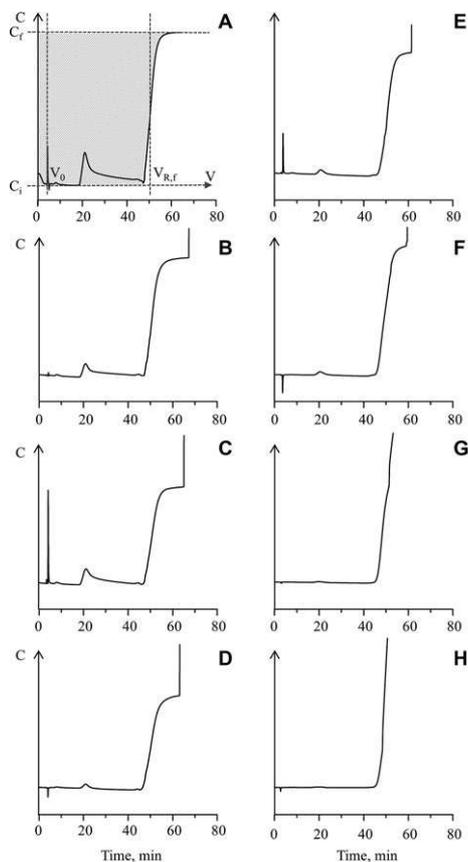


Figure 1. Chromatographic breakthrough curves for mobile phases containing 0.075 M SDS and different amounts of acetonitrile: (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 20, (E) 25, (F) 30, (G) 40, and (H) 50%, v/v.

of SDS adsorbed on silica-based stationary phases of different nature is independent of the SDS concentration above or close above the CMC. In contrast, in the presence of organic solvent, the amount of adsorbed surfactant may increase by increasing its concentration in the mobile phase [9].

Figure 1 illustrates the chromatograms obtained with frontal chromatography and mobile phases containing 0.075 M SDS, covering the micellar and high submicellar regions with acetonitrile concentrations between 5 and 50% v/v. It should be noted that after reaching the inflection point, the detector response remained stable for a very short period of time, achieving rapidly an unbalanced diode state (the short vertical signal at the longest times). This effect was more pronounced as the concentration of acetonitrile increased, and

somehow restricted the evaluation of accurate values of the adsorbed amount of SDS in the high submicellar region, especially at concentrations in the 40–60% acetonitrile range (Fig. 1G and H; results at 60% are not shown).

The detector saturation (the unbalanced diode state) can be attributed to the large difference in RI between the mobile phases in the sample and reference cells. In the experiments performed, both cells contained initially the same aqueous-organic mobile phase, and next, a micellar mobile phase was progressively flushed into the sample cell eventually replacing the initial aqueous-organic mixture. It should be noted that routine runs with an RI detector involve the use of a single mobile phase that fills both reference and sample cells followed by injection of one or more analytes, which elute from the column into the sample cell, giving rise to small RI changes.

Figure 2A depicts the measured adsorbed SDS on the Kromasil column at increasing acetonitrile concentration in the mobile phase, measured by frontal chromatography. Under micellar conditions (5–20% acetonitrile), the adsorbed SDS remained nearly constant ($\sim 2.6 \mu\text{mol m}^{-2}$), while in the 20–50% range a small gradual decrease was observed. For comparative purposes, Fig. 2B shows the adsorbed amount of SDS on the stationary phase, measured using the same method at different concentrations of the surfactant, in the presence of a relatively small amount of acetonitrile (10%) in the mobile phase. When the concentration of surfactant is increased above the CMC, the amount of micelles in solution increases, but the concentration of free monomers remains essentially constant and equivalent to the CMC. However, as observed in Fig. 2B, in the presence of acetonitrile the adsorption of SDS on the stationary phase continues at concentrations well above the CMC (at least up to 0.1 M SDS).

3.2 SDS adsorption based on retention times and peak shape of β -blockers

SDS monomers adsorbed on a C_{18} stationary phase create a negatively charged double layer able to attract positively charged species, as protonated basic solutes. This increases the retention capability of the stationary phase with respect to conventional RPLC [6]. The organic solvent added to such a system reduces the amount of surfactant monomers coating the surface of the stationary phase. However, as long as the SDS monomers still cover the stationary phase, the retention of cationic basic solutes will be high relative to a similar mobile phase in the absence of SDS.

To check the adsorption of surfactant in the presence of a high amount of organic solvent, mobile phases containing 40% acetonitrile and SDS varying from 0 to 0.075 M (HSLC conditions) were used to elute a set of ten β -blockers from the Kromasil column. The runs were carried out at pH 3, where the β -blockers are positively charged. The gradual increase in retention of all β -blockers as the concentration of surfactant increased revealed a gradual surfactant coating on the stationary phase, which retained the β -blockers through

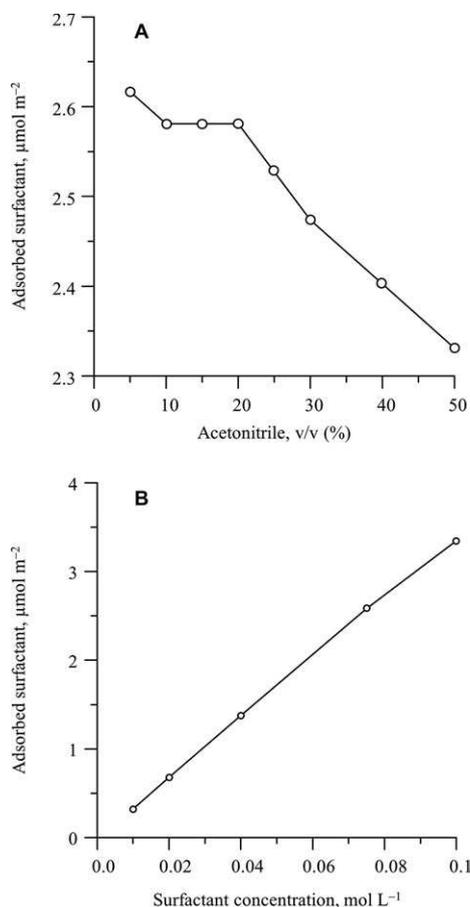


Figure 2. Adsorbed amount of SDS on the Kromasil column from mobile phases containing: (A) increasing concentrations of acetonitrile and 0.075 M SDS, and (B) increasing concentrations of SDS and 10% acetonitrile.

electrostatic attraction. The longer retention times achieved under high submicellar conditions with regard to the classical RPLC mode in the absence of SDS suggests that an important amount of surfactant is still covering the stationary phase at high acetonitrile content (40%).

Another indication of the surfactant coating is the peak shape for basic compounds. Covering the stationary phase surface by the SDS monomers masks the residual-free silanols present in conventional silica-based columns. This hinders the electrostatic interaction between the cationic solutes and ionized silanols, responsible for a slow sorption-desorption process that results in tailed and broad peaks [16].

The interaction of the cationic solutes with the SDS layer through an ion-exchange mechanism seems to be a fast process that gives rise to a significant increase in column efficiency and yields symmetrical peaks [2]. Therefore, the stationary phase coating with the surfactant can be also revealed by the peak shapes for the basic compounds.

The peak retention and shape of the β -blockers was examined using an approach based on the construction of plots that represent the left (A) and right (B) half-widths of the chromatographic peaks, measured at 10% peak height (where the baseline noise is avoided) versus the retention time, t_R [17]:

$$A = A_0 + m_A t_R \quad (2)$$

$$B = B_0 + m_B t_R \quad (3)$$

These plots can be built with the half-widths of the peaks obtained for a group of compounds eluted with a particular mobile phase, or with one or several compounds eluted with several mobile phases. In this work, we used the first approach, due to the change in the stationary phase nature with mobile phase composition. From the sum of the slopes ($m_A + m_B$), it is possible to obtain the peak width at increasing retention times (peak broadening rate), while the slopes ratio (m_B/m_A) characterizes the expected skew for retained compounds. If $m_B = m_A$, the peaks are symmetrical.

Figure 3A and F show the half-width plots for the group of β -blockers eluted with 15 and 30% acetonitrile, respectively, in the absence of SDS. It can be observed that the correlations are satisfactory and the slope of the right half-width is significantly larger with regard to the left half-width, indicating significant peak tailing. Figure 3B to E and G to J correspond to runs carried out in the presence of 0.075 M SDS with 5–25 and 30–60% acetonitrile, respectively. The decrease in the slope for the right half-width with respect to the aqueous-organic mobile phases, even at increasing concentrations of acetonitrile, is evident. This indicates significant peak enhancement related to the peak symmetry.

The corresponding slopes for the left and right half-width plots, and their sum and ratio are compared in Table 1 for acetonitrile/water mixtures, in the absence and presence of 0.075 M SDS. It is observed that the peak shape related to the peak symmetry (m_B/m_A) remarkably improved upon addition of SDS. For 15 and 30% acetonitrile, these values varied from $m_B/m_A = 5.60$ and 4.13 without surfactant to 1.26 and 1.40 in the presence of 0.075 M SDS, respectively. However, the m_B/m_A values changed scarcely with the acetonitrile content in the presence of surfactant. In contrast, in these conditions, peak broadening ($m_A + m_B$) decreased at increasing concentrations of the organic solvent, from $m_A + m_B = 0.11$ to 0.03 at 5 and 60% acetonitrile, respectively. For comparison purposes, similar information for high submicellar mobile phases containing 40% acetonitrile and SDS concentrations ranging from 0.001 to 0.075 M is also given in Table 1. As observed, the peak shape improved as the concentration of the surfactant increased.

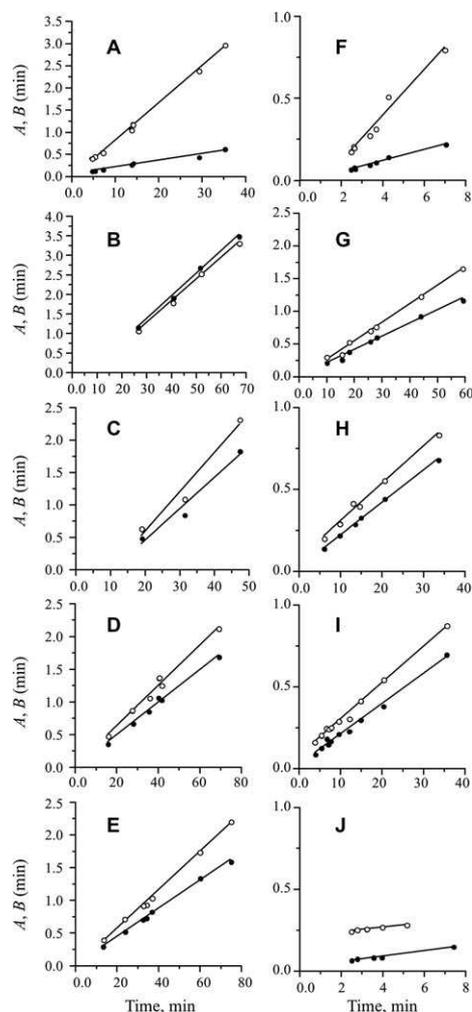


Figure 3. Peak half-width plots for the β -blockers eluted with mobile phases containing 15 (A) and 30% (F) acetonitrile in the absence of SDS, or mobile phases containing 0.075 M SDS in the presence of increasing amounts of acetonitrile: (B) 5, (C) 15, (D) 20, (E) 25, (G) 30, (H) 40, (I) 50, and (J) 60%, v/v. Half-widths: left (A, full circle), and right (B, open circle).

4 Concluding remarks

Frontal chromatography is a useful and simple tool for the determination of the adsorbed amount of SDS on a C_{18} stationary phase. However, if an RI detector is used, the quality of the

Table 1. Half-width parameters obtained using acetonitrile–water mixtures in the absence and presence of SDS

Acetonitrile (%) / SDS (M)	m_A	m_B	$m_A + m_B$	m_B/m_A
15/0	0.015	0.084	0.099	5.60
30/0	0.034	0.139	0.173	4.13
5/0.075	0.058	0.056	0.113	0.96
15/0.075	0.048	0.061	0.109	1.26
20/0.075	0.025	0.031	0.055	1.24
25/0.075	0.021	0.029	0.051	1.36
30/0.075	0.020	0.028	0.048	1.40
40/0.075	0.020	0.023	0.043	1.22
50/0.075	0.018	0.022	0.041	1.15
60/0.075	0.017	0.013	0.030	0.80
40/0.001	0.025	0.055	0.081	2.18
40/0.003	0.036	0.075	0.111	2.09
40/0.005	0.030	0.038	0.067	1.26

obtained results is significantly affected by the amount of acetonitrile present in the mobile phase, especially above 30% acetonitrile. The application of an RPLC method based on the measurement of chromatographic parameters (retention times and peak half-widths) is a good alternative to indicate the existence of adsorbed surfactant layer on the stationary phase surface.

The better peak performance at increasing organic solvent in the presence of surfactant should be explained by the thinner surfactant coverage on the stationary phase. The information contained in Table 1 suggests that at the maximal concentration of acetonitrile examined in this work (60%), the stationary phase is still coated by SDS.

This work was supported by Project CTQ2013-42558-P (Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico is grateful for a FPI grant from MINECO.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., Berthod, A., *Sep. Purif. Rev.* 2009, **38**, 45–96.
- [2] Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., García-Alvarez-Coque, M. C., *Sep. Purif. Rev.* 2013, **42**, 1–27.
- [3] López-Grió, S., García-Alvarez-Coque, M. C., Hinze, M. L., Quina, F. H., Berthod, A., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 4826–4835.
- [4] Zana, R., *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995, **57**, 1–64.
- [5] Li X., Fritz, J. S., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 4481–4484.
- [6] Ruiz-Angel, M. J., Torres-Lapasió, J. R., García-Alvarez-Coque, M. C., Carda-Broch, S., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 9705–9713.

- [7] Ruiz-Angel, M. J., Torres-Lapasió, J. R., García-Alvarez-Coque, M. C., Carda-Broch, S., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 3199–3209.
- [8] Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., García-Alvarez-Coque, M. C., *Sep. Purif. Rev.* 2014, 43, 124–154.
- [9] Borgerding, M. F., Hinze, W. L., Stafford, L. D., Fulp, G. W., Hamling, W. C., *Anal. Chem.* 1989, 61, 1353–1358.
- [10] Rodenas-Montano, J., Ortiz-Bolsico, C., Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2014, 1344, 31–41.
- [11] Madamba, L. S., Strasters, J. K., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1994, 683, 335–345.
- [12] Torres-Lapasió, J. R., *MICROM Software in Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York 2000.
- [13] Berthod, A., Girard, I., Gonnet, C., *Anal. Chem.* 1986, 58, 1356–1358.
- [14] Cavazzini, A., Felinger, A., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2003, 1012, 139–149.
- [15] Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., *LC–GC Europe* 2008, 21, 420–429.
- [16] McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 858–880.
- [17] Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 1786–1798.

Q1

Ester Peris-García
Casandra Ortiz-Bolsico
Juan José Baeza-Baeza
María Celia García-Alvarez-Coque

Departament de Química
Analítica, Universitat de
València, Burjassot, Spain

Received February 5, 2015
Revised March 25, 2015
Accepted March 30, 2015

Research Article

Isocratic and gradient elution in micellar liquid chromatography with Brij-35

Polyoxyethylene(23)lauryl ether (known as Brij-35) is a nonionic surfactant, which has been considered as an alternative to the extensively used in micellar liquid chromatography anionic surfactant sodium lauryl (dodecyl) sulfate, for the analysis of drugs and other types of compounds. Brij-35 is the most suitable nonionic surfactant for micellar liquid chromatography, owing to its commercial availability, low cost, low toxicity, high cloud temperature, and low background absorbance. However, it has had minor use. In this work, we gather and discuss some results obtained in our laboratory with several β -blockers, sulphonamides, and flavonoids, concerning the use of Brij-35 as mobile phase modifier in the isocratic and gradient modes. The chromatographic performance for purely micellar eluents (with only surfactant) and hybrid eluents (with surfactant and acetonitrile) is compared. Brij-35 increases the polarity of the alkyl-bonded stationary phase and its polyoxyethylene chain with the hydroxyl end group allows hydrogen-bond interactions, especially for phenolic compounds. This offers the possibility of using aqueous solutions of Brij-35 as mobile phases with sufficiently short retention times. The use of gradients of acetonitrile keeping the concentration of Brij-35 constant is another interesting strategy that yields a significant reduction in the peak widths, which guarantee high resolution.

Keywords: Brij-35, Chromatographic behavior / Gradient elution / Isocratic elution / Micellar liquid chromatography
DOI 10.1002/jssc.201500142

1 Introduction

Solutions containing surfactants, above the critical micelle concentration (CMC), have been used with separation purposes in hundreds of analytical reports during the last three decades, in the so-called micellar liquid chromatography (MLC) [1, 2]. In MLC, the stationary phase is modified by adsorption of surfactant monomers, and those in excess are associated in the mobile phase to form micelles. The presence of organized entities of surfactant in both phases allows the establishment of new and strong interactions, and the ability to modulate the chromatographic behavior of solutes, expanding the possibilities of separation. The retention behavior (elution strength and selectivity) in MLC can be very different from that observed with aqueous-organic mixtures in RPLC, in the absence of additives [3–6].

Some of the attractive features of MLC were detailed in the first descriptions of the technique: the reduction of toxicity and wastes due to the surfactant biodegradability and the smaller amount of organic solvent in the mobile phases, the

possibility of direct injection of physiological fluids [7], the accurate prediction of the retention behavior that greatly facilitates the optimization of separation conditions [8], and the capability of analyzing solutes in a wide range of polarities with isocratic elution in sufficiently short analysis times, performing a single injection of the sample [9]. In some cases, gradient elution may help to reduce the analysis times. However, following the enthusiastic studies carried out by Dorsey, Khaledi, and coworkers on the development of gradient elution in MLC [10–13], only a small number of MLC procedures have been described that apply this elution mode. Recently, a report describing in detail the implementation of gradient elution has been published to encourage analysts to implement gradients of organic solvent in MLC, which is rather simple and allows rapid analytical procedures without pretreatment or the need of reequilibration [14].

Although surfactants of various types (with nonionic or ionic end groups) may be used for the preparation of mobile phases in MLC, most reports involve the anionic surfactant sodium dodecyl (lauryl) sulfate (SDS, $C_{12}H_{25}SO_4^- Na^+$), followed by the cationic cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3^+ Br^-$) [1, 2]. SDS has some favorable characteristics that explain its success: it is commercially available at high purity, it dissolves effectively proteins in biological matrices, and there are extensive studies on the dynamics of micelle formation, much more numerous than for other surfactants. These features, along with a habit of use, have relegated exploring the possibilities offered by other surfactants in MLC, such as nonionic surfactants.

Q2

Correspondence: María Celia García-Alvarez-Coque, Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain
E-mail: celia.garcia@uv.es
Fax: 34-96-354-4436

Q3

Abbreviations: CMC, critical micelle concentration; MLC, micellar liquid chromatography

Borgerding and Hinze were the first to study the feasibility, advantages and limitations of the nonionic surfactant polyoxyethylene(23)lauryl ether ($C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_{23}OH$, also known as Brij-35) in MLC [15]. For this purpose, the authors used a test mixture composed of benzyl alcohol, acetophenone, methyl benzoate, benzaldehyde, benzene, and dimethyl terephthalate, which were eluted with purely mobile phases of Brij-35 (aqueous solutions of the surfactant) or hybrid mobile phases of Brij-35 and ethanol. These researchers studied later the retention mechanism of the homologous series of alkylbenzenes in MLC with Brij-35 [3], and the modification of the stationary phase by this surfactant [16]. Cline-Love and Fett found that Brij-35 was optimal for analyzing drugs in urine samples by direct injection [17]. However, despite the promising results of these early studies, the interest in the analytical use of Brij-35 declined. Some years later, two interesting reports were published on the behavior of 15 benzene and naphthalene derivatives [18] and the analysis of Al(III) and Fe(II) in serum samples as complexes with desferrioxamine [19]. More recent reports describe the determination of carbamate pesticides [20], and mixtures of various esters of benzoic and *p*-hydroxybenzoic acid in cosmetics and food samples [21]. A particularly interesting application using Brij-35 and a cyano column is the determination of cholesterol and its metabolites in food samples, using an enzymatic method in the detection step [22]. In all these reports, isocratic elution was used.

In our laboratory, we have developed a method for the analysis of apolar tricyclic antidepressants, using purely micellar mobile phases of Brij-35 [23]. A study of the effect of temperature on the isocratic elution of flavonoids with purely micellar mobile phases of Brij-35 was also carried out, where a significant enhancement in the efficiency was observed by increasing the column temperature up to 80°C, approaching the performance achieved in aqueous-organic RPLC [24]. Mobile phases containing mixed micelles of Brij-35 and SDS have also been suggested to improve the separation of organic compounds in pharmaceutical preparations [25, 26], coumarins [27], and alkaloids [28]. Brij-35 has also attracted attention in the field of quantitative structure–activity relationships: the ability of a Brij-35 MLC system to mimic biopartitioning processes has proven very useful in describing the biological behavior of diverse drugs [29–33].

In this work, an overview of the performance of Brij-35 in MLC with isocratic and gradient elution of three families of compounds with different polarities and structures is presented, which can guide analysts to develop future applications. The type of compounds that can be analyzed with this surfactant and the required experimental working conditions are discussed.

2 Materials and methods

2.1 Reagents, column, and apparatus

The following compounds were analyzed (ChemAxon predicted values of octanol/water partition constants taken from

<http://www.drugbank.ca/> are given, which correlate with the order of retention): three β -blockers (pindolol, oxprenolol, and propranolol, $\log P_{o/w} = 1.69, 2.17, \text{ and } 2.58$, respectively), six sulfonamides (sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfisoxazole, sulfadimethoxine, and sulfafinoxaline, $\log P_{o/w} = 0.52, 0.65, 0.73, 0.79, 1.26, \text{ and } 1.55$), and three flavonoids (fisetin, quercetin, and chrysin, $\log P_{o/w} = 1.81, 2.16, \text{ and } 3.01$), all from Sigma (St. Louis, MO, USA). All compounds were dissolved in a small amount of acetonitrile and diluted with water. The concentration of the injected solutions was 10 $\mu\text{g/mL}$ for β -blockers and sulfonamides, and 50 $\mu\text{g/mL}$ for flavonoids.

Mobile phases containing Brij-35 (99% purity, mean molecular mass ≈ 1200 g/mol) from Fluka (Steinheim, Germany) or/and acetonitrile from Scharlau (Sentmenat, Barcelona, Spain) were prepared and were buffered at pH 3 with 0.01 M anhydrous sodium dihydrogen phosphate from Fluka. Nanopure water, obtained with a Thermo Scientific Barnstead purification system (Dubuque, IA, USA), was used in all experiments. The solutions of the probe compounds and mobile phases were filtered through 0.45 μm Nylon membranes from Micron Separations (Westboro, MA, USA). A Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (125 mm \times 4.6 mm id, 5 μm particle size) from Agilent (Waldbronn, Germany) was used.

The liquid chromatograph was from Agilent, equipped with the following modules: a quaternary pump (HP 1200) operated at 1 mL/min, an autosampler (HP 1100) provided with 2 mL vials, a temperature controller (HP 1100), and a variable wavelength UV-visible detector (HP 1100) set at 254 nm. The system was governed with an OpenLAB CDS LC ChemStation (Agilent B.04.03). The half-widths of chromatographic peaks were measured with MICHROM software [34].

2.2 Procedures

In isocratic elution, 0.01–0.05 M aqueous solutions of Brij-35 without organic solvent were first assayed (the molarities were calculated based on the surfactant mean molecular weight; 0.05 M is close to the solubility of Brij-35 in water). Other measurements were carried out with seven hybrid mobile phases prepared with 0.01 M Brij-35 and acetonitrile in the range 0–50% v/v.

Four types of linear gradients were built: (i) gradients of Brij-35 in the absence of organic solvent, (ii) gradients of organic solvent keeping constant the concentration of Brij-35, (iii) simultaneous gradients of Brij-35 and acetonitrile, where the concentration of both components was increased, and (iv) simultaneous gradients of Brij-35 and acetonitrile, where acetonitrile was increased and Brij-35 decreased. Solvent A was always 0.01 M Brij-35, and solvent B was 0.05 M Brij-35 for gradient (i), 0.01 M Brij-35 and 50% acetonitrile for gradient (ii), 0.05 M Brij-35 and 50% acetonitrile for gradient (iii), and 50% acetonitrile for gradient (iv). Chromatograms for gradients of Brij-35 in the absence of organic solvent were obtained at 25 and 50°C.

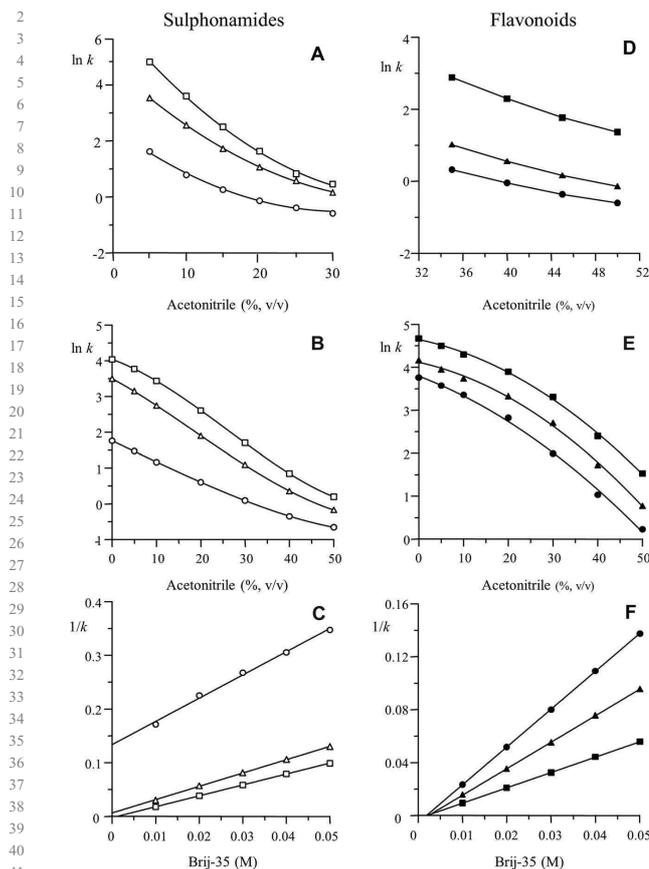


Figure 1. Retention plots describing the isocratic elution of the probe compounds: (A, D) aqueous-organic mixtures in the absence of Brij-35, (B, E) micellar mobile phases containing 0.01 M Brij-35 and acetonitrile, and (C, F) purely micellar mobile phases of Brij-35. Compounds: sulfamerazine (○), sulfisoxazole (△), sulfaquinoxaline (□), fisetin (●), quercetin (▲), and chrysin (■).

In all cases (isocratic and gradient elution), duplicate runs were carried out. The dead time in the presence of surfactant was measured from the first baseline disturbance, being $t_0 = 1.10 \pm 0.04$ min. The dwell time was 0.89 min.

3 Results and discussion

3.1 An overview of the capability of Brij-35 as modifier in MLC

Brij-35, as well as SDS, has an alkyl chain of 12 carbon atoms, but differ in the terminal groups. When Brij-35 is added to a mobile phase in RPLC, the surfactant alkyl chain is associated with the bonded alkyl chain on the stationary phase, modifying its properties. The polar hydrophilic head of the

Brij-35 molecule (the polyoxyethylene chain with the hydroxyl end group) is oriented away from the surface of the stationary phase. This increases the polarity of the stationary phase, which remains neutral. The hydroxyl end group in the polyoxyethylene glycol chain of Brij-35 can also interact with polar or moderately polar solutes by formation of hydrogen bonds with hydroxyl (and sometimes amino) groups, which would increase the retention. Brij-35 also forms large micelles in the mobile phase [35], which contain an apolar dodecyl core and a relatively polar outer region formed by the surfactant polyoxyethylene glycol chains, which provide hydrophobic and hydrophilic interaction sites, similar to those experienced by the solutes on the modified stationary phase.

Previous studies in our laboratory, together with reports published by other authors, have suggested that purely micellar mobile phases of Brij-35 may be suitable for the

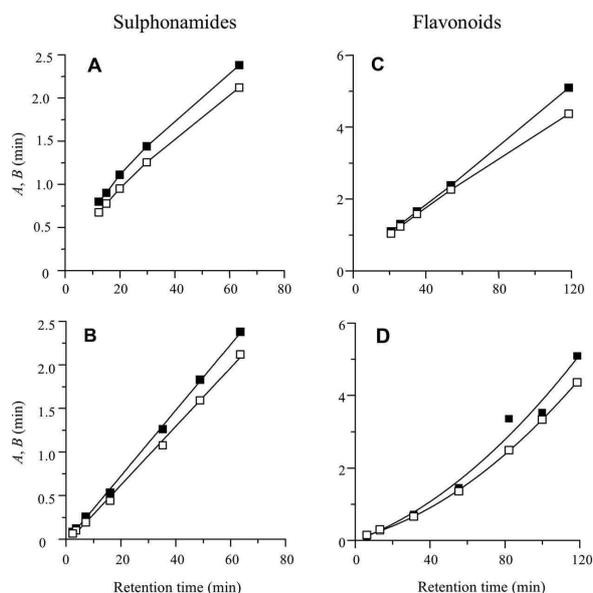


Figure 2. Peak half-width plots corresponding to the isocratic elution of sulfaquinoxaline (A, B) and chrysin (C, D), using different concentrations of Brij-35 without organic solvent (A, C), and different concentrations of acetonitrile in the presence of 0.01 M Brij-35 (B, D). The points correspond to: (A, C) 0.01 (highest retention), 0.02, 0.03, 0.04, and 0.05 M (lowest retention) Brij-35, and (B, D) 0 (highest retention), 5, 10, 20, 30, 40, and 50% v/v (lowest retention) acetonitrile. Left half-width (A, □), and right half-width (B, ■).

determination of compounds of intermediate or relatively low polarity, or for polar (even highly polar compounds) that interact with the hydroxyl end group in the surfactant by formation of hydrogen bonds, such as imipramine and nortriptyline [23], flavonoids [24], diazepam, and oxazepam [30], and hydroquinone and arbutin [36].

To study the capability of Brij-35 as modifier in MLC, three sets of probe compounds were selected, covering a relatively wide range of polarities and structures: three β -blockers, six sulfonamides, and three flavonoids (Section 2.1). The β -blockers (with a polarity range similar to the assayed flavonoids) showed the shortest retention: with aqueous 0.01 M Brij-35 at pH 3, pindolol eluted close to the dead time and the retention times for oxprenolol and propranolol were 2.7 and 11.8 min, respectively. The polarity of the β -blockers, and the formation of internal hydrogen bonds between the adjacent hydroxyl and amino groups in these compounds, do not allow a sufficiently strong interaction with the stationary phase modified with Brij-35. However, the most apolar β -blockers, such as oxprenolol and propranolol, may be analyzed using a purely micellar mobile phase of Brij-35 at low concentration (the retention times of these β -blockers significantly decreased with 0.02 M Brij-35).

As shown below, flavonoids, and to a lesser extent, sulfonamides (which are more polar), show larger retention than β -blockers in MLC with Brij-35, which can be explained by the formation of hydrogen bonds between the amino or hydroxyl groups in sulfonamides and flavonoids with the hydroxyl end

group of Brij-35. In previous work [24], the interaction of flavonoids with the stationary phase modified by Brij-35, and consequently the retention behavior, was explained by the number and position of the hydroxyl groups in the aromatic rings of flavonoids.

Since the retention of the sulfonamides and flavonoids was not excessively high, it was possible in both cases to elute the compounds with purely micellar mobile phases of Brij-35 at high concentration (Fig. 1C and F). However, hybrid mobile phases containing a low concentration of Brij-35 and acetonitrile, improved significantly the performance (narrower peaks and shorter analysis times). Mobile phases with added surfactant increase the viscosity; therefore, acetonitrile was found more convenient than methanol as modifier. Also, acetonitrile was found superior to ethanol and 1-propanol to enhance the peak profiles in MLC with SDS [37]. Next, the chromatographic behavior of the sets of sulfonamides and flavonoids studied in this work is described in detail, using isocratic and gradient elution.

3.2 Retention behavior in isocratic elution

In Fig. 1, the retention (expressed as the logarithm of the retention factor, $\ln k$) is depicted against the concentration of acetonitrile, φ , for some of the probe compounds studied in this work, eluted with mobile phases containing acetonitrile, in the absence (Fig. 1A and D) and presence of 0.01 M Brij-35

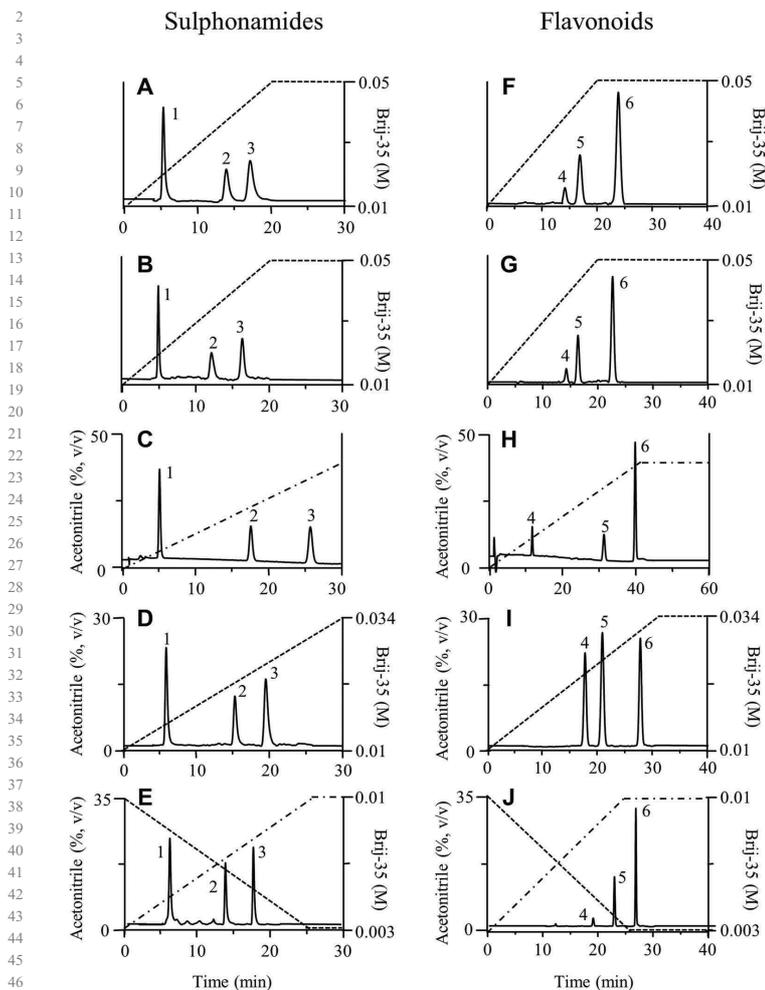


Figure 3. Chromatograms obtained for the probe compounds, applying different types of gradients (concentration range in the gradient, gradient time, and temperature are given). Gradients of Brij-35: (A, F) 0.01–0.05 M, $t_G = 20$ min, 25°C, and (B, G) 0.01–0.05 M, $t_G = 20$ min, 50°C. Gradients of acetonitrile or acetonitrile and Brij-35 (25°C): (C, H) 0–40% acetonitrile, $t_G = 40$ min at fixed Brij-35 (0.01 M), (D, I) simultaneous increase in acetonitrile (0–30%) and Brij-35 (0.01–0.034 M), $t_G = 30$ min, and (E, J) acetonitrile increase (0–35%) and Brij-35 decrease (0.01–0.003 M), $t_G = 25$ min. The gradient programs correspond to: acetonitrile (---) and Brij-35 (—). Compounds: (1) sulfamerazine, (2) sulfisoxazole, (3) sulfaquinoxaline, (4) fisetin, (5) quercetin, and (6) chrysin.

(Fig. 1B and E). In both cases, the lines in the plots can be described by the classical polynomial:

$$\ln k = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 \quad (1)$$

where c_0 , c_1 and c_2 are fitting parameters. It should be noted that the concave trend in aqueous-organic mobile phases (Fig. 1A and D) is significantly changed when Brij-35 is added to the mobile phase, resulting in sigmoidal (for sulfonamides, Fig. 1B), or convex (for flavonoids, Fig. 1E) plots. For both sets

of compounds, with the first additions of acetonitrile the elution strength in the presence of Brij-35 was relatively low (i.e. the slope of the curves was small), which could be explained at least partially by the stabilization of the organic solvent by the micelles in the mobile phase. With further additions of organic solvent, the elution strength was similar to that observed with aqueous-organic mixtures (at least for sulfonamides), due to the excess of organic solvent and micelle disruption. On the other hand, when comparing the chromatographic behaviors achieved with purely micellar mobile

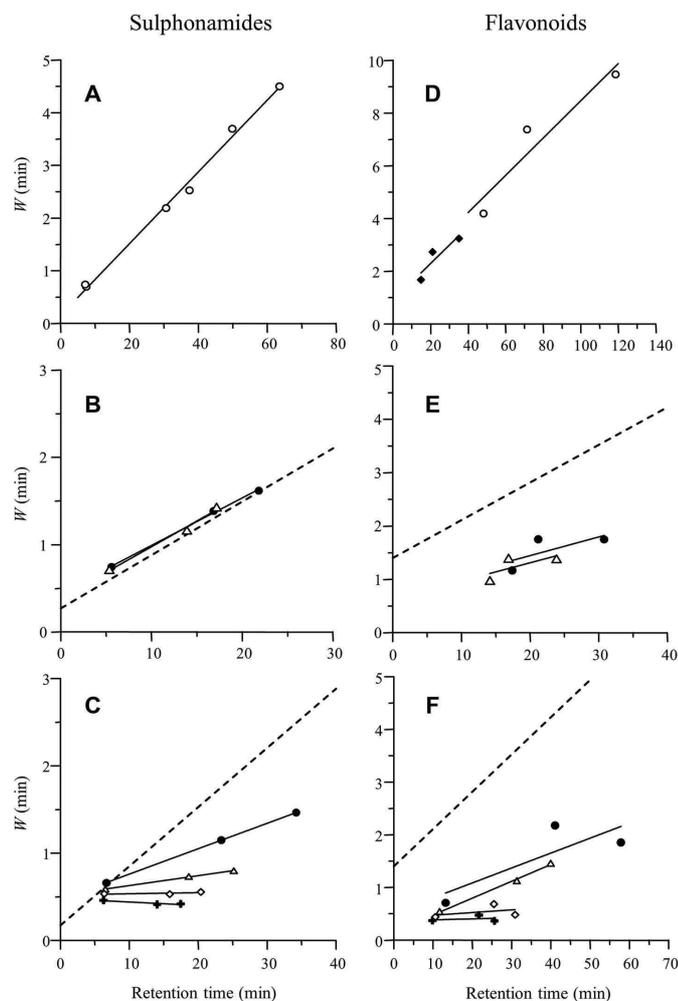


Figure 4. Peak width plots corresponding to different gradient programs (the gradient slope, m , is given) for: (A, D) isocratic elution ($m = 0$) with 0.01 M (\circ) and 0.03 M (\ast) Brij-35; (B, E) gradient of Brij-35 with $m = 0.001$ (\bullet) and 0.002 (Δ); and (C, F) gradient of acetonitrile with $m = 0.5$ (\bullet), 1.0 (Δ), 1.5 (\diamond), and 2.0 ($+$) at fixed Brij-35 (0.01 M). In (B, C, E, and F), the dashed line (—) represents the behavior in isocratic elution with 0.01 M Brij-35. Compounds: (A) sulfamerazine, sulfametazine, sulfisoxazole, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline, (B, C) sulfamerazine, sulfisoxazole, and sulfaquinoxaline, and (D–F) fisetin, quercetin, and chrysin.

phases of 0.01 M Brij-35 and aqueous-organic mixtures, it is observed that the former may yield shorter or longer retention times, depending on the interaction of solutes with the surfactant.

Meanwhile, in MLC, the retention at varying concentration of surfactant ($[M]$) is better described by the reversed retention factor, which yields a simple linear representation. Following the Cline-Love approach [8, 38]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}}{K_{AS}} [M] \quad (2)$$

Equation (2) provides information about the strength of the interactions between the solute and the stationary phase or mobile phase; K_{AS} and K_{AM} are the solute-stationary phase and solute-micelle association constants, respectively. Figure 1C and F correspond to the behavior observed in purely micellar mobile phases of Brij-35. It should be observed that the intercept of the straight-lines ($1/K_{AS}$ in Eq. (2)) for sulfaquinoxaline and sulfisoxazole (Fig. 1C, also for sulfadimethoxine, which is not shown), and for the three flavonoids (Fig. 1F) is close to zero. This indicates a strong interaction of these compounds with the surfactant monomers as

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

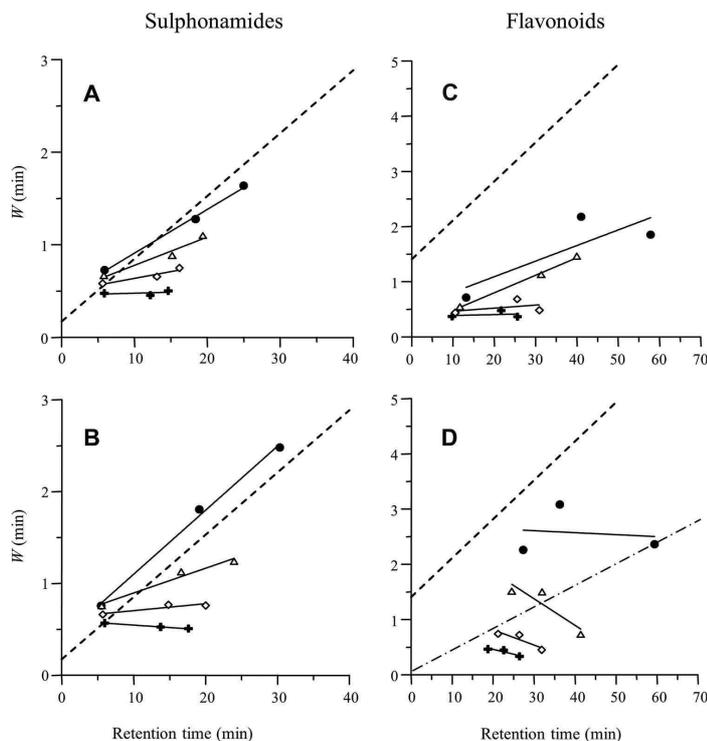


Figure 5. Peak width plots for: (A, C) gradients where Brij-35 and acetonitrile are simultaneously increased, and (B, D) gradients where acetonitrile is increased and Brij-35, decreased. Gradient slopes for acetonitrile (A–D): $m = 0.5$ (●), 1.0 (Δ), 1.5 (◇), and 2.0 (+). Gradient slopes for Brij-35: (A, C) $m = 4 \times 10^{-4}$ (●), 8×10^{-4} (Δ), 1.2×10^{-3} (◇), and 1.6×10^{-3} (+), and (B, D) $m = -1 \times 10^{-4}$ (●), -2×10^{-4} (Δ), -3×10^{-4} (◇), and -4×10^{-4} (+). The dashed line (–) represents the behavior in isocratic elution with 0.01 M Brij-35. In (D), the behavior in isocratic elution with an aqueous-organic mobile phase of 28% acetonitrile is also represented as (– · – ·). Compounds: (A, B) sulfamerazine, sulfisoxazole, and sulfaquinoxaline, and (C, D) fisetin, quercetin, and chrysin.

sociated to the stationary phase (i.e. a high value for K_{AS}). The interaction of the less retained sulfonamides (sulfamerazine, sulfamethazine and sulfamethoxazole, the two latter not shown) is much weaker. Sulfamerazine and sulfamethazine are more polar, and contain both a pyrimidin-2-yl ring.

Fitting the k versus $[M]$ data (and considering the mean molar mass of Brij-35) using nonlinear regression (which improves the fittings for the most retained compounds), the following association constants were obtained for sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfisoxazole, and sulfadimethoxine: $K_{AS} = 6.97 \pm 0.07$, 7.81 ± 0.27 , 80.4 ± 1.6 , 216 ± 18 , and 1165 ± 202 , and $K_{AM} = 25.7 \pm 0.7$, 35.7 ± 2.8 , 200.2 ± 5.2 , 553 ± 54 , and 2544 ± 455 , respectively (whose magnitude agrees with the elution order). The evaluation of the association constants for sulfaquinoxaline and the three flavonoids was, however, not possible due to the negative intercept in the $1/k$ versus $[M]$ plot, which must be interpreted by the direct transfer between the micelles and the modified stationary phase to which these compounds should be strongly associated [3].

3.3 Peak profiles in isocratic elution

The information obtained from chromatograms for different types of compounds has shown that the profile of chromatographic peaks can be described by simple models, based on the left (A) and right (B) peak half-widths, or the widths for symmetrical peaks [39]. The plots representing the peak half-widths versus the retention time, which have been called half-width plots, give direct information about the changes in the peak width and asymmetry of solutes eluted in a chromatographic column. The models are parabolic:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (3)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (4)$$

although, as will be seen, in sufficiently short ranges they may be approximated to straight lines.

Figure 2 depicts the half-width plots for sulfoquinoxaline and chrysin in isocratic elution, when either the concentrations of Brij-35 or acetonitrile are varied. The half-widths

were measured at 10% peak height to estimate better the asymmetry. Similar plots at smaller retention times were obtained for the other sulfonamides and flavonoids. In all cases, the plots show clear trends. For all compounds, the slope of the line that represents the right half-width (*B*) is only slightly larger, indicating that for the studied compounds the peaks were virtually symmetrical for all conditions in the experimental designs using Brij-35. The plots obtained for mobile phases with different concentrations of Brij-35 are convex for sulfonamides (Fig. 2A) and nearly straight lines for flavonoids (Fig. 2C). In contrast, the change in the acetonitrile contents linearizes the behavior for sulfonamides (Fig. 2B) and yields concave lines for flavonoids (Fig. 2D). The different shape of the plots for sulfonamides and flavonoids indicate the different kinetic behavior of both types of compounds with the chromatographic column modified with Brij-35. For flavonoids, the width decrease is larger for the first additions of surfactant and organic solvent (note that the retention is reduced at increasing concentration of both modifiers).

3.4 Gradient elution

Figure 3 shows some chromatograms obtained at different conditions using gradient elution with Brij-35 and acetonitrile, after baseline correction. The reduction in the peak width for sulfonamides and flavonoids in gradient elution, with regard to isocratic elution, is noteworthy especially for acetonitrile gradients, either keeping constant or decreasing the concentration of Brij-35 (Fig. 3C, E, H, and J). Also, when comparing the chromatograms obtained with gradients where the concentration of Brij-35 was increased, the peak width was smaller when the acetonitrile content was simultaneously increased (compare Fig. 3A, D, F, and I). At higher temperature the peaks were narrower, which should yield better resolution (compare Fig. 3A, B, F, and G, corresponding to chromatograms for sulfonamides and flavonoids at 25 and 50°C).

According to Jandera and Churáček [40], the peak width by applying gradient elution approximately agrees with the width of a peak in isocratic elution, if the solute were eluted using the gradient composition when its peak maximum reaches the column outlet. Therefore, Eqs. (3) and (4) are also valid to describe the peak profiles in gradient elution, if the instantaneous retention time at the column outlet were known. In Fig. 4, the widths obtained at different times are compared in isocratic and gradient elution, for the two sets of probe compounds.

The plots in Fig. 4A and D describe the isocratic elution for the six sulfonamides and three flavonoids, respectively, with a mobile phase containing only Brij-35. The lines represent a kind of simplified chromatograms. As observed, the behavior is perfectly linear for the sulfonamides, while the data for the flavonoids exhibit a significant dispersion. According to a previous study carried out in isocratic elution, this should be explained by differences in the kinetics of

interaction of each flavonoid with the stationary phase modified by Brij-35, which depends on the position of the hydroxyl substituents on the benzene rings of these compounds [24]. The almost perfect alignment of the data for the sulfonamides in Fig. 4A suggests that the interaction rate of the six compounds with the modified stationary phase is similar. On the other hand, the intercept of the lines in Fig. 4 is significantly different from zero (especially for flavonoids), indicating that the peaks have a significant width close to the dead time. With an aqueous-organic mobile phase, peaks eluting close to the dead time are much narrower (see lower dashed line in Fig. 5D, which virtually goes through the origin). This effect is also observed with SDS in MLC, but it is more remarkable with Brij-35.

To evaluate the effect of different gradients, the behavior obtained with the isocratic mobile phase of 0.01 M Brij-35 (Fig. 4A and D) has been also depicted as a dashed straight-line in the plots in Fig. 4B, C, E, and F, and Fig. 5 (in these figures, only the data for sulfamerazine, sulfisoxazole, and sulfaquinoxaline are shown, together with those for the three flavonoids). When the sulfonamides were eluted using a gradient of Brij-35 (Fig. 4B), the peak widths were similar (or slightly larger) than those obtained in isocratic elution with 0.01 M Brij-35, while for flavonoids (Fig. 4E) the peak widths decreased considerably.

On the other hand, by applying a gradient of acetonitrile (Fig. 4C and F), keeping constant the concentration of surfactant (0.01 M), the peak widths decreased significantly, and to a greater extent as the gradient slope increased. Similar behavior was obtained for the simultaneous gradients of Brij-35 and acetonitrile (Fig. 5). Again, sulfonamides yielded a perfect linear behavior, while significant data dispersion was observed for flavonoids. Note, finally, the large effect of the gradient slope on the peak profile of flavonoids with gradients decreasing Brij-35 and increasing acetonitrile (Fig. 5D).

4 Concluding remarks

This work had the global aim of exploring the capability of Brij-35 as modifier in MLC using both isocratic and gradient elution, with acetonitrile as organic solvent. To observe the behavior of a chromatographic system using mobile phases of Brij-35, in terms of retention and peak profiles, several plots were drawn for two families of compounds showing significant retention, and different polarity range and structure. Two interesting strategies are envisioned to be used in MLC with Brij-35: (i) the work with eluents containing exclusively Brij-35 in isocratic and gradient elution, which represents a kind of “green chromatography” (chromatography with water and detergent), which obviously is only interesting for compounds and mobile phases showing sufficiently short retention times, and (ii) the work with gradients of acetonitrile at fixed concentration of Brij-35. It should be noted that using SDS instead of Brij-35, only highly polar compounds can be eluted with purely micellar mobile phases at practical times [41]. The range of compounds that can be eluted

with purely micellar mobile phases is increased with Brij-35. In these conditions, the peak widths can be significantly reduced at high temperature, enhancing the chromatographic performance [24].

With regard to the second strategy (the use of gradients of acetonitrile, fixing the concentration of Brij-35), the most outstanding feature is the significant reduction in the peak width with increasing concentration of acetonitrile. The high efficiencies will guarantee high resolution, while the presence of Brij-35 offers particular selectivity and also affects the global retention. This strategy is especially interesting for the analysis of drugs in physiological fluids by direct injection of the sample. In this case, a purely micellar medium of Brij-35 can be used initially, and once the proteins are eluted from the sample, a gradient of acetonitrile would be applied to increase the elution strength, to achieve short retention times for all analytes [14,42,43]. This work has the aim to encourage other authors to develop new applications with the nonionic surfactant. The ability to model the observed behaviors can greatly facilitate the development of these methodologies.

This work was supported by Projects CTQ2013–42558-P (MINECO, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks MINECO for an FPI grant. E. Peris-García thanks the University of Valencia for a research grant.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Berthod, A., García-Alvarez-Coque, M. C., *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [2] Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., Berthod, A., *Sep. Purif. Rev.* 2000, 38, 45–96.
- [3] Borgerding, M. F., Quina, F. H., Hinze, W. L., Bowermaster, J., McNair, H. M., *Anal. Chem.* 1988, 60, 2520–2527.
- [4] Lavine, B. K., Hendayana, S., Tetreault, J., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3458–3465.
- [5] Caballero, R. D., Carda-Broch, S., García-Alvarez-Coque, M. C., *Anal. Lett.* 2001, 34, 1189–1203.
- [6] Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J. R., Simó-Alfonso, E. F., García-Alvarez-Coque, M. C., *Anal. Chim. Acta* 2002, 454, 109–123.
- [7] García-Alvarez-Coque, M. C., Carda-Broch, S., *J. Chromatogr. B* 1999, 736, 1–18.
- [8] García-Alvarez-Coque, M. C., Torres-Lapasió, J. R., Baeza-Baeza, J. J., *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 129–148.
- [9] Ruiz-Angel, M. J., Caballero, R. D., Simó-Alfonso, E., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2002, 947, 31–45.
- [10] Landy, J. S., Dorsey, J. G., *J. Chromatogr. Sci.* 1984, 22, 68–70.
- [11] Dorsey, J. G., Khaledi, M. G., Landy, J. S., Lin, J. L., *J. Chromatogr.* 1984, 316, 183–191.
- [12] Madamba-Tan, L. S., Strasters, J. K., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1994, 683, 321–334.
- [13] Madamba, L. S., Strasters, J. K., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1984, 683, 335–345.
- [14] Rodenas-Montano, J., Ortiz-Bolsico, C., Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2014, 1344, 31–41.
- [15] Borgerding, M. F., Hinze, W. L., *Anal. Chem.* 1985, 57, 2183–2190.
- [16] Borgerding, M. F., Hinze, W. L., Stafford, L. D., Fulp, G. W. Jr., Hamlin, W. C. Jr., *Anal. Chem.* 1989, 61, 1353–1358.
- [17] Cline-Love, L. J., Fett, J. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9, 323–333.
- [18] Marina, M. L., Jiménez, O., García, M. A., Vera, S., *Microchem. J.* 1996, 53, 215–224.
- [19] Menéndez-Fraga, P., Blanco-González, A., Sanz-Medel, A., Cannata-Andía, J. B., *Talanta* 1997, 45, 25–33.
- [20] Gil-Agustí, M., Alvarez-Rodríguez, L., Monferrer-Pons, L., Bose, D., Durgbanshi, A., Esteve-Romero, J., *Anal. Lett.* 2002, 35, 1721–1734.
- [21] Memon, N., Iqbal-Bhanger, M., Khuhawer, M. Y., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 635–638.
- [22] Berthod, A., Tomer, S., Dorsey, J. G., *Talanta* 2001, 55, 69–83.
- [23] Fernández-Navarro, J. J., Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 1303–1309.
- [24] Baeza-Baeza, J. J., Dávila, Y., Fernández-Navarro, J. J., García-Alvarez-Coque, M. C., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, 2973–2984.
- [25] Biemer, T. A., *J. Chromatogr.* 1987, 410, 206–210.
- [26] Hadjmohammadi, M. R., Ebrahimi, P., *Anal. Chim. Acta* 2004, 516, 141–148.
- [27] Ebrahimi, P., Hadjmohammadi, M. R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 851–858.
- [28] Sun, J., Mao, J., Liu, X., Wang, Y., Sun, Y., He, Z., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2043–2050.
- [29] Escuder-Gilabert, L., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., Medina-Hernández, M. J., *Anal. Chem.* 1998, 70, 28–34.
- [30] Molero-Monfort, M., Martín, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., Medina-Hernández, M. J., *J. Chromatogr. A* 2000, 870, 1–11.
- [31] Wang, S., Yang, G., Zhang, H., Liu, H., Li, Z., *J. Chromatogr. B* 2007, 846, 329–333.
- [32] Chen, Y., Wu, L. P., Chen, C., Ye, L. M., *Biomed. Chromatogr.* 2010, 24, 195–201.
- [33] Yin, C. R., Ma, L. Y., Huang, J. G., Xu, L., Shi, Z. G., *Anal. Chim. Acta* 2013, 804, 321–327.
- [34] Torres-Lapasió, J. R., *MICROM Software*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [35] Tóth, G., Madarász, A., *Langmuir* 2006, 22, 590–597.
- [36] Thogchai, W., Liawruangrath, B., *Int. J. Cosmetic Sci.* 2013, 35, 257–263.
- [37] Ruiz-Angel, M. J., Torres-Lapasió, J. R., Carda-Broch, S., García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 7090–7099.

2 [38] Arunyanart, M., Cline-Love, L. J., *Anal. Chem.* 1984, 56,
3 1557–1561.

4 [39] Baeza-Baeza, J. J., Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S.,
5 García-Alvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2013,
6 1374, 142–153.

7 [40] Jandera, P., Churáček, J., *J. Chromatogr.* 1974, 91, 223–
8 235.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

[41] Carda-Broch, S., Esteve-Romero, J. S., García-Alvarez-Coque, M. C. *Analyst* 1998, 123, 301–306.

[42] Nakao, R., Halldin, C., *J. Chromatogr. A* 2013, 1281, 54–59.

[43] Nakao, R., Schou, M., Halldin, C., *Anal. Chem.* 2012, 84, 3222–3230.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Gaining insight in the behaviour of imidazolium-based ionic liquids as additives in reversed-phase liquid chromatography for the analysis of basic compounds



M.T. Ubeda-Torres, C. Ortiz-Bolsico, M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel*

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2014

Received in revised form

27 November 2014

Accepted 20 December 2014

Available online 30 December 2014

Keywords:

Reversed-phase liquid chromatography

Ionic liquids

Silanol suppression

Retention

Peak shape

β-Blockers

ABSTRACT

In reversed-phase liquid chromatography in the absence of additives, cationic basic compounds give rise to broad and asymmetrical peaks as a result of ionic interactions with residual free silanols on silica-based stationary phases. Ionic liquids (ILs), added to the mobile phase, have been suggested as alternatives to amines to block the activity of silanols. However, the dual character of ILs should be considered: both cation and anion may be adsorbed on the stationary phase, thereby creating a double asymmetrical layer positively or negatively charged, depending on the relative adsorption of both ions. In this work, a study of the performance of six imidazolium-based ILs (the chlorides and tetrafluoroborates of 1-ethyl-, 1-butyl- and 1-hexyl-3-methylimidazolium) as modifiers of the chromatographic behaviour of a group of 10 β-blockers is performed, and compared with triethylamine and dimethyloctylamine. In order to gain more insight in the behaviour of ILs in RPLC, the changes in the nature of the chromatographic system, at increasing concentration of the additives, were followed based on retention and peak shape modelling. The multiple interactions that amines and ILs experience inside the chromatographic system suggest that the suppressing potency should be measured based on the shape of chromatographic peaks and not on the changes in retention. The ILs 1-hexyl-3-methyl-imidazolium chloride and tetrafluoroborate offered the most interesting features for the separation of the basic drugs.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ionic liquids (ILs) are salts composed by a bulky organic cation, such as alkyl-imidazolium, pyridinium, ammonium or phosphonium, and a variety of organic and inorganic anions [1–6]. In general, ILs are characterised by a low melting point, usually below 100 °C, and even below room temperature (~25 °C), so that they remain as liquids. Due to their particular nature, ILs can be outlined as salts or solvents. As solvents, they have a non-molecular nature with interesting features: mainly low volatility and flammability, high thermal stability, and an assumed low toxicity [4–10]. Due to these properties, ILs started to be known as “green” solvents, and although there are no conclusive studies [8–10], since the 90s these compounds have been considered as serious candidates to successfully replace pollutant organic solvents commonly used in the laboratories.

In reversed-phase liquid chromatography (RPLC), ILs have been found as alternative additives (i.e. salts) to amines to enhance the peak performance in the analysis of basic compounds, using conventional stationary phases [11–23]. Solute retention is based mainly on the hydrophobic interactions with the alkyl-bonded layer of the RPLC stationary phases, together with the solvating power of the organic solvent in the mobile phase. In the absence of additives, cationic compounds may experience additional ion-exchange interactions with residual anionic silanols on silica packings, which increase the retention. These interactions are also characterised by slow kinetics, which results in broad and asymmetrical peaks [24–28]. The interest in the study of the masking of the silanol effect by additives in RPLC is mainly explained by the fact that many compounds of pharmaceutical interest contain basic nitrogen groups in their structure, which is problematic for the development of satisfactory analytical methods.

The interaction mechanism of ILs with RPLC stationary phases is more complex compared to the behaviour of amines and the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) (which has also been observed to be a good silanol suppressor [29,30]), since both cation and anion in the IL interact with the stationary phases,

* Corresponding author. Tel.: +34 963543687.
E-mail address: mjrui@uv.es (M.J. Ruiz-Angel).

creating an asymmetrical bilayer, positively or negatively charged, depending on the relative adsorption of the cation and the anion [31,32]. In previous work [32,33], a comprehensive study of the silanol suppression effect of imidazolium-based ILs with long side chains was carried out based on modelling the changes of retention and peak shape using increasing amounts of the ILs in the mobile phase. The effect of ILs associated to tetrafluoroborate (BF_4^-) and hexafluorophosphate (PF_6^-) anions was compared to that achieved with triethylamine and SDS. Since the silanol suppression effect of imidazolium cations is dominant with respect to the associated anion, in this work we have extended the research to ILs associated to chloride (without affinity for the stationary phase), and compared the results with those obtained with two amines of different size (triethylamine and dimethyloctylamine), in order to gain more insight in the behaviour of ILs as silanol suppressors.

2. Experimental

2.1. Reagents

Ten β -blockers were used as probe compounds: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid, Spain), atenolol, carteolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol and timolol (all from Sigma, St. Louis, MO, USA). These compounds are basic ($\text{p}K_a = 9\text{--}10$) [34], which means that at the working pH of the mobile phase (~ 3) they are positively charged. Stock solutions of the drugs were prepared in a small amount of ethanol with the aid of an Elmas 15 h ultrasonic bath from Elmasonic (Singen, Germany), and diluted with water. The concentration of the stock solutions, which remained stable during at least two months at 4 °C, was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The concentration of the injected solutions was 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uracil (Acros Organics, Geel, Belgium) was used as dead time marker.

The mobile phases contained acetonitrile (Scharlab, Barcelona, Spain) and one of the following ILs: 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride (EMIM-Cl), 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIM-Cl), 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride (HMIM-Cl), 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (EMIM- BF_4), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIM- BF_4), 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (HMIM- BF_4), and 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (EMIM- PF_6) (all from Sigma). For comparison purposes, mobile phases containing triethylamine (TEA) or *N,N*-dimethyloctylamine (DMOA) (Sigma) were also prepared. In all cases, the mobile phases were buffered at pH 3 with 0.01 M sodium dihydrogen phosphate (Sigma) and HCl. The drug solutions and mobile phases were filtered through 0.45 μm Nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA, USA). Nanopure water (Barnstead, Sybron, Boston, MA) was used throughout.

Based on previous experience [32,33], a mobile phase containing a fixed concentration of acetonitrile (15%, v/v) was selected as reference. Triethylamine or the ILs EMIM-Cl, BMIM-Cl, HMIM-Cl, BMIM- BF_4 and HMIM- BF_4 were then added at the following concentrations: 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 M. EMIM- BF_4 was also added at the concentrations 0.005, 0.01, 0.02 and 0.03 M, DMOA at 0.00125, 0.0025, 0.005 and 0.01 M, and EMIM- PF_6 at 0.001, 0.01 and 0.02 M. The minimal and maximal concentrations of the additives in the mobile phase were selected to achieve enough retention for the most polar β -blockers, and not excessive retention for the most apolar ones.

2.2. Apparatus and columns

An Agilent chromatograph (Waldbronn, Germany), equipped with a quaternary pump (Series 1260), an autosampler (Series 1200), a thermostated column compartment (Series 1100) set at

25 °C, a diode array detector, and an HPChemStation (Agilent, B.02.01) for data acquisition, was used. The mathematical treatment was carried out with Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, USA). β -Blockers were monitored at 254 nm, except timolol which was detected at 300 nm.

The chromatographic column was a Kromasil C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with the following characteristics: 150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, 20% carbon load, 340 m^2/g surface area, and 100 Å pore size. The analytical column was connected to a similar 30 mm pre-column for protection. The flow-rate was 1 mL/min. Duplicate injections were made using 20 μL .

3. Results and discussion

Although there are a number of published reports on the improvement of the chromatographic separation of basic compounds using ILs, there are no still firm conclusions about which guidelines should be followed to choose the most suitable IL for a given analysis. When new ILs are proposed as additives in RPLC, or the most usual are applied to new compounds, the performance is rarely compared with the results obtained with other additives, or applying other solutions (e.g. specially designed stationary phases) [11–23]. Therefore, it is possible that among the different solutions the best is not chosen. Below, the effect of ILs containing the imidazolium cation on the retention and peak shape of a group of basic compounds, is studied.

In earlier work carried out in our laboratory, an extensive use has been made of several β -blockers as ideal probe compounds to assess the effect of different conditions on the behaviour of basic compounds. β -Blockers are drugs used for the treatment of various cardiac disorders, being a wide range of them commercialised. These compounds have a side alkyl chain possessing secondary hydroxyl and amine functional groups attached to at least one aromatic ring [34,35]. Their strong basic character and range of polarities, from high to intermediate, have been useful in the study of separation processes of basic compounds using C18 columns, including the effect of additives on the peak shape. In the studies presented here, a group of 10 β -blockers was used as probe compounds.

3.1. Effect of amines on the separation of β -blockers

Protonated amines, such as TEA and DMOA, have been traditionally used as additives in aqueous-organic mobile phases for the analysis of basic compounds. We first checked their effect on the chromatographic behaviour using the Kromasil C18 column. Fig. 1a and b depicts the retention factors of the set of β -blockers when eluted with mobile phases containing acetonitrile and TEA or DMOA, respectively. The plots show that the changes in retention at increasing concentration of TEA are rather small with no clear trend. Meanwhile, the addition of a relatively low amount of DMOA (in a narrow range of concentrations between 0.00125 and 0.01 M) produced a significant decrease in the retention of the β -blockers, especially below 0.002 M and for the most non-polar β -blockers (celiprolol and oxprenolol).

To our knowledge, there are no data in the literature about the adsorbed amount of TEA^+ and DMOA^+ on C18 stationary phases from acetonitrile–water mobile phases, but in a previous work [31], the adsorbed amount of imidazolium cations was found to increase with either the hydrophobicity of its alkyl-bonded chain or concentration in the mobile phase. It can be thus expected that the adsorbed amount of DMOA^+ on the stationary phase should be larger with respect to TEA^+ .

Horváth et al. reported, a mathematical model to evaluate the silanol suppressing potency of amines, based on the changes in

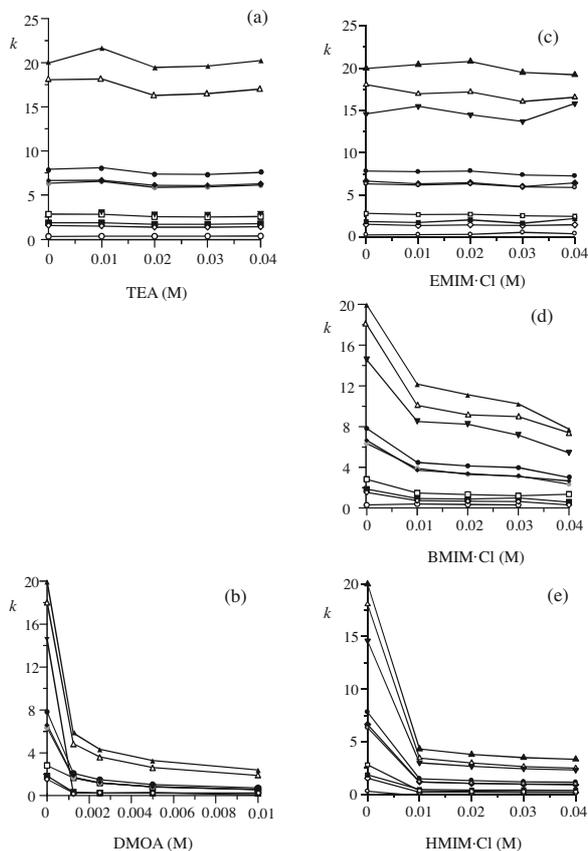


Fig. 1. Retention of β -blockers in aqueous mobile phases containing 15% acetonitrile and increasing concentrations of: (a) TEA, (b) DMOA, (c) EMIM-Cl, (d) BMIM-Cl, and (e) HMIM-Cl. Solutes: (\blacklozenge) acebutolol, (\circ) atenolol, (\diamond) carteolol, (Δ) celiprolol, (\blacktriangledown) esmolol, (\bullet) metoprolol, (\blacksquare) nadolol, (\blacktriangle) oxprenolol, (\square) pindolol, and (\odot) timolol.

retention of basic compounds when they are added to the mobile phase [36,37] (see also the Supplementary Material):

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2} \quad (1)$$

The binding constant K_A is intended to evaluate the ability of the additives to block the silanols and can be obtained by regressing $[A]/(k_0 - k)$ against $[A]$. However, the retention behaviour observed in mobile phases containing TEA (the retention was practically constant), did not allow evaluating the silanol suppressing potency (estimated as K_A) for this additive. In contrast, DMOA⁺ experienced a significant decrease in retention. Therefore, in principle, its suppressing potency could be evaluated using Eq. (1). The K_A values obtained for each β -blocker and the global mean value are listed in Table 1.

In previous work, we observed a different behaviour for TEA using a set of β -blockers and an unendcapped Spherisorb ODS-2 column, for which the accessibility of basic solutes to the silanols is easier [38]. Using that column, the retention decreased

Table 1
Suppressing potency of free silanols (K_A) for basic compounds in the presence of DMOA and imidazolium ILS.

	DMOA	BMIM-Cl	HMIM-Cl	BMIM-BF ₄	HMIM-BF ₄
Acebutolol	2645	147	1840	304	288
Atenolol	3461	–	–	–	–
Carteolol	1912	523	2455	125	667
Celiprolol	2990	171	1045	75	220
Esmolol	2287	239	1143	56	225
Metoprolol	2722	114	1475	61	276
Nadolol	–	120	–	66	500
Oxprenolol	2745	85	1176	42	226
Pindolol	4714	–	1919	–	–
Timolol	2388	86	1841	28	250
Mean	2875 ± 820	185 ± 145	1610 ± 485	95 ± 90	330 ± 165

systematically with an increasing concentration of TEA. Also, in previous work with an old Kromasil C18 column, the retention decreased moderately by an initial addition of TEA (below 0.01 M), getting almost constant retention for further additions [32].

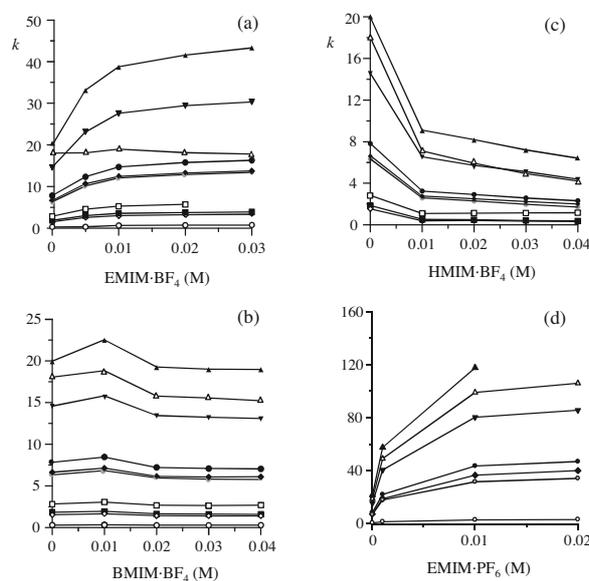


Fig. 2. Retention of β -blockers with aqueous mobile phases containing 15% acetonitrile and increasing concentrations of: (a) EMIM- BF_4 , (b) BMIM- BF_4 , (c) HMIM- BF_4 , and (d) EMIM- PF_6 . Compound identity is given in Fig. 1.

3.2. Effect of imidazolium ionic liquids on the separation of β -blockers

3.2.1. Effect of the cation

ILs are considered as interesting alternatives to amines in RPLC. However, these reagents are frequently selected without taking into account that the associated anion can be moderately or strongly adsorbed on the stationary phase, affecting the chromatographic behaviour. Also, the anion can interact with the solutes in the mobile phase through ion-pairing. Therefore, the observed retention behaviour should be attributed to the combined effect of cation and anion. Only with non-adsorbed anions, the behaviour should be similar to that of bulky amines, such as TEA^+ and DMOA^+ . To check this, three imidazolium-based ILs with chloride as anion and alkyl chains of increasing hydrophobicity (EMIM $^+$, BMIM $^+$ and HMIM $^+$), were studied. In aqueous solution, chloride is strongly hydrated and has low affinity for the stationary phase. With a conventional Kromasil C18 column, and using a mobile phase containing 30% acetonitrile and 0.05 M NaCl, the adsorbed amount of chloride has been estimated to be below $2.5 \mu\text{mol}$ [31]. This indicates that this anion is not (or only scarcely) involved in the chromatographic separation. The effect of the imidazolium cation is thus isolated.

The chromatographic behaviour of the set of β -blockers with mobile phases containing the three ILs (EMIM-Cl, BMIM-Cl and HMIM-Cl) is shown in Fig. 1c–e. The retention upon addition of the ILs is compared against a similar aqueous-organic mobile phase in the absence of additive. As observed, the larger effect was observed for the imidazolium cations with a longer side chain (i.e. larger size). The changes were minimal for EMIM-Cl.

The separation environment with the ILs seems similar to that found by addition of TEA and DMOA (compare Fig. 1a and c, on the

one hand, and Fig. 1b and e, on the other), which may be the result of a combination of interactions:

- (1) The neutralisation of the anionic free silanols by the ammonium or imidazolium cations, which hinders the electrostatic attraction of the cationic basic solutes to the silanols,
- (2) the association of the additive cations to the alkyl-bonded stationary phase, which gets positive charge that repels the cationic solutes,
- (3) the repulsion of the cationic solutes from the mobile phase by the excess of additive cation.

Interactions (i) and (ii) appear to be primarily responsible of the observed behaviour, since the retention decreases. Meanwhile, interaction (iii) should cooperate to the changes in retention through a counteracting effect (an increased retention), which reduces the effect of interactions (i) and (ii). This can explain the behaviour of TEA and EMIM-Cl, for which the retention of the basic probe compounds scarcely changes.

As commented, Eq. (1) was developed for amines to estimate the suppressing potency, K_A . More recently, it has been also used to determine K_A for different ILs containing an anion with significant adsorption [32,33,39]. We applied this equation to BMIM-Cl and HMIM-Cl, but it was not possible to calculate K_A for EMIM-Cl (with the smallest cation), due to the small or null changes in retention. The estimated K_A values are listed in Table 1. It may be observed that the highest values for this constant corresponded to DMOA, followed by HMIM-Cl.

These results show that the reduction of retention with respect to the mobile phases in the absence of additive depends on the size of the cation in the additive, rather than on its nature, against to what was traditionally thought [36,37]. It is also thought that

Table 2

Half-width plots parameters: slopes for the left and right half-width plot (m_A and m_B), sum of slopes (characterising the peak broadening rate at increasing retention times) and slopes ratio (indicating the peak asymmetry at high retention times).

Additive	m_A	m_B	$m_A + m_B$	m_B/m_A
No additive	0.013	0.038	0.051	2.9
TEA	0.019	0.023	0.041	1.2
DMOA	0.028	0.028	0.056	1.0
EMIM-Cl	0.017	0.023	0.041	1.3
BMIM-Cl	0.019	0.019	0.039	1.0
HMIM-Cl	0.020	0.016	0.036	0.8
EMIM-BF ₄	0.018	0.022	0.040	1.2
BMIM-BF ₄	0.020	0.022	0.042	1.1
HMIM-BF ₄	0.022	0.017	0.039	0.8

sufficiently small additives can partition into the alkyl-bonded chains in the stationary phase [40,41], and thus access directly to the silanols to establish an electrostatic attraction (which is the assumption giving rise to Eq. (1)). In contrast, bulkier additives prevent the access of cationic solutes to residual silanols by adsorption on the stationary phase (i.e. coating it). This effect has been thoroughly studied for the anionic surfactant SDS [42]. The latter mechanism should be more effective for larger size cations. It seems also be stronger, based on the observed larger reduction of retention. Therefore, Eq. (1) should be used with caution, since it is not only measuring the direct interaction (i.e. neutralisation) with silanols, but also the intense repulsion between the adsorbed cation of the additive on the stationary phase and the cationic basic compounds.

3.2.2. Effect of an anion with affinity for the stationary phase

The chromatographic behaviour of the set of β -blockers in the presence of the imidazolium cations EMIM⁺, HMIM⁺ and BMIM⁺ was next checked when these are associated to BF₄⁻, which is an anion with a significant affinity for the stationary phase. Specifically, BF₄⁻ exhibits moderate adsorption on a Kromasil C18 column (15 μ mol are adsorbed using a mobile phase with 30% acetonitrile and 0.05 M NaBF₄) [31]. The adsorbed anion should affect the retention, especially by attraction of the cationic solutes to the stationary phase. In previous work, the capability of BMIM-BF₄ and HMIM-BF₄ to elute β -blockers was investigated compared to ILs containing the same imidazolium cations and an anion showing high affinity for the alkyl-bonded phase (PF₆⁻) [22,32,33]. This work complements those studies. Also, EMIM-BF₄ has been included in this research.

The change in the retention of the β -blockers at increasing concentration of the imidazolium tetrafluoroborates is depicted in Fig. 2a–c. In the concentration range examined in this work, only with HMIM-BF₄ the retention of the basic compounds followed the expected behaviour (considering any of the interactions (i) and (ii) described in Section 3.2.1): decreased retention with increasing concentration of the IL in the mobile phase. Therefore, the interaction of this imidazolium cation with the stationary phase prevailed over the repulsive effect of BF₄⁻ associated to the alkyl-bonded chains, thereby creating a separation environment not unlike that observed with DMOA, BMIM-Cl and HMIM-Cl. Interestingly, the retention behaviour with BMIM-BF₄ was similar to that obtained with TEA.

The EMIM-BF₄ reagent showed significant UV absorption at the working wavelength, hindering the use of concentrations ≥ 0.04 M. For this reason, the concentration range for this IL was only studied between 0.005 and 0.03 M. It is remarkable that the behaviour with this IL was different from that observed with BMIM-BF₄ and HMIM-BF₄: the retention of the β -blockers increased with respect to the aqueous-organic mobile phase in the absence of additive, to further decrease the increasing rate (and probably, finally decreasing the retention). Therefore, in the presence of

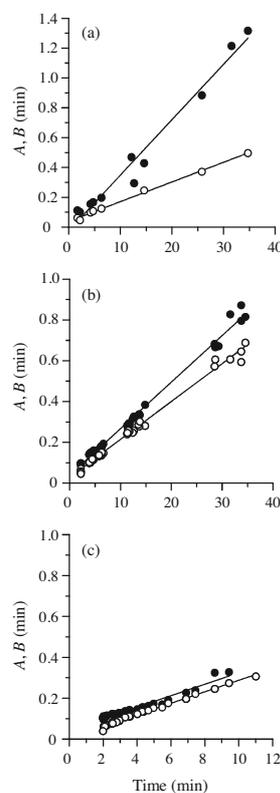


Fig. 3. Half-width plots (A) (○) and (B) (●), including all data obtained with the probe compounds, eluted with the full set of mobile phases in the experimental designs. The concentration of acetonitrile was 15% in all runs. Additives: (a) none, (b) TEA, and (c) DMOA.

EMIM-BF₄, the retention mechanism depends on its concentration in the mobile phase. Seemingly, initially, the interaction of the cationic compounds with the amount of BF₄⁻ adsorbed on the stationary phase appears to be more important than the interaction with EMIM⁺. After reaching a maximum, the repulsion from the positively charged stationary phase by adsorption of EMIM⁺ (or ion-pairing with the anion dissolved in the mobile phase) would decrease the retention.

A similar (but stronger) behaviour was observed with the set of β -blockers eluted with imidazolium cations associated to PF₆⁻ [32]. This is shown in Fig. 2d for EMIM-PF₆. The high affinity of this anion for the stationary phase has been identified as the main responsible of the observed behaviour. Since the retention of β -blockers was higher with respect to the absence of the IL ($k > k_0$), over a wide range of practical concentrations, it was unfeasible to estimate K_A by means of Eq. (1) for EMIM-BF₄ and EMIM-PF₆. The study of these additives shows clearly that the so-called suppressing potency is not measuring solely the neutralisation of the residual silanols. The changes in retention respond to several interactions, which may be more or less related to the efficient protection of silanols.

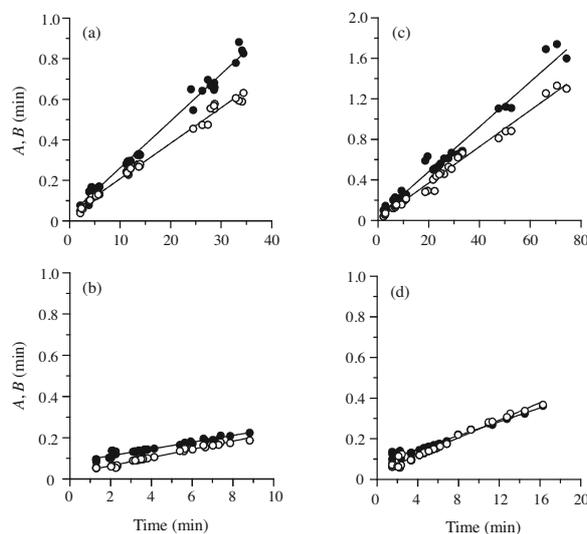


Fig. 4. Half-width plots. Additives: (a) EMIM-Cl, (b) HMIM-Cl, (c) EMIM-BF₄, and (d) HMIM-BF₄. See Fig. 3 for details.

Table 1 shows the estimated values for K_A in the presence of BMIM-BF₄ and HMIM-BF₄, which similarly to the ILs chlorides, are larger for HMIM⁺. Moreover, the comparison of these values with those obtained for chlorides shows BMIM⁺ and HMIM⁺ are more effective in reducing the retention when they are associated to chloride, due to the very low affinity of the anion for the stationary phase.

3.3. Peak shape in the presence of cationic additives

We should here remind that the slow interaction kinetics of cationic analytes with residual free silanols has been given as the reason of the observed broad and asymmetrical peaks. Decreasing the accessibility of the cationic solutes to the silanols yields well-shaped peaks. The study in this section shows the effect on the peak shape produced by the different additives examined in this work. The study is carried out based on the same experiences discussed in the previous section, and is assisted by the so-called half-width plots.

The graphical representation of the left (A) and right (B) half-widths (measured at 10% peak height), versus the retention time, is the best way to obtain an overview of the changes that occur in the width and asymmetry of chromatographic peaks obtained with a given column. Measurement at 10% peak height allows the characterisation of the asymmetry without being affected by the baseline noise of chromatograms. The validity of these plots to compare the behaviour of different families of compounds, with different types of columns and mobile phases of different nature, has been demonstrated in previous work [29,30,32,33]. The construction of half-width plots is very simple, being represented by the following equations:

$$A = m_A t_R + A_0 \quad (2)$$

$$B = m_B t_R + B_0 \quad (3)$$

where m_A and m_B are the slopes of the linear correlations for the left and right half-widths, respectively, and A_0 and B_0 the corresponding intercepts representing the extra-column contribution to the peak broadening. Eqs. (2) and (3) allow for the prediction of the half-widths for the peaks of compounds eluted at different retention times. The sum of m_A and m_B represents the broadening rate of chromatographic peaks inside the column, and its ratio (m_B/m_A) indicates the peak asymmetry at high retention times. The study of the effect of the cationic additives on the peak shape was performed based on the construction of global plots, including information from all probe compounds and all mobile phases prepared for each additive at varying concentration.

Fig. 3a depicts the half-widths plots obtained for the mobile phase in the absence of additive (15% acetonitrile). The global plots for mobile phases containing the studied amines and ILs are shown in Figs. 3 and 4, respectively (see also Fig. S1 in the Supplementary Material). Although the points on the plots show certain scattering, the established correlations allow clear conclusions. In the absence of additive (Fig. 3a), the slope of the right half-width (B) is significantly larger than for the left half-width (A), which indicates the formation of tailing peaks, due to the slow interaction equilibrium between solutes and silanols in the stationary phase. When any of the studied additives was added, the angle between the straight-lines for both half-widths became smaller (i.e. the peaks reduced significantly their asymmetry), especially for DMOA (Fig. 3c), BMIM-Cl (Fig. S1a), HMIM-Cl (Fig. 4b), BMIM-BF₄ (Fig. S1b), and HMIM-BF₄ (Fig. 4d). This suggests that all studied additives efficiently hinder the access of the β -blockers to the silanols on the column (even for TEA, EMIM-Cl, EMIM-BF₄ and BMIM-BF₄, for which the retention of the probe compounds did not decrease, at least significantly).

The parameters extracted from the half-width plots are shown in Table 2. As observed, BMIM-Cl, HMIM-Cl and HMIM-BF₄ produced smaller broadening. Meanwhile, mobile phases with DMOA and BMIM-Cl resulted in more symmetrical peaks (i.e. the slopes ratio is

very close to unity). In contrast, the peaks were more asymmetrical for the smaller cationic additives (TEA and EMIM⁺).

4. Conclusions

This work studies the behaviour of different types of ILs, associated to anions with diverse affinity for the stationary phase, and compares it with the behaviour of the amines TEA and DMOA. All these cationic additives are capable of blocking the activity of free silanols on silica-based chromatographic columns, as demonstrated by the improved peak shape. In the literature, an extensive research can be found on the use of such additives to improve the separation of basic compounds. However, there were certain aspects not sufficiently explored. This work complements previous studies on the role of the cation and anion in ILs to suppress the silanol activity, trying to gain more insight on the mechanisms of retention.

It is evident that the protection mechanism of ILs and amines is greatly influenced by the size of the cation in the additive. The larger the cation, the more intense seems the protection of the silanol effect (i.e. better peak shape). For the best additives, the intensity of the effect is similar to that observed for the anionic surfactant SDS [29,30], which does not interact directly with silanols by electrostatic attraction, but block their activity by coating the surface of the stationary phase, forming a double layer. The establishment of different ways of interaction of the ILs with the stationary phase, besides the direct neutralisation of silanols, including the repulsion and attraction of the cationic basic compounds with the cation and anion of the additive, respectively, indicates that the retention behaviour does not offer a good indication of the suppressing potency (represented as K_A in Eq. (1)). This also holds for additives where the associated anion is only weakly adsorbed on the column, or for additives of relatively small size as TEA⁺ and EMIM⁺: the changes in retention do not reveal specifically the suppression of the silanol effect.

It should be noted that K_A is obtained from the retention data of individual solutes. If it is measuring the strength of the interactions between the cation in the additive and the silanols, we would obtain a similar value for all solutes associated to the stationary phase. However, a certain scattering is observed in the K_A values for different β -blockers, which can be explained by the particular contributions of each basic compound to the retention (besides the different accuracy in the measurement of the retention times). What is then measuring K_A ? We can only say that it is a parameter related with the capability of the additive to reduce the retention of the cationic solutes.

Therefore, the suppression of the silanol potency should be evaluated through peak shape parameters, such as the peak broadening rate and the peak asymmetry. Among the silanol suppressors studied in this work, those of smaller size (TEA, EMIM-Cl and EMIM-BF₄) appear to be less effective, whereas those of larger size that should associate stronger with the alkyl-bonded chains improve significantly the peak shape, when compared with aqueous-organic mobile phases in the absence of additive. HMIM-Cl and HMIM-BF₄ have the most interesting features for the separation of basic compounds: small broadening rate of the chromatographic peaks, combined with smaller retention.

Although this work was focused on ILs, it also shows interesting results for amines. It was observed that DMOA is an effective silanol suppressor: although the peak widths of analytes are somewhat larger with respect to those obtained with HMIM-Cl and HMIM-BF₄, the peaks are highly symmetrical. A similar behaviour was found in previous work with SDS [29,30,32]. In our opinion, the chromatographic behaviour of basic compounds in the presence of amines deserves a more extensive study, using the tools presented in this

work. Also, the real implication of the effects on retention and peak shape on the resolution should be further examined.

Acknowledgements

This work was supported by Project CTQ2013-42558-P (Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks FPI Grant BES-2011-049904 from MINECO.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.064>.

References

- [1] J. Liu, J.A. Jönsson, G. Jiang, Application of ionic liquids in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20–27.
- [2] M.P. Marszał, R. Kalisz, Application of ionic liquids in liquid chromatography, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 37 (2007) 127–140.
- [3] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, Ionic liquids in separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6–18.
- [4] Z. Tan, J. Liu, L. Pang, Advances in analytical chemistry using the unique properties of ionic liquids, *Trends Anal. Chem.* 39 (2013) 218–227.
- [5] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives, *Anal. Chem.* 86 (2014) 262–285.
- [6] C.F. Poole, Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 49–82.
- [7] T. Welton, Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071–2084.
- [8] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, Toxicity of ionic liquids, *Clean* 35 (2007) 42–48.
- [9] G. Cevasco, C. Chiappe, Are ionic liquids a proper solution to current environmental challenges? *Green Chem.* 16 (2014) 2375–2385.
- [10] M.A. Abraham, L. Moens (Eds.), *Clean Solvents: Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*, ACS Symposium Series 819, American Chemical Society, Washington, DC, 2002.
- [11] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrines by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39–45.
- [12] W. Zhang, L. He, Y.L. Gu, X. Liu, S. Jiang, Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 36 (2003) 827–838.
- [13] X. Xiao, L. Zhao, L. Xia, S. Jiang, Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography. Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 207–211.
- [14] R. Kalisz, M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263–271.
- [15] M.P. Marszał, T. Baczek, R. Kalisz, Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172–178.
- [16] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod, Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202–208.
- [17] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, Ionic liquids as mobile phase additives for the high-performance liquid chromatographic analysis of fluoroquinolone antibiotics in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1439–1446.
- [18] A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, Ionic liquids as desorption solvents and memory effect suppressors in heterocyclic aromatic amines determination by SPME-HPLC fluorescence, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 937–946.
- [19] A. Martín-Calero, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods, *Talanta* 79 (2009) 590–597.
- [20] A. Martín-Calero, G. Tejral, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, Suitability of ionic liquids as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV detection for the determination of heterocyclic aromatic amines, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 182–190.
- [21] A. Petruczynik, Effect of ionic liquid additives to mobile phase on separation and system efficiency for HPLC of selected alkaloids on different stationary phases, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 287–293.
- [22] J.J. Fernández-Navarro, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, 1-Hexyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate: an efficient

- column enhancer for the separation of basic drugs by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 168–174.
- [23] Y. Tang, A. Sun, R. Liu, Y. Zhang, Simultaneous determination of fangchinoline and tetrandrine in *Stephania tetrandra* S. Moore by using 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the RP-HPLC mobile phase additives, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 148–154.
- [24] J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29–71.
- [25] M. Reta, P.W. Carr, Comparative study of divalent metals and amines as silanol-blocking agents in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121–127.
- [26] U.D. Neue, K. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, The combined effect of silanols and the reversed-phase ligand on the retention of positively charged analytes, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 35–45.
- [27] H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, Reversed phase chromatography: the mystery of surface silanols, *Chromatographia* 62 (2005) 519–529.
- [28] D.V. McCalley, The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858–880.
- [29] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786–1798.
- [30] M.J. Ruiz-Angel, S. Pous-Torres, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, Performance of different C18 columns in reversed-phase liquid chromatography with hydro-organic and micellar-organic mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1344 (2014) 76–82.
- [31] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Huguet, Nonmolecular solvents in separation methods: dual nature of room temperature ionic liquids, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071–4080.
- [32] J.J. Fernández-Navarro, M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 398–407.
- [33] J.J. Fernández-Navarro, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C18 stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 166–175.
- [34] C.J. Drayton (Ed.), *Comprehensive Medicine Chemistry*, vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [35] R. Mehvar, D.R. Brocks, Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2001) 185–200.
- [36] A. Nahum, C. Horváth, Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53–63.
- [37] K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 65–84.
- [38] M.J. Ruiz-Angel, J.R. Torres-Lapasió, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, Improvement of peak shape and separation performance of β -blockers in conventional reversed-phase columns using solvent modifiers, *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 350–358.
- [39] M.P. Marszał, T. Baczek, R. Kaliszan, Evaluation of the silanol-suppressing potency of ionic liquids, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138–1145.
- [40] A. Vailaya, C. Horváth, Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 1–27.
- [41] A. Soliven, S. Kayillo, R.A. Shalliker, *Reversed phase liquid chromatography*, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [42] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, Chromatographic efficiency in micellar liquid chromatography: should it be still a topic of concern? *Sep. Purif. Rev.* 42 (2013) 1–27.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Comparison of two serially coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures[☆]

C. Ortiz-Bolsico*, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2012
 Received in revised form 10 January 2013
 Accepted 11 January 2013
 Available online 22 January 2013

Keywords:

Isocratic liquid chromatography
 Stationary phase optimization
 Serially coupled columns
 Column couplers
 Peak shape prediction
 Sulphonamides

ABSTRACT

Although there is a great deal of stationary phases having different selectivities (even practically orthogonal selectivities), these very rarely are taken as a factor to be optimized during method development. The chromatographer selects the stationary phase usually in a trial-and-error fashion (or based on the solute nature and expected interactions), and then optimizes continuous factors as the mobile phase composition, pH, temperature and flow-rate. However, the optimization of the stationary phase nature and column length (which are discrete factors) may be interesting. In this regard, the optimization of the coupling of individual columns may yield separations that are not possible with a single column, based on the combined selectivities and the potential increase in plate count. The idea is highly attractive, but there are only few reports in the literature using this approach. The theory behind the use of serially coupled columns is indeed rather simple, but its implementation may be troublesome. The most problematic factor is the connection of the serial columns, which ideally should not modify the result of the sum of behaviors of the columns. A proper serial connection of columns needs a zero-dead volume (ZDV) union and a system to link tightly the columns to each other. In this work, two different approaches to solve this problem are compared using isocratic elution, one consisting in the use of holders, which are screwed to maintain attached the columns linked by ZDV junctions, and the other using ZDV fingertight column couplers, which are screwed directly to the columns maintaining them tightly attached without the need of column holders. The advantages and problems associated to these approaches are described, and information on the accuracy in the prediction of retention times, peak widths and asymmetries are given for the combined columns. Guidelines to prepare software to make reliable predictions are also presented. A set of 15 sulphonamides were used to probe the systems.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since its first use in the mid-1970s, high-performance liquid chromatography (HPLC) has become the premier separation technique in most analytical laboratories. This is mainly due to its versatility, ease of use, compatibility with the sample, and the selectivity and resolving power of the chromatographic process. The chromatographic separation power of HPLC is dependent upon the selectivity of the stationary phase/mobile phase system and the efficiency of the HPLC column.

In order to get an adequate resolution, the usual practice is to select, in a trial-and-error fashion (or based on the solute nature and expected interactions), first the stationary phase nature and

column length (which are discrete factors), and then optimize the mobile phase factors as the concentration of organic modifier, pH, temperature and flow rate (which are continuous factors) [1–5]. The idea of optimizing the stationary phase nature has been also suggested. In this regard, the combination of different compatible mechanisms (i.e. stationary phases) is particularly interesting. The idea of using several stationary phases in a given separation can be implemented by chemically bonding different stationary phases on the same particles (chemically mixed supports), or by filling a single column with particles of different nature in different amounts (physically mixed supports) [6–9]. However, serially coupled columns, each of them with a specific stationary phase and length, can also be used [7,10–12]. Solute retention in chemically or physically mixed supports may not be easily predicted as a linear function of the stationary phase composition, due to the interaction between the different stationary phases. In contrast, the physical separation in serially coupled columns of different lengths makes the solute retention additive and, therefore, easily predictable [7,10].

[☆] Presented at the XII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Tarragona, Spain, November 14–16, 2012.

* Corresponding author. Tel.: +34 615409560.

E-mail address: cassandra.ortiz@uv.es (C. Ortiz-Bolsico).

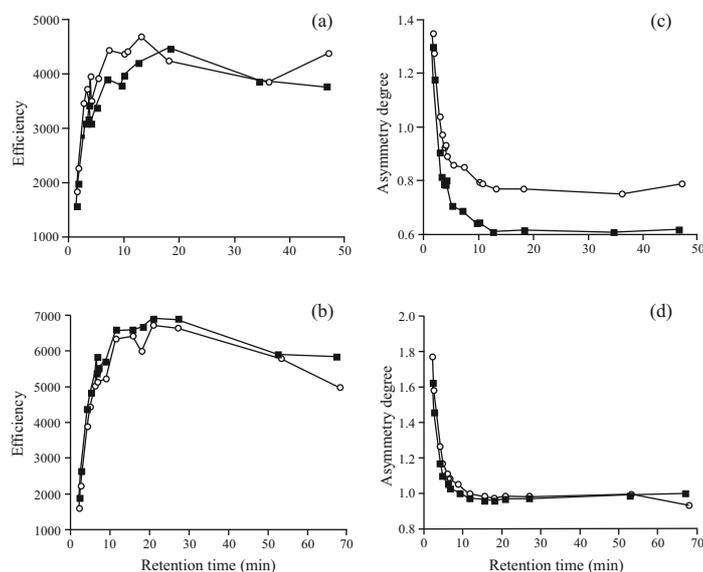


Fig. 1. Influence of the column order on the peak efficiency (calculated according to Foley and Dorsey [33]), and peak asymmetry (measured as the asymmetry degree, B/A , where A and B were measured at 10% peak height). (a and c) POPLink combinations: (■) C18-SH2 (40 mm)+C18-EPS (40 mm)+Cyano (40 mm), and (○) Cyano (40 mm)+C18-EPS (40 mm)+C18-SH2 (40 mm); and (b and d) ACE combinations: (■) ACE C18 (20 mm)+ACE Phenyl (50 mm)+ACE CN (35 mm), and (○) ACE CN (35 mm)+ACE Phenyl (50 mm)+ACE C18 (20 mm). Mobile phase: 10% (v/v) acetonitrile.

There are two reasons for using serially coupled columns with respect to the use of single columns: (i) the combination of the selectivity of individual columns with specific stationary phases improves the separation expectancies with regard to the separation yielded by each column and (ii) the increase in plate count increases the separation power. The idea is highly attractive and has a great potential. Therefore, the reduced number of reports in the literature using this approach results surprising [10–19], taking into account the great deal of commercialized stationary phases with different selectivity that can be combined. The reason can be that, in spite the theory behind the use of this type of multi-column systems is relatively simple, the direct coupling of HPLC columns without loss of efficiency has been a challenge. However, the advances in the development of the so-called zero-dead volume (ZDV) connectors, over the last decade, have opened new possibilities.

Although there were previous reports on the use of serially coupled columns, as those by Issaq and Gutierrez [7], and Lukulay and McGuffin [10] (the latter including an approach to optimize the column length and mobile phase composition for multi-column systems), the novel column system developed as a patent in 2005 [11,20] (commercialized by Bischoff Chromatography as a promising tool for optimizing a separation) has recently attracted some attention. The developers of the patent proposed the connection of stainless steel cartridge segments of different lengths, filled with stationary phases of different nature. The connections are made through ZDV junctions and the cartridge segments are inserted into polyether ether ketone (PEEK) holders to maintain them tightly pressed to each other. The column assembly system was commercialized with the trade name "POPLink columns" (the acronym POP comes from "phase optimization"). In order to make the system more accessible to users, the authors provided the "POPLink

Optimizer Software" that selects the optimal combination of nature and length of the column segments, for pre-selected mobile phase composition and operating conditions [13,20,21]. The software uses the PRISMA model, previously developed for solvent optimization [22,23], based on the Snyder's solvent classification [24] and the Kirkland–Glažich solvent strength prism in multi-solvent elution [25]. The authors gave also a name to the column optimization approach: "SOS-LC" (stationary phase optimized selectivity liquid chromatography), or "POPLC" (phase optimized liquid chromatography) [13]. The POPLink columns have been used by several authors to develop applications for the determination of different analytes using isocratic (flavonoids and pesticides [11], steroids [15], oligopeptides [18], nitroaromatic explosives [26], synthetic thyroid hormones [27], and polymer electrolyte membrane degradation products [28]), or gradient elution (steroids [16,17,19], sulphonamides [19], and polymer electrolyte membrane degradation products [28]).

We were interested in developing a screening procedure for sulphonamides, which are an important class of antimicrobial agents. Some years ago, we used a Hypersil ODS column to analyze these drugs, and after optimizing the mobile phase composition, only 10–11 sulphonamides could be resolved [29]. Recently, we thought that the use of serially coupled columns could span the separation power and succeed with more complex mixtures of these drugs. For this purpose, we used two different systems: the POPLink system, and columns from other manufacturers that were coupled with ZDV connectors without the need of PEEK holders. In this work, the comparison of these two systems is shown using isocratic elution. Guidelines to develop reliable chromatographic peak shape predictions with optimization purposes are also described.

Table 1
Influence of the column order on the retention times for several combinations of stationary phases.

Compounds	POP/IC				ACE			
	Combination 1		Combination 2		Combination 3		Combination 4	
	40 mm SH2 + 40 mm CN EPS + 40 mm CN	40 mm CN + 40 mm SH2 EPS + 40 mm SH2	60 mm EPS + 60 mm CN	60 mm CN + 60 mm EPS	20 mm C18 + 50 mm Phenyl + 35 mm CN	35 mm CN + 50 mm Phenyl + 20 mm C18	30 mm HL + 30 mm AQ	30 mm AQ + 30 mm HL
Sulphaacetamide	2.75	2.62	2.33	2.22	4.13	4.14	2.56	2.56
Sulphachloropyridazine	10.54	9.80	7.99	7.74	17.98	18.00	12.25	12.30
Sulphadiazine	3.20	2.98	2.55	2.48	4.91	4.91	3.17	3.17
Sulphadimethoxine	36.01	34.37	26.72	25.60	53.14	53.14	43.50	43.50
Sulphaguanidine	1.38	1.33	1.24	1.24	2.13	2.13	1.35	1.35
Sulphamerazine	4.05	3.87	3.04	2.90	6.62	6.62	4.62	4.63
Sulphamethazine	5.25	4.94	3.70	3.47	8.82	8.82	6.51	6.51
Sulphamethizole	7.17	6.84	5.51	5.16	11.43	11.43	7.87	7.87
Sulphamethoxazole	13.00	12.49	10.18	9.54	20.88	20.88	15.07	15.10
Sulphamonomethoxine	9.96	9.47	7.30	6.82	15.65	15.65	11.72	11.72
Sulphamylamide	1.65	1.60	1.45	1.38	2.55	2.55	1.60	1.57
Sulphapyridine	3.66	3.44	2.75	2.63	6.05	6.05	4.16	4.17
Sulphaquinoxaline	46.95	46.40	34.67	35.23	68.11	68.11	55.23	55.22
Sulphathiazole	3.84	3.69	3.12	3.02	6.54	6.56	4.15	4.14
Sulphisoxazole	17.99	18.08	14.51	13.20	27.04	27.05	19.46	19.46

2. Theory

2.1. Prediction of retention times for serially coupled columns

The retention time for a solute eluted from serially coupled column segments is a linear combination of the times yielded by each column segment, t_{R_i} :

$$t_{R_c} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n t_{R_i} \quad (1)$$

where n is the segment index and t_{ext} the retention time associated to the extra-column volume. When several column segments are coupled, the extra-column volume includes besides the contribution of the external tubing, the volume associated to the connections between columns, which may have significant effects on the peak shape and is not easily measurable.

Strictly speaking, the retention factor for each column segment should be calculated taking into account both t_{ext} and the dead time for the column segment, t_{0_i} . For a single column segment, the retention factor is given by:

$$k_i = \frac{t_{R_i} - t_{0_i}}{t_{0_i} - t_{\text{ext}}} \quad (2)$$

which should be the same for a segment of any length, or for the combination of several segments containing the same stationary phase (provided there is no additional dead volume between segments). Note that the subtraction in the numerator eliminates the t_{ext} factor, which is present in the experimental measurements of both t_{R_i} and t_{0_i} .

In the column assemblies, several segments containing the same stationary phase can be combined with segments containing other stationary phases with different selectivity. The total length of the column assembly, L , will be the sum of the lengths of the different segments, l_i :

$$L = \sum_{i=1}^n l_i \quad (3)$$

For segment i containing a given stationary phase, and considering Eq. (2), the solute linear velocity for isocratic elution is given by:

$$v_i = \frac{dl}{dt} = \frac{l_i}{t_{R_i}} = \frac{l_i}{t_{0_i}(1 + k_i)} = \frac{u_0}{1 + k_i} \quad (4)$$

where u_0 is the mobile phase linear velocity (which is assumed to be constant). The solute linear velocity is also assumed to be the same for all segments containing the same stationary phase. Therefore:

$$v_i = \frac{L}{t_R} \quad (5)$$

where t_R is here the total retention time for the segments containing the same stationary phase, with a total length L . From Eq. (4):

$$t_{R_i} = \frac{1 + k_i}{u_0} l_i \quad (6)$$

Combining Eqs. (1) and (6), and considering that $t_{0_i} = l_i/u_0$:

$$t_{R_c} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{u_0} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n t_{0_i} + \sum_{i=1}^n t_{0_i} k_i = t_0 + \sum_{i=1}^n t_{0_i} k_i \quad (7)$$

Note that t_{0_i} is the dead time inside a segment (without extra-column contribution), and t_0 is the dead time of the whole column assembly.

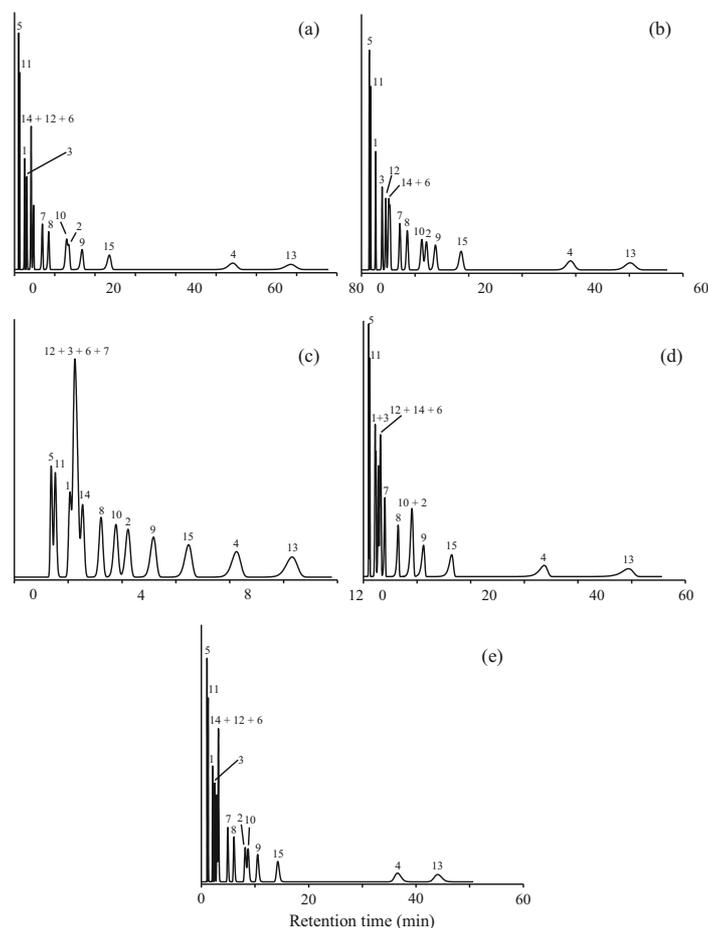


Fig. 2. Chromatograms obtained with 10% (v/v) acetonitrile for the set of 15 sulphphonamides for 120 mm POPLink columns: (a) C18-SH2, (b) Phenyl 2, (c) Cyano, (d) C18-EPS, and (e) C30. Solutes: (1) sulphacetamide, (2) sulphachloropyridazine, (3) sulphadiazine, (4) sulphadimethoxine, (5) sulphaguanidine, (6) sulphamerazine, (7) sulphamethazine, (8) sulphamethizole, (9) sulphamethoxazole, (10) sulphamonomethoxine, (11) sulphaniilamide, (12) sulphapyridine, (13) sulphaquinoxaline, (14) sulphathiazole, and (15) sulphisoxazole.

Alternatively, Eq. (7) can be written as follows:

$$\begin{aligned}
 t_R &= t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \frac{L}{u_0} \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{L} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} + \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{u_0} \sum_{i=1}^n \frac{k_i l_i}{L} \\
 &= t_{\text{ext}} + (1 + k_c) \sum_{i=1}^n t_{0_i} \quad (8)
 \end{aligned}$$

where k_c is the combined retention factor for the column assembly, obtained by adding the retention factors for every segment, weighted according to the segment lengths. In Eqs. (7) and (8), the term $\sum_{i=1}^n t_{0_i}$ is the dead time associated to the transit through the coupled column assembly, and considers only the contributions of every segment in the assembly. Note that Eq. (7) isolates

the retention contribution of each segment through each $t_{0_i} k_i$ term, while Eq. (8) assumes an imaginary column with a retention factor k_c . The latter standpoint (Eq. (8)) is simpler, but the former (Eq. (7)) has the advantage of individualizing the retention behavior inside each segment, which is an interesting feature for monitoring the changes in peak shape (see next section), and also for gradient elution, which will be considered in future work.

2.2. Prediction of peak profiles for serially coupled columns

Peak profiles are characterized by their width and asymmetry, which depend on the values of the left (A) and right (B) peak half-widths. For symmetrical peaks: $A = B$. In any case, both half-widths

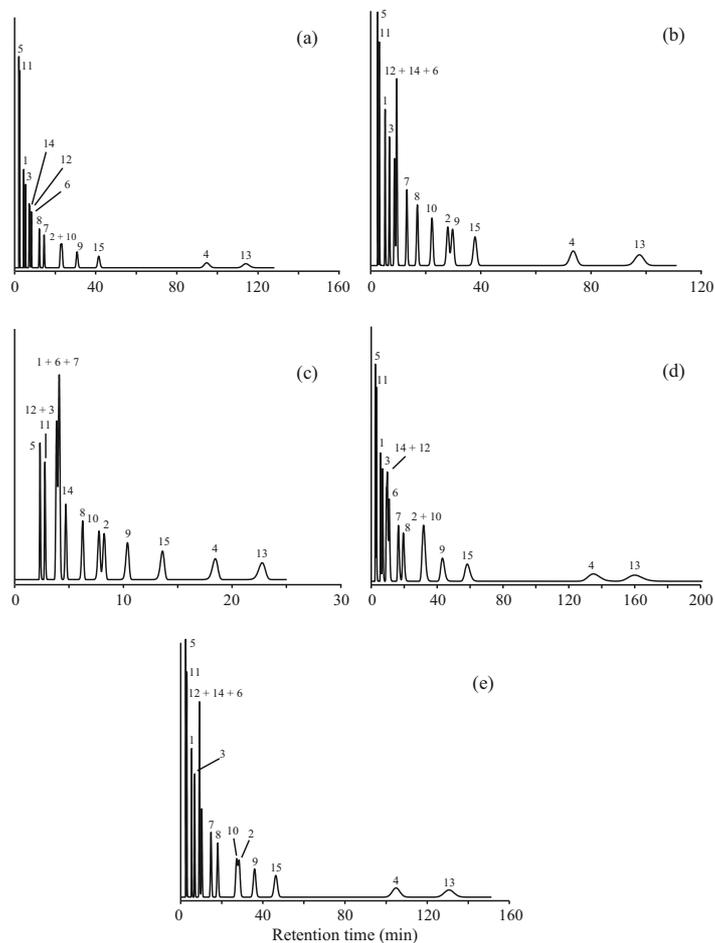


Fig. 3. Chromatograms for 120 mm ACE columns: (a) ACE C18, (b) ACE Phenyl, (c) ACE CN, (d) ACE C18-HL, and (e) ACE AQ. See Fig. 2 for other details.

can be easily predicted with good accuracy for solutes eluted from single columns. For isocratic elution, the models are parabolic [30]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (9)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (10)$$

where t_R is the retention time, and a_{0-2} and b_{0-2} are fitting coefficients, which depend on the column length. The model parameters can be obtained by fitting the half-widths for a set of solutes. It should be mentioned that often the parabola can be assimilated to a straight-line [31].

This approach can be extended to serially connected columns. The values of the half-widths for columns of any length (A_i and B_i) can be obtained from the predicted values for a reference column (A_r and B_r) with an arbitrarily selected length (preferably

a long column). Since the width (or half-width) of a peak increases with the square root of the column length that a solute has traveled through [32], the half-widths for segments of any length containing the same stationary phase can be predicted as follows:

$$A_i = A_r \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (11)$$

$$B_i = B_r \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (12)$$

where l_r is the length of the reference column. On the other hand, considering that the contribution to the total variance is given by the sum of the variances of independent contributions (which is only strictly true for Gaussian peaks), the following

approximation holds for the peaks eluted from a given column assembly:

$$A_c^2 = \sum_{i=1}^n A_i^2 \quad (13)$$

$$B_c^2 = \sum_{i=1}^n B_i^2 \quad (14)$$

and

$$(A + B)_c^2 = \sum_{i=1}^n (A_i + B_i)^2 \quad (15)$$

3. Experimental

3.1. Reagents

Fifteen sulphonamides were used as probe compounds: sulphacetamide, sulphachloropyridazine, sulphadiazine, sulphadimethoxine, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole, sulphamonomethoxine, sulphamilamide, sulphapyridine, sulphaquinoxaline, sulphathiazole, and sulphisoxazole, all from Sigma (St. Louis, MO). Stock solutions containing $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of the drugs were prepared by dissolving the compounds in a few milliliters of ethanol from Scharlau (analytical grade, Barcelona, Spain), assisted by an ultrasonic bath from Elmasonic (Singen, Germany), and dilution with nanopure water obtained with a Barnstead ultrapure water purification system from Thermo Scientific (Dubuque, IA). These solutions were further diluted with water up to $20 \mu\text{g ml}^{-1}$, before injection.

The mobile phase contained 10% (v/v) acetonitrile from Scharlau (HPLC grade), 0.01 M dihydrogen phosphate anhydrous from Sigma (Roedermark, Germany), and nanopure water. The pH was set at 3 with the aid of a phosphate buffer adjusted with 0.01 M HCl and 0.01 M NaOH from Scharlau, which was controlled with a precision of ± 0.002 pH units using a pH-meter from Crison (Model MicropH 2002, Barcelona), and a combined glass electrode from Orion (Model 8102, Barcelona), containing Ag/AgCl reference electrodes with 3.0 M KCl aqueous solution as salt bridge.

3.2. Chromatographic instrument and column assemblies

The HPLC system was from Agilent (Waldbronn, Germany), and was equipped with an isocratic pump (HP 1200, Model G1310A), an autosampler with 2 ml vials (HP 1100, Model G1313A), a thermostated column compartment (HP 1100, Model G1316A), and a multiple-variable wavelength UV–visible detector (HP 1200, Model G1315 C). The chromatographic system was controlled by an OpenLAB CDS LC ChemStation from Agilent (B.04.03 release). The signal was monitored at 254 nm, which was close to the absorption maxima of the sulphonamides, where the buffer system exhibited negligible absorbance. The flow rate was 1 ml min^{-1} . All measurements were performed at 25°C . The routines used to treat the data were developed in MATLAB 2010b from The MathWorks Inc. (Natick, MA).

Two different serially coupled column systems were used, manufactured by Bischoff Chromatography (Leonberg, Germany) and ACE (Aberdeen, Scotland, UK). The Bischoff system consisted of a kit with five sets of stainless steel cartridge segments containing different stationary phases with a particle size of $5 \mu\text{m}$. Each set consisted of cartridges of 10, 20, 40 and 80 mm length, and 3 mm internal diameter. The column cartridges are directly coupled without the need of an extra ZDV union. The column edges are covered with a grid. When the columns are put together, the

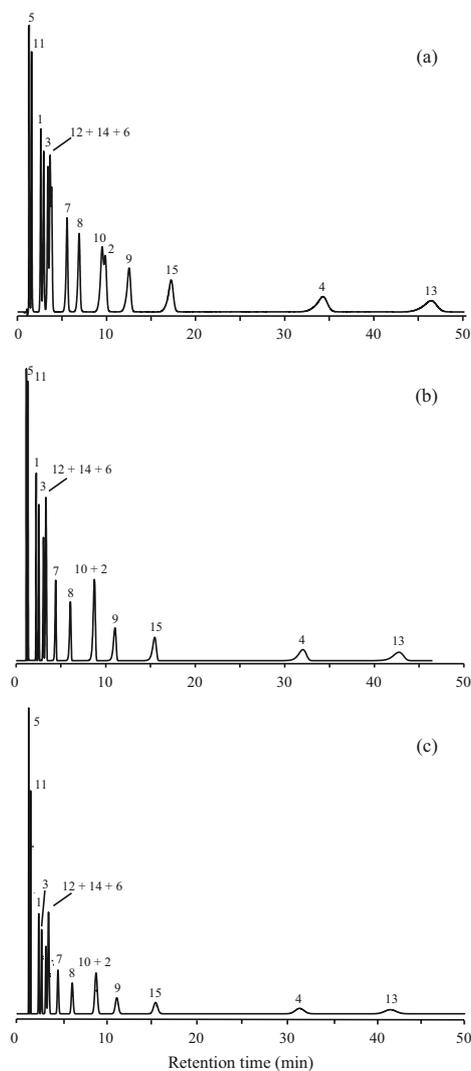


Fig. 4. Chromatograms for the POPLink column combination C18-SH2 (40 mm) + C18-EPS (40 mm) + Cyano (40 mm). (a) Experimental chromatogram, (b) predicted chromatogram according to the software developed for this work, and (c) predicted chromatogram according to the POPLink software. The areas in the predicted chromatograms were normalized. See Fig. 2 for other details.

grids on the edges are pressured against each other. Since this union by pressure is not able to tightly fit the cartridge segments, these are assembled inside a series of PEEK holders with lengths of 1 and 2 cm, which are screwed together to build the total system. According to the manufacturer, the column coupling is

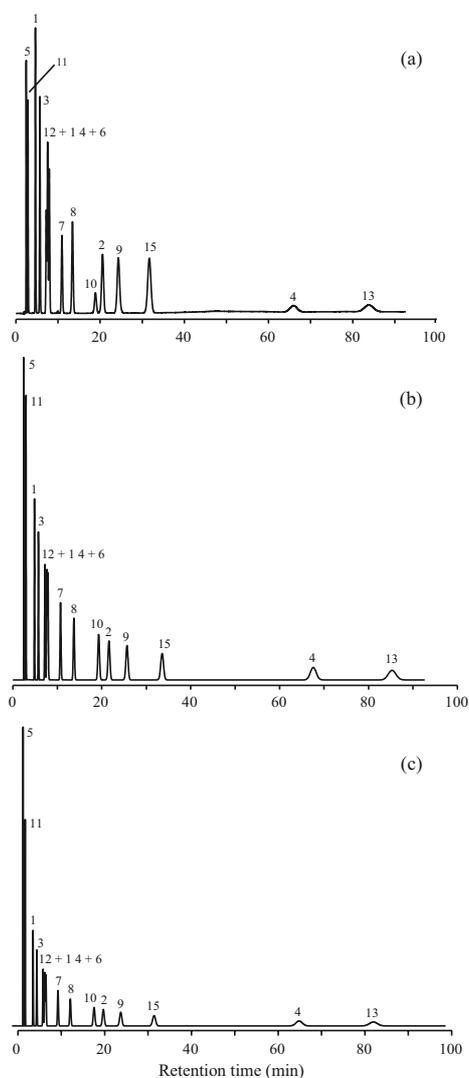


Fig. 5. Chromatograms for the ACE column combination ACE C18 (40 mm, two 20 mm segments) + ACE Phenyl (50 mm) + ACE CN (35 mm). (a) Experimental chromatogram, (b) predicted chromatogram according to the software developed for this work, and (c) predicted chromatogram according to the POPLink software. See Figs. 2 and 4 for other details.

performed with zero dead volume. The stationary phases were: ProntoSIL C18-SH2 (C18 phase with maximal carbon load aimed to separate by purely hydrophobic interactions, with an extremely stable and effective endcapping), C18-EPS (C18 phase with polar embedded amide groups, which offers maximal polar selectivity), Phenyl 2 (based on π - π interactions, with orthogonal selectivity

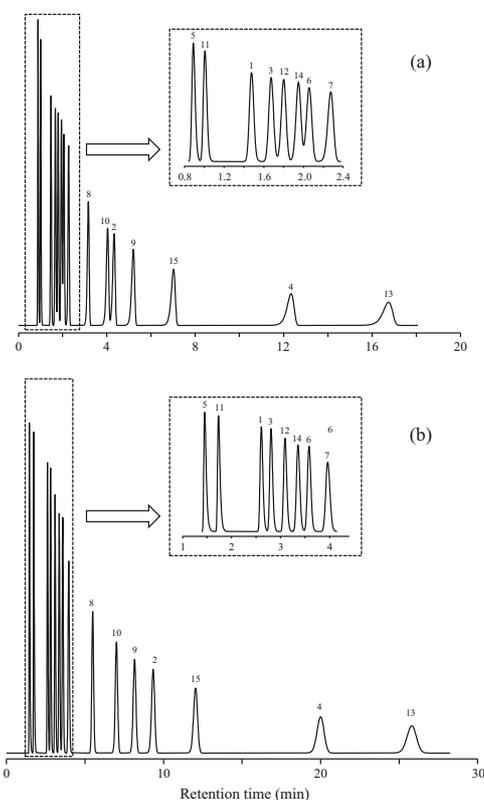


Fig. 6. Optimal chromatograms for the: (a) POPLink system: Phenyl 2 (10 mm) + Cyano (50 mm) + C18-EPS (20 mm), and (b) ACE system: ACE Phenyl (20 mm) + ACE CN (50 mm). The chromatograms were predicted using the software developed for this work. See Fig. 2 for other details.

to the C18 phases), Cyano (cyano-propyl bonded phase offering excellent polar selectivity, with stable endcapping), and C30 (shape selectivity for strong molecular recognition for separating planar from non-planar solutes, without endcapping).

Several ACE stainless steel columns and PEEK fingertight column couplers (which are ZDV connectors), chosen from catalog, were used to build a different serially coupled column system. The column couplers (usually commercialized to connect analytical and guard columns) were used to connect columns of different lengths by screwing them to each side of the ZDV couplers. No other element is needed to maintain tightly linked the columns, as in the Bischoff system. The columns are commercialized in different lengths (e.g. 20, 30, 35, 50 and 75 mm), internal diameters (e.g. 1, 2, 3, 4 and 4.6 mm), and particle sizes (e.g. 3, 5 and 10 μ m). In this work, columns of different lengths, 4.6 mm internal diameter and 5 μ m particle size, were used. The stationary phases were: ACE C18 (which separates by hydrophobic interactions, prepared from high purity silica), ACE C18-HL (giving increased retention compared to ACE C18 due to a high surface area and carbon load), ACE AQ (C18 bonded phase with integrated polar functionality, resistant to phase collapse), ACE CN (cyano phase that increases the retention of

polar compounds), and ACE Phenyl (phenyl phase with a hydrophobicity between C4 and C8 phases, offering alternative selectivity for aromatic, amine and polar compounds).

Both column systems were protected from the mobile phase with a Nucleosil C18 guard column (30 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA), which was located just before the injector to measure exclusively the chromatographic behavior of the column assemblies. The dead time in both assemblies was determined by injection of 20 μg ml⁻¹ KBr from Acros Organics (Fair Lawn, NJ), and detection at 210 nm. The same instrument and tubing was used for all experiences. The extra-column volume, measured by injection of 20 μg ml⁻¹ KBr and replacing the column assembly by a ZDV connection, was $t_{ext} = 0.137$ min.

4. Results and discussion

4.1. Advantages and limitations of the serially coupled column assemblies

In the conventional HPLC analysis of complex mixtures using a single column, complete resolution is often not achieved. In this case, the usual practice is to change to other columns with stationary phases from other manufacturers, sometimes with different separation mechanisms. However, in many cases, the separations do not succeed either. The search for new solutions without the assistance of more selective detectors is, thus, not surprising. The combination of separation mechanisms using serial columns is a simple option to increase the expectancies of success. In many situations (as will be shown in this work), the overall selectivity of serially coupled columns is better than that of any single column (i.e. single stationary phase). Column coupling also reduces the analysis time, making the approach competitive against gradient elution [27].

Using columns with different stationary phases and lengths, the selectivity can be, in principle, finely tuned and even the elution order may differ. The combination of stationary phases, independently of the mechanisms of the separation, is possible, provided all are compatible with the working mobile phase and experimental conditions. The selectivity of the combination will be only strikingly different if the selectivity of each individual stationary phase differs from each other to a great extent [13], but interesting changes in behavior are observed even if this is not the case.

The approach involves a number of measurements to obtain the retention times and peak shape parameters (only width, or width and asymmetry) for each solute eluted from several columns of a selected length containing different stationary phases (i.e. reference columns). The length of the reference columns can be arbitrarily selected and should not be necessarily the same for all stationary phases. This information will allow the calculation of the retention times for serial combinations of stationary phase segments of different lengths, and the prediction of the optimal combination that will result in the most favorable separation in the shortest possible analysis time. The mathematics for these predictions is simpler than in the case of optimizing the mobile phase composition for a single column. As the retention times are additive, the total retention time is just the summation of the retention times in each segment (naturally including the extra-column time).

Therefore, the theory behind the use of serially coupled columns is indeed rather simple. How to put it in practice to get accurate results may be more complex. The optimization can consider the column length as a continuous variable; however, the available lengths in the market will introduce limitations. It should be also noted that the number of segments that can be appended depends on the pressure upper operative limit of the instrument.

However, the most problematic factor is the connection of the serial columns, which should not modify the result of the sum of behaviors of the columns. It is assumed that there is no volume associated to the connections between the columns, but if this were not the case, it is not easy or not possible to measure it. The suitability of two approaches to link the columns is discussed below.

4.2. Robustness of the assemblies

4.2.1. Use of PEEK holders to link the serial columns

A proper serial connection of columns needs a ZDV union and a system to link tightly the columns. One of these systems consists of introducing the columns in PEEK holders, which are screwed to maintain the columns sufficiently attached. In principle, the system could work, but suffers of a number of mechanical and technical problems:

- (i) *Alignment of columns and holders:* The high pressure in the instrument obliges to fit tightly the stainless steel column segments, in order to prevent mobile phase leakages. For this purpose, the column segments should be properly aligned. The PEEK holders should also be perfectly aligned to be correctly screwed. However, after routine use of composite columns, the coupled PEEK holders become strongly grasped to each other, and can suffer damage and break down.
- (ii) *System stabilization time:* Base-line stabilization can be time consuming due to leakage problems and/or incorrect alignment of the pieces. The stabilization time may span 2 h, along which pressure fluctuates up to ±50%. After this time, the pressure fluctuation can be reduced below ±5% and the injections may then proceed. When the holders are properly fitted, the pressure can stabilize as quickly as with conventional columns.
- (iii) *Non-negligible void volumes in the column connections:* The void volume between segments may be significant. Although ZDV connections are used to couple the columns, these connections can be insufficient to keep them tightly linked. An insufficiently tight connection may arise from an imperfect screwing of the PEEK holders, due to improper handling of the analyst. This creates a small mixing chamber, giving rise to separations slightly dependent on the order of the coupled segments. Theoretically, in isocratic elution, there should be no change in the retention time with the column order.

Table 1 illustrates the effect of changes in the order of the columns observed in our laboratory. It should be noted that the patent authors reported for the POPLink system that "the accuracy of the retention times and selectivities (measured as the ratio of retention times) depends slightly on the sequence of the different stationary phases" [13]. They also indicated that the reason of these differences was not clear, but in their opinion, "the separation process near the end-fittings may differ from other parts of the segmented column". This suggests that the column packing in the coupled system may not be homogeneous enough. Perhaps, the ZDV unions attached to the edges of the column segments give rise to differences in the packing density in these regions. This effect increases after continuous use. Of course, the significance of the changes in retention times with the order of the columns will depend on the specific separation.

The differences in peak shape, when the order in the column segments is changed, were also investigated. The results are plotted in Fig. 1a and c, where it is evident that the column order in the POPLink system also affects the efficiency and asymmetry degree of the chromatographic peaks.

The non-ideal connections can be also the reason of the achievement of dead times not exactly proportional to the segment lengths. Thus, for ProntoSil C18-SH2, the column dead time measured in our

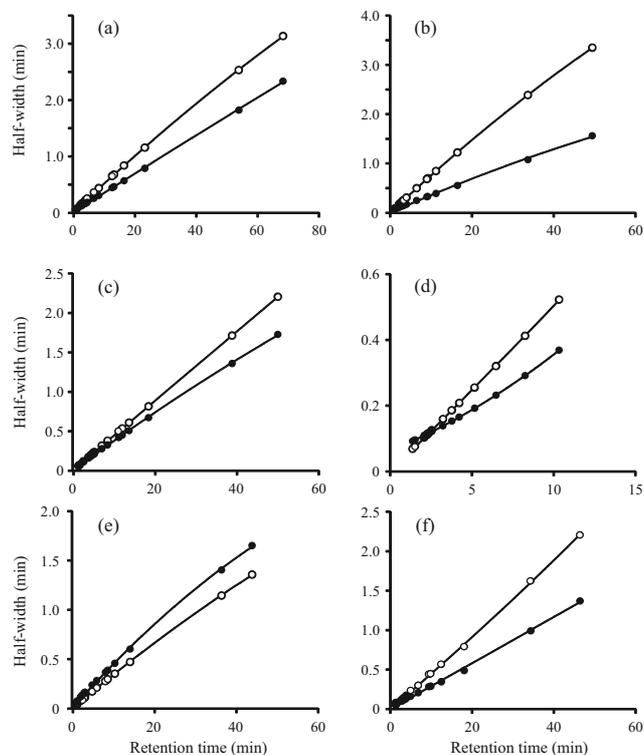


Fig. 7. Half-width plots for 120 mm POPLink single columns and a column combination: (a) C18-SH2, (b) Phenyl 2, (c) Cyano, (d) C18-EPS, (e) C30, and (e) combination of C18-SH2 (40 mm)+C18-EPS (40 mm)+Cyano (40 mm). The experimental data correspond to the whole set of 15 sulphonamides eluted with 10% acetonitrile. Half-widths: right (●) and left (○).

laboratory, for segments of 40 mm, 50 mm (formed with segments of 40 and 10 mm), 80 mm, and 100 mm (formed with segments of 80 and 20 mm), was $t_0 = 0.11, 0.20, 0.14,$ and 0.27 , respectively. For ProntoSil C18-EPS and segments of 40 mm, 50 mm (40 + 10), 60 mm (40 + 20), 80 mm, 100 mm (80 + 20), and 120 mm (80 + 40), the corresponding dead time was $t_0 = 0.086, 0.14, 0.16, 0.19, 0.34,$ and 0.42 min, respectively. As observed, the dead time for the coupled segments (see, for example, 80 + 40) is appreciably larger than the sum of the values for each segment.

4.2.2. Use of fingertight column couplers

We first thought that a possible solution of the problems found with the serial connection of columns using PEEK holders was to replace them by stainless steel holders, but before proceeding to this solution, we finally adopted a simpler one. In the last years, we have been using PEEK one-piece column couplers, developed by several manufacturers, to connect analytical and guard columns. Since the void volume in the couplers is close to zero (they are ZDV junctions), the loss in column efficiency is negligible. In addition, the PEEK couplers are easily and reproducibly screwed to the column edges, and therefore, the columns result tightly joined, without the need of holders to maintain them together. The PEEK

material in the couplers is highly robust, inert and biocompatible with a broad range of applications.

Therefore, a new solution to couple serial columns was already available in our laboratory. We thought of coupling short columns of diverse lengths and natures with the ZDV PEEK junctions. Considering several providers, we finally purchased both columns and couplers from ACE Systems. However, the PEEK couplers from ACE or other manufacturers are compatible with columns from any other manufacturer. Therefore, there is no need of dedicated columns, nor dependence of a specific provider.

We have found that joining the columns with the PEEK couplers provides highly reliable results, the work is really comfortable (i.e. the problem with the screwing/unscrewing of the PEEK column holders disappears), and the system is highly robust: we have used the same PEEK couplers during months without any apparent deterioration. Finally, the order of the stationary phases does not affect the values of the retention times and peak shape parameters, as can be observed in Table 1 and Fig. 1b and d.

4.3. Guidelines to build optimization software

As indicated, the prediction of retention times and peak shape for the serially coupled columns requires the previous

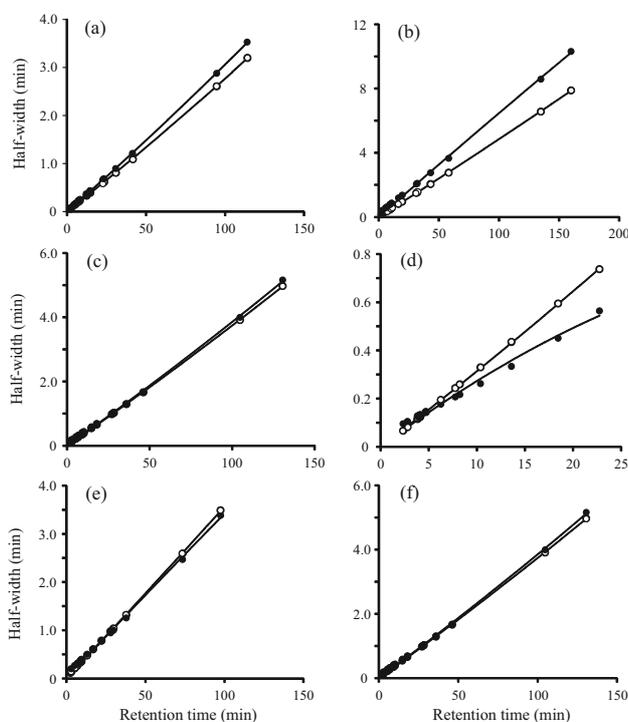


Fig. 8. Half-width plots for 120 mm ACE single columns and a column combination: (a) ACE C18, (b) ACE Phenyl, (c) ACE CN, (d) ACE C18-HL, (e) ACE AQ, and (f) combination of ACE C18 (40 mm, two 20 mm segments) + ACE Phenyl (50 mm) + ACE CN (35 mm). The experimental data correspond to the whole set of 15 sulphonamides eluted with 10% acetonitrile. Half-widths: right (●) and left (○).

measurement of these parameters for each solute and stationary phase, at a selected column length and mobile phase composition. The number of measurements is small (the same as the set of stationary phases to be eventually combined), and the prediction of retention times is very simple and can be made based on Eqs. (1) or (8). It should be noted that once the peak parameters (retention times, and widths or half-widths) have been modeled, the methodologies to be used for predicting the peak shape and resolution, and eventually the optimization of the separation, are the same as those used for the conventional optimization of the mobile phase composition for a single column. In any case, the complexity varies depending on the applied approach and the required accuracy.

Nyiredy et al. developed an optimization software, which was commercialized to assist method development for the POPLink assemblies [11,13]. In this software, only one organic solvent level, previously chosen by the analyst attending to the total analysis time, is scanned. The prediction of retention times is based on the PRISMA model, which the authors had formerly applied to optimize the mobile phase composition in planar and liquid chromatography [22,23]. In the case of working with three stationary phases, the geometrical representation is a prism; the length of each edge corresponds to the "polarity" of the respective stationary phase. The approach uses the upper irregular plane (triangle) of the prism (the top cover) to optimize the combinations. Naturally, it can be

generalized to more than three stationary phases. The algorithm in this software explores all possible segment combinations within the restriction of a maximal allowable predicted analysis time and column length. The software considers all possible combinations of column segments, computes the retention factors based on Eq. (8), and finds out the optimal combination in a conventional way by maximizing the Snyder resolution R_S for the critical pair. The chromatograms offered by the software consist of Gaussian peaks, which are drawn according to the combined column efficiency to improve the predictions.

Based on our previous experience in chromatographic optimization, we developed a different approach to optimize the resolution for the serially coupled columns. We preferred to compute the retention times for the combinations of column segments based on Eq. (7). In addition, models for predicting the left and right half-widths (Eqs. (9) and (10)) were built in order to forecast the peak width and asymmetry at different retention times for each analyte. This information can be obtained from the peak half-widths of several solutes eluted with a single mobile phase, restricted to the condition that they exhibit the same partitioning kinetics. The half-widths for a single segment at any other length were obtained according to Eqs. (11) and (12). Finally, the asymmetry degree $(B/A)_c$ for each combination of segments was calculated using Eqs. (13) and (14) to predict A and B separately. The width $(A+B)_c$ was predicted with Eq. (15).

The chromatographic resolution was calculated using the peak purity concept, which is the fraction of non-overlapped peak [34,35]. This measurement ranges between 0 for full overlapping to 1 for baseline resolution. The total resolution (P) was obtained as the product of the peak purities for all solutes eluted in a chromatogram. Therefore, the range of global peak purity is also $0 \leq P \leq 1$. Obviously, the resolution measurement with this approach needs an accurate prediction of the peak profile to take full advantage of it.

4.4. Resolution and analysis time for the single columns

As described, two different approaches to serially connect columns were compared in our laboratory. In order to predict the retention times for combinations of columns of any length, and eventually obtain that giving maximal resolution, the retention times and peak shape parameters for columns of selected lengths (reference columns) were obtained for each sulphonamide. For the POPLink system, all measurements were made using 80 mm columns containing C18-SH2, C18-EPS, Phenyl 2, Cyano, or C30. For the ACE system, columns of the same length for each stationary phase were not available in our laboratory; therefore the measurements were made on columns of different lengths (indicated in parenthesis): ACE C18 (90 mm, formed by connecting two 20 mm segment and one 50 mm segment), ACE C18-HL (30 mm), ACE AQ (50 mm), ACE CN (110 mm, 75 + 35 mm segments), and ACE Phenyl (50 mm).

The simple approach we are presenting in this work relies on the arbitrary selection of a mobile phase composition. We selected 10% acetonitrile which offered sufficiently weak elution strength, for which maximal peak capacity was expected. We will first show the behavior of the single columns with this mobile phase. Figs. 2 and 3 show the chromatograms for POPLink and ACE columns, respectively. For a better comparison of the columns, the chromatograms correspond to predictions for columns of the same length (120 mm).

As observed, two or more solutes remain unresolved in all columns. For the POPLink system, the resolution is below 0.01 for all columns, except for the Phenyl 2 column for which $P=0.50$ (which implies also low resolution for the critical pair). The analysis times ranged between 10 and 70 min. Usually, sulphamerazine, sulphapyridine and sulphathiazole are overlapped, but for some columns other solutes remain unresolved. The selectivity varies among columns, although with minor changes in the elution order.

For the ACE system, the resolution is again below 0.01 for all columns, except for the ACE C18, for which $P=0.43$. The analysis times are usually longer than for the POPLink columns, and range between 22 and 160 min. As in the first system, sulphamerazine, sulphapyridine and sulphathiazole remain usually unresolved, but several other solutes show overlapping. In the ACE columns, the changes in selectivity and elution order are, in general, more significant than for the POPLink system. The selectivity for ACE C18 and ACE C18HL is similar, but the retention with the latter stationary phase is longer. This difference in behavior can be interesting for certain separations, as shown below. The approach will select the most appropriate column to get the best separation for a given problem. If a given column does not offer any improvement, the approach will discard it. We should also indicate that full resolution of the set of 15 sulphonamides was also not possible with the single columns at other mobile phase compositions, in the range 10–20% acetonitrile.

4.5. Prediction of chromatograms for the combined columns

Chromatograms for combinations of three stationary phases, using the POPLink and ACE column systems and 10% acetonitrile,

are shown in Figs. 4 and 5, respectively. In the figures, the experimental chromatograms (Figs. 4a and 5a) are compared with those predicted using the software developed in our laboratory, that takes into account the peak asymmetries (Figs. 4b and 5b), and according to the POPLink software (Figs. 4c and 5c). The differences in the prediction of the retention times between the POPLink and ACE software are notorious. Note that only the software application developed in our laboratory reproduces accurately the asymmetries observed in the experimental chromatograms. In spite of the approximations (Eqs. (13)–(15)) adopted for predicting the peak shape, the agreement is highly satisfactory.

Using the software developed for this work, the best predictions for the chromatograms in Figs. 4 and 5 were obtained for the ACE columns with mean relative errors of $(1.1 \pm 0.7)\%$ against $(11.7 \pm 2.8)\%$ for the POPLink columns. The predictions for the POPLink columns improved when performed with the POPLink software, decreasing to $(3.1 \pm 1.8)\%$. Surprisingly, the POPLink software gave rise to a significant deterioration in the predictions for the ACE columns: $(29.7 \pm 17.3)\%$. In both cases, it should be noted that the magnitude of the errors correlated with the retention time. Similar results were obtained with other combinations for both systems.

This kind of result suggests the existence of a proportional error in the retention times, which can be associated to differences in the dead volumes used in each software. Likely, the POPLink software, besides the correction due to the column length, incorporates some type of factor applied to the dead volume of each segment (which is not documented). Indeed, we have checked that if the corrected-by-the-length void volumes are increased around 5–20% (depending on the nature of the column segments), the predictions for the POPLink columns given by our software are accurate. Therefore, apparently, there is an increase in the void volume associated to the connections in this column system, which is accounted by the POPLink software. This correction is unnecessary for the ACE columns, and consequently, the predictions for these columns given by the POPLink software are wrong. Fortunately, these inaccuracies are not translated in selectivity errors.

Fig. 6 shows the optimal combination for the two column systems (POPLink and ACE) according to our software, using 10% acetonitrile and restricted to a maximal length of 150 mm, maximal pressure of 275 bar and maximal analysis time of 50 min, to reduce the calculation volume. From the found solutions, that one resolving the mixture in the minimal possible time was taken, which is a common practice. As observed, almost full resolution was found for the ACE system (20 mm ACE Phenyl + 50 mm ACE CN, $P=0.991$), with an analysis time of 27 min, while a small overlapping was obtained for three pairs of peaks for the POPLink system (10 mm Phenyl 2 + 50 mm Cyano + 20 mm C18-EPS, $P=0.871$) with an analysis time of 17 min. A mobile phase with larger elution strength, as 17% acetonitrile, decreased the analysis time to 19 min for the ACE system, being the best combination: 50 mm ACE C18 + 10 mm ACE C18-HL + 20 mm ACE AQ ($P=0.987$). In both cases, the instrument pressure was below 100 bar.

4.6. Peak profiles

We should observe here the fact that all peaks obtained with the POPLink columns were fronting, except for the C30 column (Fig. 2), being the asymmetry degrees (B/A) considering the whole set of sulphonamides: C18-EPS (0.58 ± 0.15), C18-SH2 (0.76 ± 0.09), Phenyl 2 (0.90 ± 0.09), Cyano (0.94 ± 0.19), and C30 (1.41 ± 0.16). The fronting effect was more notorious for the combined columns. Thus, for the chromatogram in Fig. 4a, $B/A=0.73 \pm 0.24$. In contrast, the ACE columns gave rise to Gaussian peaks or peaks with moderate tailing (rarely fronting). The asymmetry degrees (B/A) were: ACE CN (0.99 ± 0.20), ACE C18 (1.11 ± 0.03), ACE Phenyl (1.13 ± 0.21),

ACE AQ (1.15 ± 0.17), and ACE C18-HL (1.55 ± 0.27). The peaks were also almost symmetrical for the column combinations, being $B/A = 1.14 \pm 0.24$ for the chromatogram in Fig. 5a.

The representation of half-width plots helps to evaluate the peak profiles. Figs. 7 and 8 depict these plots for the chromatograms in Figs. 2–5, corresponding to the data obtained for the set of 15 sulphonamides eluted using the POPLink and ACE column systems. As observed, the points follow a parabolic trend (Eqs. (9) and (10)), but for some columns the trend is almost linear, with correlation coefficients $r^2 > 0.995$ and 0.999 for the POPLink and ACE systems, respectively, except for the right half-width for the cyano columns in both systems, with $r^2 = 0.893$ and 0.968 , respectively. For the column combinations, $r^2 > 0.995$ and 0.9993 , respectively. The plots illustrate the fronting effect for the POPLink system and the higher symmetry for the ACE columns.

We checked that the peaks with the POPLink columns were still fronting (with the same asymmetry degree) when solutions at smaller concentrations (diluted in a 10–20 factor) were injected. The fronting peaks were also observed for other compounds different from sulphonamides, and are also visible in some published chromatograms obtained by other authors with POPLink columns [15,18]. A possible reason of the origin of fronting peaks may be the existence of column voids [36]. In order to check this hypothesis, we made a careless connection with ProntoSil Phenyl 2 and C18-SH2, and obtained extremely fronting peaks with similar values for the left half-width for all the peaks in the chromatogram (with mean $B/A = 0.49$). We should remember that the dead volume of combinations of POPLink segments was checked to be larger than the sum of dead volumes for the individual segments (Section 4.2.1). Therefore, the junctions attached at the column edges and the imperfect connections between columns seem to generate head spaces, which can be the reason of some negative effects with these columns.

5. Conclusions

Theoretically, the use of serially coupled columns is a simple approach that can yield excellent separations for complex problems, which may be impossible to succeed in a classical optimization, where a single stationary phase is used, and the mobile phase composition, optimized. The mathematical treatment is, in addition, very simple. However, some technical problems should be solved. This work compares two different systems to link the serial columns. The POPLink system is an interesting solution exclusively designed for this application, including column segments of a variety of lengths (10, 20, 40 and 80 mm) that allow building any combination of columns differing in 10 mm. A problem with this system is that the column cartridges need holders to join them tightly, which need careful handling. A possible solution (although perhaps more expensive) is the use of holders made of stainless steel. Another better solution is to eliminate the holders and use column couplers which are screwed to the column, maintaining the segments tightly attached. This solution seems to be more robust and, apparently, eliminates the problem of the non-zero dead volume. In addition, there are several manufacturers that commercialize this column connection system. An eventual problem is the lack of availability of a variety of column segments with the needed lengths. If all these problems are solved, the serially coupled approach is expected to have a promising future.

The ACE serially coupled column system, combined with the prediction approach developed for this work, yielded errors in the

retention times of about 1%, and highly reliable predictions in peak shape. Therefore, the ACE system seems to be highly promising for implementing serially coupled columns, although we should mention again that there are other manufacturers that commercialize similar systems. In this work, the reported approach was applied to isocratic elution with a pre-selected mobile phase composition. Future work will deal on the advantages of the simultaneous optimization of column nature and length, and mobile phase composition, and the use of gradient elution, which recently has been also approached in the literature for the POPLink system [16,17,19].

Acknowledgements

This work was supported by Project CTQ2010-16010/BQU (Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN of Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks a FPI grant from MICINN.

References

- [1] P.J. Schoenmakers, *Optimisation of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [2] R.M. Smith, *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [3] L.R. Snyder, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley, New York, 1997.
- [4] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 187.
- [5] A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 75.
- [6] H.J. Issaq, D.W. Mellini, T.E. Beesley, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 333.
- [7] H.J. Issaq, J. Gutierrez, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 2851.
- [8] C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 25.
- [9] D.J. Pietrzyk, S.M. Senne, D.M. Brown, *J. Chromatogr.* 546 (1991) 101.
- [10] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 171.
- [11] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepes, *Chromatographia* 63 (2006) 53.
- [12] D. Cabooter, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 114.
- [13] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepes, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 122.
- [14] B. Sreedhar, A. Seidel-Morgenstern 1215 (2008) 133.
- [15] M. Kühnle, J. Rehbein, K. Holtin, B. Dietrich, M. Gradi, H. Yeman, K. Albert, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1655.
- [16] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Chromatographia* 69 (2009) 609.
- [17] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1733.
- [18] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D.Y. Chen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 764.
- [19] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7222.
- [20] S. Nyiredy, Z. Szücs, K. Bischoff, *Patent Appl. No. 10 2005 024 154.9* (2005).
- [21] S. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepes, *Acta Pharm. Hung.* 77 (2007) 65.
- [22] S. Nyiredy, B. Meier, C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, *J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8 (1985) 186.
- [23] S. Nyiredy, K. Dallenbach-Toelke, O. Sticher, *J. Liq. Chromatogr.* 12 (1989) 95.
- [24] L.R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.* 16 (1978) 223.
- [25] J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 27.
- [26] U. Schumann, F.M. Matysik, W. Engewald, *Electroanalysis* 20 (2008) 98.
- [27] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 279.
- [28] M. Zedda, J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8910.
- [29] M.J. Ruiz-Ángel, R.D. Caballero, E. Simó-Alfonso, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 31.
- [30] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
- [31] M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
- [32] U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley, New York, 1997.
- [33] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
- [34] M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125.
- [35] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 17.
- [36] I.N. Papayodannis, A. Zotou, in: J. Cazes (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2001, p. 363.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Simultaneous optimization of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially coupled columns



C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque*

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 24 June 2013

Keywords:

Liquid chromatography
Serially coupled columns
Optimization
Mobile phase composition
Stationary phase nature
Column length

ABSTRACT

The combination of the selectivity of different columns serially coupled improves the separation expectancies with regard to the separation offered by each single column. In the reported approaches, either a pre-selected isocratic mobile phase composition or gradient program, giving rise to acceptable retention, is used. In previous work (JCA 1281 (2013) 94), we showed that the approach succeeds with conventional columns, assembled through zero-dead volume couplers. In this work, the simultaneous interpretive optimization of mobile phase composition and column nature and length, based on a limited number of experimental data, is demonstrated. This approach allows an impressive reduction in the number of different column lengths needed without loss of performance. The massive computation needed to develop the approach was cropped by restricting the maximal analysis time, total pressure and combined column length. Guidelines to model peak position and half-widths with low errors are given, which increase the reliability of the optimizations. Pareto plots, expressed as analysis time versus predicted resolution, assisted in the selection of the best separation conditions. Five ACE columns of different selectivity (C18, C18-HL, AQ, CN and Phenyl), available at two or three different lengths, were used to demonstrate the approach. Isocratic experiments with acetonitrile–water in the 10–20% (v/v) range were developed to model each single column, aimed to analyse a mixture of 15 sulphonamides. No single column was able to succeed in the full separation. In contrast, the comprehensive optimization of mobile phase composition, together with column nature and length, allowed baseline resolution of the mixture in approximately 20 min.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The idea of using mixtures of solvents or stationary phases, to succeed in the separation of challenging samples, appeared early in chromatography (especially in gas chromatography) [1–5]. Garay described the effect in a nice graphical way indicating that “it is similar to the technique of a painter preparing green by mixing cyan and yellow paints, including the modification of the hue by altering the ratio of the two paints” [6]. In the context of chromatography, we would talk of polarity or selectivity, instead of colour: nearly continuous transitions may be possible among the selectivities of the different mixed systems by making different combinations. However, there has not been much development in this regard in liquid chromatography because of several difficulties, such as the

interaction of solvents or stationary phases when directly mixed, which gives rise to complex non-linear retention behaviours [5,7], or the need of dedicated columns filled with a pre-selected mixture of stationary phases or cut to a certain length for a specific application [8]. Therefore, most analyses are performed using a single stationary phase of pre-selected length, and a mobile phase containing a mixture of only two solvents. Also, according to Mao and Carr, “one of the key reasons for the use of a single stationary phase is the long-held belief that the retention and selectivity in liquid chromatography are dominated by the mobile phase” [8].

The non-linear retention behaviour for the combination of solvents and stationary phases is skipped (maintaining the mixed selectivity effects) if the solvents or stationary phases are combined serially, giving rise to the so-called “solvent modulation” [7,9,10], and “serially coupled columns” (“tandem columns” or “stationary phase gradient”) approaches [5,11–16]. These, nevertheless, do not lack of problems, such as the mixture of solvents in the boundary and the stationary phase equilibration in the solvent modulation approach [7], or the appropriate connection of the columns without

* Corresponding author. Tel.: +34 963544005; fax: +34 963544436.
E-mail address: celia.garcia@uv.es (M.C. García-Álvarez-Coque).

changing the stationary phase nature near the column edges and without an additional dead volume between columns [16]. Therefore, the idea of using serial columns has only been reported by a few authors during the last decade [12–24].

In 2006, Nyirey et al. insufflated new life to the idea of using serial columns, through a patent with Bischoff Chromatography (called “POPLink column system”), where stainless steel cartridge segments of different lengths (filled with stationary phases of different nature) were connected through zero-dead volume (ZDV) junctions and inserted into polyether ether ketone (PEEK) holders to maintain them tightly pressed to each other [25]. Recently, we proposed an alternative system to build “serially connected columns”, using ZDV fingertight column couplers screwed directly to conventional columns to maintain them attached without the need of column holders [16]. This is a conventional system that avoids the modification of the columns and an additional dead volume associated to the connections. It is also more versatile, since columns and ZDV couplers from different manufacturers can be easily combined, without the need of columns especially designed to be connected. Also, new stationary phases can be easily added, increasing the realm of possibilities. Another more recent proposal to implement the serially connected columns approach is the use of generic tubing to connect short commercially available columns [17].

In previous work, we developed an approach to get optimal serially coupled columns that considered peak width and asymmetry together with the retention times [16]. This allowed the reliable prediction of chromatograms at several conditions. The approach was based on the experimental information obtained from the single columns, and was designed for the conventional situation reported in the literature, where the column nature and length are optimized, whereas the isocratic mobile phase composition or gradient are pre-selected [13,21,23].

The simultaneous optimization of the mobile phase composition, together with the column nature and length, has been suggested as being ideally the most powerful approach to finely tune the selectivity [13,18]. However, such approach has not been implemented. In this work, we take over this challenge, using five ACE columns of different selectivity and length, and acetonitrile–water mixtures. Isocratic experiments were developed to model each single column, aimed to solve a complex mixture of 15 sulphonamides. The massive computation was cropped by restricting the analysis time, total pressure and combined column length. Different developments are proposed to model peak position and half-widths with low errors, to increase the reliability of the predictions in the optimization process. Pareto plots (analysis time versus predicted peak purity) were used to assist in the selection of the separation conditions.

2. Theory

2.1. Reference columns

The proposed optimization approach is based on modelling the changes of chromatographic parameters (retention time and half-widths), using a limited set of experimental data obtained with the single columns. The prediction of retention and peak shape for each solute eluted from serially coupled columns of total length L requires previous measurement of these parameters for a column length l_r , for each stationary phase selected to build the column combination. This will be called the “reference column”. The length of the reference column should be preferably the longest available in the laboratory for that type of stationary phase, in order to have the maximal accuracy. It can consist of a single segment or

a combination of several segments containing the same stationary phase.

2.2. Prediction of retention for serially coupled columns

The retention time for a solute j eluted from serially coupled columns ($t_{R,j}$) is a linear combination of the extra-column contribution (t_{ext}) and the retention times in each column ($t_{R,i,j}$). Expressed as a function of the retention factors in each column, the following is obtained:

$$\begin{aligned} t_{R,j} &= t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{R,i,j} = t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i}(1 + k_{ij}) \\ &= t_{ext} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i} + \sum_{i=1}^n t_{0int,i}k_{ij} \\ &= t_0 + \sum_{i=1}^n t_{0int,i}k_{ij} \end{aligned} \quad (1)$$

where i is the column index and n the total number of combined columns, $t_{0int,i}$ is the intra-column dead time for each column, t_0 the dead time for the whole column combination, and k_{ij} the retention factor for solute j in the column segment i , which is calculated according to:

$$k_{ij} = \frac{t_{R,i,j} - t_{0exp,i}}{t_{0exp,i} - t_{ext}} \quad (2)$$

In this framework, the experimental dead time would be:

$$t_{0exp,i} = t_{ext} + t_{0int,i} \quad (3)$$

where $t_{0int,i}$ represents the fraction of the dead time exclusively associated to the column of length l_i .

In the absence of additional volumes between the coupled columns, the retention factor for columns of the same nature using the same mobile phase composition would be expected to be the same, independently of the length. Meanwhile, the intra-column dead volume (once subtracted the extra-column contributions) would increase linearly with column length (naturally, as far as the column diameter, support features and stationary phase are the same). Therefore, there is no need to measure the dead time for columns of different lengths. This information can be obtained from the experimental dead time for the reference column. From Eq. (3):

$$t_{0exp,i} = t_{ext} + (t_{0exp,r} - t_{ext}) \frac{l_i}{l_r} \quad (4)$$

where $t_{0exp,r}$ and l_r are the experimental dead time and length for the reference column, respectively.

Note that Eq. (1) isolates the contribution of each column to the retention through each $t_{0int,i}k_{ij}$ term. This outline has the advantage of individualizing the retention behaviour in each column, which is an interesting feature for monitoring the changes in peak shape (see next section), and to optimize gradient elution using serially coupled columns. It should be also commented that, in isocratic elution with properly designed systems with a negligible volume associated to the connections between columns (as is the case of columns connected with ZDV couplers) [16], column order does not introduce significant differences. Therefore, segments containing the same stationary phase can be or not consecutively coupled.

2.3. Modelling of retention as a function of mobile phase composition

The quadratic relationship was adopted to model the dependence of the retention with the concentration of organic solvent in the mobile phase (φ). For solute j :

$$\ln k_{ij}(\varphi) = c_{0,ij} + c_{1,ij}\varphi + c_{2,ij}\varphi^2 \quad (5)$$

where $c_{0,ij}$, $c_{1,ij}$ and $c_{2,ij}$ are fitting parameters, specific for each stationary phase.

The dead time for a column i has been observed to depend not only on the column length, but also slightly on the mobile phase composition (among other reasons, owing to the residual interactions of the dead time marker and the changes in mobile phase viscosity). From Eqs. (3) and (4):

$$t_{0,exp,i}(\varphi, l_i) = t_{ext} + t_{0,int,i}(\varphi, l_i) = t_{ext} + (d_{0,i} + d_{1,i}\varphi + d_{2,i}\varphi^2) \frac{l_i}{l_r} \quad (6)$$

where $d_{0,i}$, $d_{1,i}$ and $d_{2,i}$ are the fitting parameters for the model describing the retention of the dead time marker in the reference column.

2.4. Prediction of peak profiles for serially coupled columns

The significant information for describing a chromatographic peak can be summarized not only by its height and position (t_R), but also by the left (A) and right (B) half-widths (which are most conveniently measured at 10% peak height to account peak asymmetry). Under isocratic elution, the half-widths can be easily predicted with good accuracy through the following global models [26,27]:

$$A = a_0 + a_1 t_R + a_2 t_R^2 \quad (7)$$

$$B = b_0 + b_1 t_R + b_2 t_R^2 \quad (8)$$

In many situations, the global models can be derived considering the experimental chromatographic data (t_R, A, B) of each individual solute or all solutes in the sample altogether (as in this work), eluted at several mobile phase compositions. These models are useful to predict the peak half-widths at other mobile phase compositions. This is possible as far as the partitioning kinetics does not change.

Before going further, it should be indicated that for Gaussian peaks ($A=B$), a unique equation modelling the total peak width can be used instead of Eqs. (7) and (8). It should be also mentioned that specific models are required for each stationary phase. However, there is no need to develop particular models for each column length, since the corresponding half-widths can be derived from the models obtained for the reference columns.

If the aim is predicting the half-widths at a given retention time $t_{R,i}$ for a column of length l_i , the calculation is carried out in three steps:

- (i) The first step consists of calculating the equivalent retention time in the reference column, according to:

$$t_{R,r} = t_{ext} + (t_{R,i} - t_{ext}) \frac{l_r}{l_i} \quad (9)$$

- (ii) Next, the half-widths for the reference column (A_r and B_r) are predicted at time $t_{R,r}$ using Eqs. (7) and (8), previously fitted with the experimental data for the reference column.
- (iii) Finally, the intra-column contribution to the peak half-widths for column i is obtained. For the left half-width:

$$A_{int,i} = A_{int,r} \left(\frac{l_i}{l_r} \right)^{1/2} \quad (10)$$

where:

$$A_{int,r} = (A_r^2 - A_{ext}^2)^{1/2} \quad (11)$$

and similarly for the right half-width, B .

Note that the length correction in Eq. (10) only affects the intra-column contribution. Thus, Eqs. (7) and (8) can be referred straightforwardly to the intra-column half-widths for the reference column (Eq. (11)), which simplifies the prediction process. When the aim is the knowledge of the effect of mobile phase composition on peak shape, the retention time at which the half-widths are predicted (through Eqs. (7) and (8), and subsequent) is obtained from Eq. (5) (or similar) and Eq. (2).

For Gaussian peaks, since the processes that give rise to peak broadening in a column combination are independent, the total width can be obtained considering the additivity of variances. For non-Gaussian peaks, this property is not strictly valid. However, as demonstrated in this work, it can be used to approximate peak profiles (widths and peak asymmetries). Thus, the peak widths for a column combination can be estimated as:

$$w_c^2 = (A+B)_c^2 = (A_{ext} + B_{ext})^2 + \sum_{i=1}^n (A_{int,i} + B_{int,i})^2 \quad (12)$$

where A_{ext} and B_{ext} , and $A_{int,i}$ and $B_{int,i}$ are the extra- and intra-column contributions to the half-widths, respectively.

The prediction of peak asymmetry at 10% peak height ($f_{0.1}$), for the combination of columns $(B/A)_c$, can be also adequately predicted using the following approximation:

$$f_{0.1} = \left(\frac{B_c^2}{A_c^2} \right)^{1/2} = \left(\frac{B_{ext}^2 + \sum_{i=1}^n B_{int,i}^2}{A_{ext}^2 + \sum_{i=1}^n A_{int,i}^2} \right)^{1/2} \quad (13)$$

The peaks in the predicted chromatograms for single columns and column combinations were simulated from the predicted peak parameters (t_R, A and B), using the hybrid linearly modified Gaussian model with exponential decays [28,29]. Peak resolution was evaluated by measuring the area fraction of non-overlapped peak (i.e. peak purity) [30,31]. Since this resolution measurement offers normalized values, global resolution (i.e. global peak purity) was obtained considering all compounds in the chromatogram, as the product of the peak purities for the individual compounds.

2.5. Practical problems in the implementation of serially coupled columns approaches

Given the magnitude of the calculation and computer requirements needed to optimize serially coupled columns, especially when the mobile phase composition is also considered, a feasible implementation requires solving some practical problems. First, it should be noted that columns are marketed in segments of pre-defined lengths; therefore, combined columns cannot be set to any arbitrary length by the user. This unfeasibility contrasts with the selection of levels for scanning the solvent content in a mobile phase, which can be set at any value since it is a continuous factor.

In this work, a minimal value of 1 cm increments in column length was considered for the scanning of separation conditions, whereas the acetonitrile content was stepped in 0.1% (v/v) increments. The architecture of the software developed in our laboratory was carefully designed for quick calculation and save of memory. However, even including in the study a small number of stationary phases, the number of scanned conditions easily exceeded one million, which overloaded the RAM memory. Therefore, three

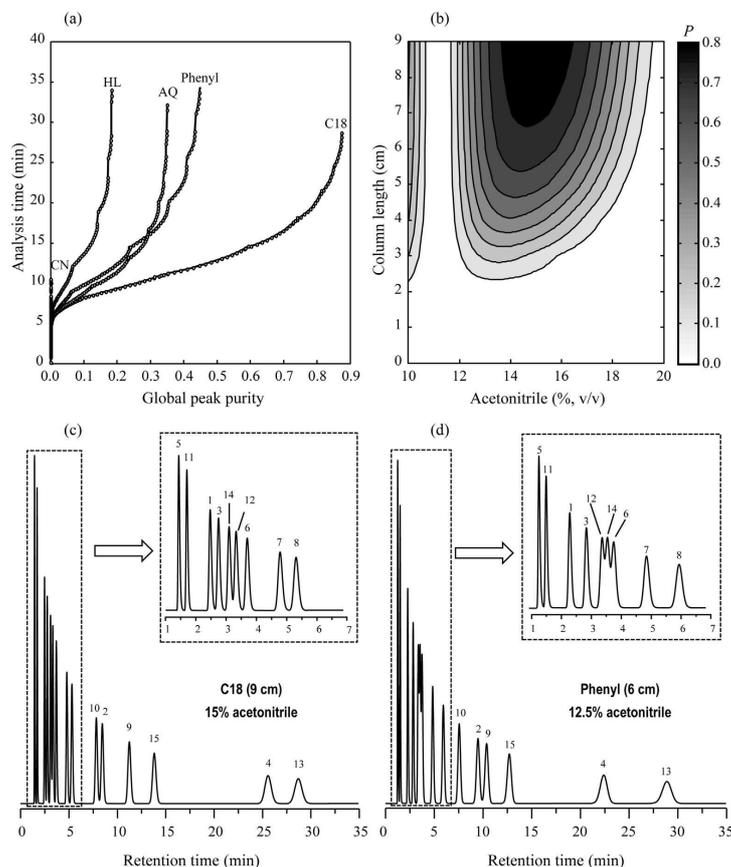


Fig. 1. Optimization of mobile phase composition with single columns: (a) Pareto plots for five ACE columns, (b) resolution contour map for ACE C18, and (c) and (d) optimal chromatograms for two ACE column combinations. Solutes: (1) sulphacetamide, (2) sulphachloropyridazine, (3) sulphadiazine, (4) sulphadimethoxine, (5) sulphaguanidine, (6) sulphamerazine, (7) sulphamethazine, (8) sulphamethizole, (9) sulphamethoxazole, (10) sulphamonomethoxine, (11) sulphaniilamide, (12) sulphapyridine, (13) sulphaquinoxaline, (14) sulphathiazole, and (15) sulphisoxazole.

restrictions were set to assure that only feasible solutions were further processed: analysis times should not be too long (e.g. smaller than 50 min), and total pressure and combined lengths should not exceed a given value (e.g. 275 bar and 15 cm, respectively). The user can change the restrictions and evaluate the calculation volume; once accepted, only the solutions fulfilling the restrictions are processed.

A second problem is the dimensionality of the search space, which makes a conventional representation of results as resolution maps unfeasible. In this regard, the use of Pareto plots with two response targets (maximal peak purity and minimal analysis time) is a good option that allows the classification of the quality of the solutions. The solutions depicted in the plot define the so-called "Pareto front", which gathers those experimental conditions fulfilling the Pareto optimality definition: a solution is considered optimal when it cannot be improved for one of the responses without worsening another (i.e. increasing the

resolution without increasing the analysis time). From this, the chromatographer can select the compromise that best fulfils his/her expectancies. The Pareto plots given in Section 4 show the points defining the fronts exclusively. In this work, in order to expedite the calculation process, the population of experimental conditions was previously cropped according to the restrictions described above. Only those points surviving the restrictions were processed to find out the Pareto front.

3. Experimental

3.1. Reagents

Fifteen sulphonamides were used as probe compounds: sulphacetamide, sulphachloropyridazine, sulphadiazine, sulphadimethoxine, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole, sulphamonomethoxine,

sulphanilamide, sulphapyridine, sulphaquinoxaline, sulphathiazole and sulphisoxazole, all from Sigma (St. Louis, MO). Stock solutions containing 100 µg/ml of each sulphonamide were prepared by dissolving the compounds in a few millilitres of analytical grade ethanol from Scharlab (Barcelona, Spain), assisted by an ultrasonic bath from Elmasonic (Singen, Germany). Before injection, these solutions were diluted up to 20 µg/ml with nanopure water obtained with a Barnstead ultrapure water purification system from Thermo Scientific (Dubuque, IA).

The behaviour of each chromatographic column (retention times and half-widths) was modelled using the data obtained from isocratic experiments with mobile phases containing different concentrations (10, 13, 15, 17 and 20%) of HPLC grade acetonitrile (from Scharlab), and 0.01 M dihydrogen phosphate anhydrous from Sigma (Roedermark, Germany). The pH was set at 3.5 by addition of 0.01 M HCl and 0.01 M NaOH from Scharlab.

3.2. Columns

Several ACE stainless steel columns of different lengths, 4.6 mm internal diameter and 5 µm particle size, and PEEK fingertight column couplers (Aberdeen, Scotland, UK), were used to build the serially coupled columns. The individual columns (stationary phase properties and column lengths available in our laboratory) were: ACE C18 (separation based on hydrophobic interactions, two 2-cm and one 5-cm long), ACE C18-HL (increased retention compared to ACE C18, one 2-cm and one 3-cm), ACE AQ (C18 bonded phase with integral polar functionality, one 2-cm and one 5-cm), ACE CN (cyano phase with increased retention for polar compounds, one 3.5-cm and one 7.5-cm), and ACE Phenyl (phenyl phase with hydrophobicity between C4 and C8 phases, offering alternative selectivity for aromatic, amine and polar compounds, one 2-cm and one 5-cm).

The columns were protected with a Nucleosil C18 guard column (3 cm long, 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA). The probe compounds were always injected after this guard column to measure exclusively the chromatographic behaviour of the column combinations.

3.3. Instrumentation

The chromatographic system was from Agilent (Waldbronn, Germany) and consisted of the following modules: isocratic pump (HP 1200, Model G1310A) at a flow rate of 1 ml/min, autosampler with 2 ml vials (HP 1100, Model G1313A), thermostated column compartment (HP 1100, Model G1316A) set at 25 °C, and multiple-wavelength UV-vis detector (HP 1200, Model G1315C) set at 254 nm for monitoring the probe compounds. Duplicate injections were carried out. The system was controlled by an OpenLAB CDS LC ChemStation (Agilent B.04.03). The routines used to treat the data were developed in MATLAB 2010b from The MathWorks Inc. (Natick, MA).

The mobile phase pH was controlled with a precision of ±0.002 pH units, using a pH-meter from Crison (Model MicropH 2002, Barcelona), and a combined glass electrode from Orion (Model 8102, Barcelona), containing a reference with 3.0 M KCl as salt bridge.

The experimental dead times for each single column ($t_{0exp,i}$) and column combination (t_0) were obtained by injection of 20 µg/ml KBr from Acros Organics (Fair Lawn, NJ), and detection at 210 nm. The extra-column volume ($t_{ext} = 0.137$ min) was also measured by injection of 20 µg/ml KBr, replacing the columns by a ZDV coupler.

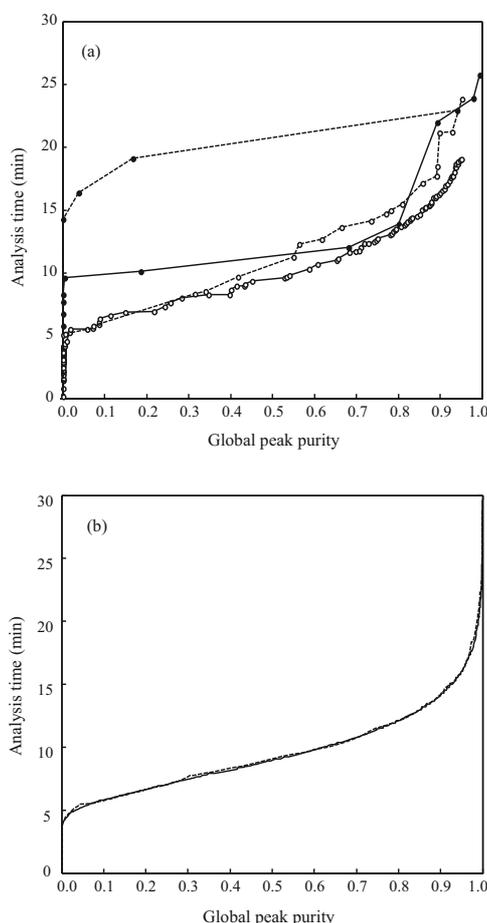


Fig. 2. Pareto plots corresponding to: (a) optimization of serially coupled columns, using a pre-selected mobile phase composition for 10% (●) and 20% acetonitrile (○), and (b) simultaneous optimization of mobile phase composition, and column nature and length (comprehensive scan). In (a) and (b), length increments of 1 cm (—), or only the column lengths available in our laboratory (---), were considered.

4. Results and discussion

The modelling and optimization tools described in Section 2 (some of them designed for this work) were applied to the separation of a set of 15 sulphonamides. In the developed approach, peak width and asymmetries, and both resolution and analysis time are considered. Experimental information on the chromatographic performance (retention and peak shape) in the 10–20% (v/v) acetonitrile range was obtained for the five selected stationary phases (column lengths indicated in parenthesis): ACE C18 (9 cm), ACE C18-HL (3 cm), ACE AQ (5 cm), ACE CN (11 cm), and ACE Phenyl (5 cm). This information was used to model the chromatographic

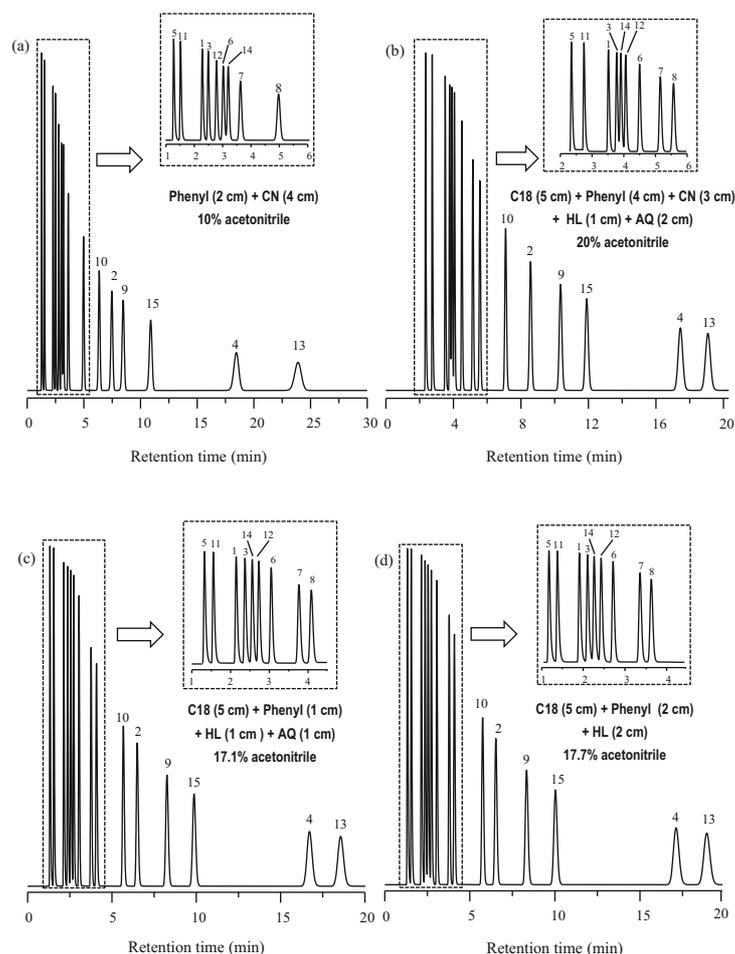


Fig. 3. Chromatograms for optimal ACE column combinations corresponding to a pre-selected mobile phase composition (a) and (b), and simultaneous optimization of mobile phase composition, and column nature and length (c) and (d). Column combinations with length increments of 1 cm were considered in (a)–(c), and only the available lengths in our laboratory in (d). See Fig. 1 for peak identification.

behaviour of the columns, needed to examine the performance of the approaches described in this section.

4.1. Optimization of mobile phase composition using single columns

The separation of the set of sulphonamides was first accomplished using a single column strategy, and considering mobile phases in the range 10–20% acetonitrile. For this purpose, five stationary phases available in our laboratory were tried. The performance of the separation is visualized in Fig. 1a through the representation of Pareto plots, where the best compromise between the global resolution (measured as peak purity) and the

analysis time is shown for columns of different lengths. ACE C18 and ACE CN yielded the best and worst performance, respectively, the latter with serious overlapping among several peaks. However, ACE C18, being the best column, did neither allow full resolution ($P=0.87$). Maximal resolution for the other columns was: ACE Phenyl ($P=0.46$), ACE AQ ($P=0.35$), ACE C18–HL ($P=0.18$), and ACE CN ($P=0$).

Fig. 1b depicts the resolution contour map for ACE C18 in the studied range of mobile phase composition and column length up to 9 cm. Maximal resolution was found in the 14–16% acetonitrile range. The combination of the Pareto plot and contour map gives a full picture of the separation possibilities. Note also that the former does not include information about the mobile phase composition,

whereas the latter lacks of information about the analysis time. However, missed information can be added to the diagrams, which is easier for the contour map.

Fig. 1c and d shows the optimal chromatograms for the two best columns (ACE C18 with 15% acetonitrile, and AC Phenyl with 12.5% acetonitrile). As observed, two or more compounds remain partially unresolved (especially with AC Phenyl), and the analysis times were ca. 30 min. It can be observed that the elution order is different for sulphapyridine and sulphathiazole. Changes in elution order were also observed for other compounds. The elution order for all compounds in ACE AQ and ACE C18-HL was the same as observed for ACE C18 (with some changes in peak distribution). The behaviour for ACE CN was rather different, with several compounds eluting at close times (sulphacetamide, sulphadiazine, sulphamerazine, sulphapyridine, sulphathiazole and sulphamethazine).

4.2. Optimization of column nature and length using a pre-selected mobile phase composition

In previous work, the use of serial combinations of columns of different nature and length, using a pre-selected mobile phase composition, was shown to enhance the resolution and reduce the analysis time for the separation of the mixture of 15 sulphonamides [16]. In this approach, the mobile phase composition can be selected based on previous experience, but usually a mobile phase is taken to give chance to resolve early eluting compounds and get sufficiently small analysis times. In Ref. [16], the separation was carried out using 10% acetonitrile, applying the restrictions indicated in Section 2.5 for the analysis times, pressure and combined column length. Almost full resolution ($P=0.991$) was found for the combination ACE Phenyl (2 cm) + ACE CN (5 cm), with an analysis time of 27 min. However, when we tried a faster mobile phase (17% acetonitrile), similar resolution ($P=0.987$) was obtained with shorter analysis time (19 min) with the column combination: ACE C18 (5 cm) + ACE C18-HL (1 cm) + ACE AQ (2 cm). Both combinations were selected exclusively attending to the resolution.

From these results, it is evident that the pre-selected mobile phase composition is an important parameter to be taken into account. Therefore, we decided to examine the behaviour of the ACE serially coupled columns at several mobile phase compositions in 1% increments in the range 10–20% acetonitrile, with the help of Pareto plots. Fig. 2a depicts these plots for 10% and 20% acetonitrile (the extremes of the studied composition range). The points in the plots correspond to different combinations of stationary phases and column lengths. The points connected by full lines correspond to an optimization scan that considers column length increments of 1 cm (which we will call “comprehensive length scan”), and those connected by dashed lines to the lengths obtained by combining the available columns in our laboratory (“available lengths scan”), for the same stationary phases. In this section, we will consider only the comprehensive length scan. The available lengths scan will be commented in Section 4.5.

The larger number of points in Fig. 1a with respect to Fig. 2a can be explained by the larger number of conditions that fulfil the restrictions. Note that the solvent content in Fig. 1a is increased in 0.1% steps. In contrast, in Fig. 2a only the column nature and length is scanned, and hence, the Pareto front is less crowded. Note that the number of points is larger for the situation where columns in 1 cm increments are used with regard to the optimization using only the available lengths in our laboratory.

The lines in Fig. 2a indicate that 10% acetonitrile yields better resolution with regard to 20% acetonitrile (maximal peak purity of $P \approx 1$ and $P=0.95$, respectively), although at the cost of longer analysis times (this is the reason of the smaller number of points at 10% acetonitrile: a smaller number of combinations fulfil the established restriction of maximal time of 50 min). However,

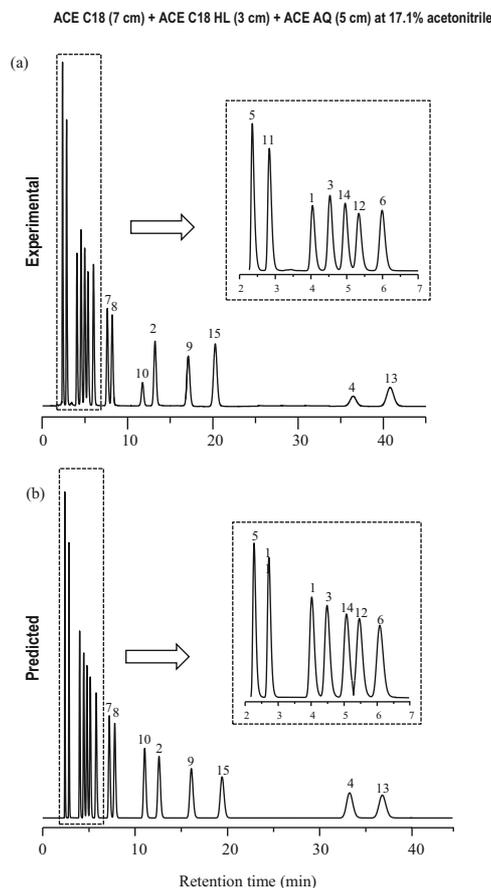


Fig. 4. Experimental and predicted chromatograms for a column combination. See Fig. 1 for peak identification.

intermediate mobile phase compositions will improve the resolution, as will be shown below. A combination giving good performance with 10% acetonitrile (balancing resolution, $P=0.971$, and analysis time ca. 25 min, Fig. 3a), selected from the Pareto plot, corresponded to a combination of only two columns, ACE Phenyl (2 cm) + ACE CN (4 cm), whereas the best performance at 20% acetonitrile corresponded to a rather complex combination: ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (4 cm) + ACE CN (3 cm) + ACE C18 HL (1 cm) + ACE C18 AQ (2 cm) ($P=0.933$, analysis time ca. 20 min, Fig. 3b). Note that 10% acetonitrile requires the use of short columns and stationary phases with intrinsically short retention, which excludes the use of the column with the best separation performance for the mixture of 15 sulphonamides (ACE C18).

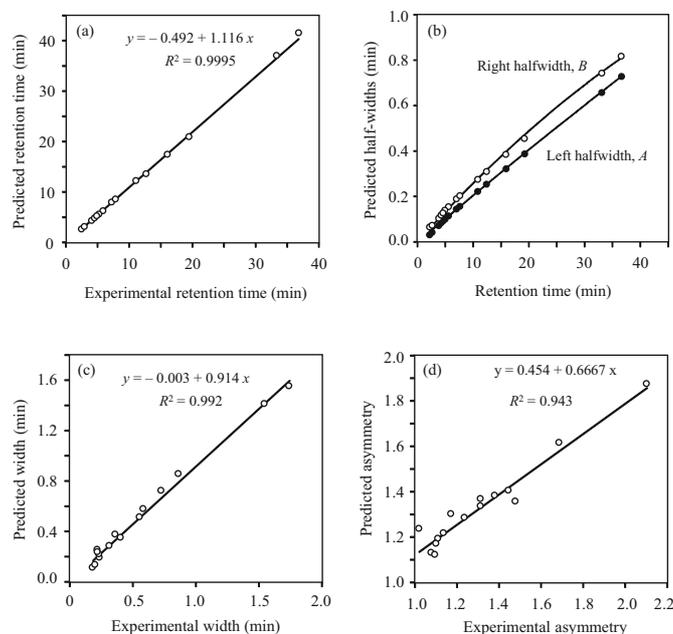


Fig. 5. Accuracy in the prediction of retention and half-widths for the combination ACE C18 (7 cm)+ACE C18 HL (3 cm)+ACE AQ (5 cm) at 17.1% acetonitrile (see Fig. 4): (a) Correlation between predicted and experimental retention times, (b) half-width plots, (c) correlation between predicted and experimental widths, and (d) correlation between predicted and experimental asymmetries.

4.3. Simultaneous optimization of mobile phase composition, and column nature and length

The addition of a second factor in method development increases the possibilities of success of chromatographic separations. As commented in previous section, the mobile phase composition at which the column nature and length are optimized has a decisive influence on the quality of the results. Therefore, it is possible that the pre-selected mobile phase will not yield the best results in terms of resolution and analysis time. It is thus necessary to perform a simultaneous optimization of the three factors: mobile phase composition, and column nature and length. A minimal design for applying this approach only requires two experiments at different mobile phase compositions by column, although some additional experiments are convenient to allow degrees of freedom.

The continuous line in Fig. 2b shows the Pareto front (to increase clarity, the points for the Pareto solutions have not been drawn) for the optimization of the resolution and analysis time, considering combinations of the five ACE columns and acetonitrile in the range 10–20% acetonitrile, in increments of 1 cm column length and 0.1% organic solvent. We will call this the “comprehensive scan”. Note that the shape of the line is rather different to that obtained for 10% acetonitrile in Fig. 2a, but similar to the line for 20% acetonitrile (it moves to smaller analysis times). As will be seen below, combined columns run with this mobile phase composition are close to the optimal one for the comprehensive scan. Another difference between the Pareto fronts for the comprehensive scan (Fig. 2b) and the approach using a pre-selected mobile phase (Fig. 2a) is the

number of points defining the front, which is translated in a smoother curve for the former.

A satisfactory combination balancing resolution and analysis time is shown in Fig. 3c: ACE C18 (5 cm)+ACE Phenyl (1 cm)+ACE HL (1 cm)+ACE AQ (1 cm) at 17.1% acetonitrile ($P=0.982$, analysis time ca. 18.5 min). Completely baseline resolution ($P>0.999$) is also possible with other combinations, but at the cost of longer analysis time.

4.4. Accuracy of the predictions

Figs. 4 and 5a illustrate, for the mixture of 15 sulphonamides, the accuracy of the prediction of retention times, obtained by applying Eqs. (1)–(5). Fig. 4 compares predicted and experimental chromatograms for a column combination. Fig. 5a shows the correlation between predicted and experimental retention times for the peaks in Fig. 4. As observed, the agreement is highly satisfactory (the mean relative error considering all peaks was 1.6%).

The optimization tools described in this work also allowed satisfactory predictions of peak profiles (Section 2.3), which are translated in reliable chromatograms (compare again Figs. 4a and b). The diagram in Fig. 5b depicts the predicted half-widths versus the retention times for the chromatogram in Fig. 4b. The half-width values were obtained from the experimental data measured for the individual reference columns, processed according to Eqs. (7)–(13). As observed, the trends for both right and left half-widths are parabolic. Also, the peaks were moderately tailing ($B/A=1.1–2.2$).

Since the least retained peaks showed the highest asymmetries, the extra-column contributions should be the main origin of the asymmetry.

As indicated in Section 2.3, the prediction of half-widths is carried out assuming the additivity of variances, which is not strictly valid for non-Gaussian peaks. Nevertheless, the predictions of widths (Fig. 5c) and asymmetries (Fig. 5d) were satisfactory.

4.5. Optimization of serially coupled columns using a small number of column lengths

An eventual problem in the implementation of serially coupled columns is the unavailability of a variety of columns with different lengths. In this regard, the "POPLink column system" is an interesting solution exclusively designed for stationary phase optimization. The system includes column segments of 1, 2, 4 and 8 cm, so that 1–15 cm long columns in increments of 1 cm are possible by convenient coupling. Other manufacturers commercialize stainless steel columns, which can be serially coupled through universal PEEK ZDV fingertight couplers, compatible with any standard column [16]. In this case, there are no restrictions with the nature of the stationary phase: any new stationary phase packed in a conventional column can be used. However, the availability of different lengths is poorer or rather expensive.

The lack of columns of appropriate length can affect the quality of the results obtained with the approach that only optimizes the column length and nature, as can be observed in Fig. 2a (dashed lines), where the mobile phase composition was fixed at 10% and 20% acetonitrile. Observe that using a limited number of lengths, the curves are translated upwards, with respect to the comprehensive length scan, and the column combinations in the Pareto front are fewer. This situation was more remarkable at 10% acetonitrile. Interestingly, Fig. 2b shows that when the mobile phase composition is used as a second optimization factor, the results in terms of resolution and analysis time obtained when only a few column lengths are available agree with those found using column lengths in 1 cm increments (i.e. the Pareto plots are practically identical). This means that the inclusion of the mobile phase composition as a second factor in the optimization process compensates the unavailability of column lengths. In the case of study, an appropriate combination balancing resolution and analysis time, using the column lengths available in our laboratory, was ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18 HL (2 cm) at 17.7% acetonitrile ($P=0.981$, analysis time ca. 19.1 min, Fig. 3d). This result should be compared with the result obtained by the comprehensive scan shown in Fig. 3c: ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (1 cm) + ACE C18 HL (1 cm) + ACE AQ (1 cm) and 17.1% acetonitrile ($P=0.982$, analysis time ca. 18.5 min). It should be reminded that in our laboratory 1 cm columns were not available (Section 3.2). However, the found solution with the available lengths has a comparable quality in terms of resolution and analysis time, and the combination is built with only three types of stationary phases.

5. Conclusions

The usual practice in method development consists of selecting first the stationary phase by trial and error, either based on the expected interactions, previous experience or recommendations. Next, convenient continuous factors, such as mobile phase composition, pH or temperature, are optimized in an independent fashion. However, this strategy does not allow taking advantage of the prominent effects produced by changes in the column nature, nor the benefits of combining sequentially columns of different lengths. Indeed, the combined selectivity of several coupled

stationary phases improves the separation expectancies with regard to single columns with specific stationary phases.

In previous work, we reported an approach to optimize serially coupled column systems at fixed mobile phase composition [16]. However, we were missing the effect of the mobile phase composition on the separation performance, which is at least as important as that of the stationary phase, and can be more finely tuned. In this work, the optimization of mobile phase composition, in cooperation with the stationary phase nature and length, is shown as the solution to get a good balance between resolution and analysis time. The data treatment approach developed for this work has proved to find predicted chromatograms that virtually match the corresponding experimental separations. The designed strategy assisted by Pareto plots allows selecting (among the valid solutions) those giving rise to the best compromise between resolution and analysis time, in reasonable computation times.

One drawback of the use of combined columns run with a pre-selected mobile phase composition is the requirement of column segments in a wide variety of lengths. Interestingly, by scanning also the mobile phase composition, only a few column lengths for each stationary phase allow finding an alternative solution very competitive to that obtained with the comprehensive length scan. In other words, solvent content scanning gives rise to an impressive reduction in the number of different column lengths needed in the serially coupled columns approach, without loss of performance, reducing drastically the implementation cost.

The maximal available lengths in our laboratory by coupling columns of the same stationary phase were: ACE C18-HL (5 cm), ACE AQ and ACE Phenyl (7 cm), ACE C18 (9 cm), and ACE CN (11.5 cm). However, it should be observed that the optimized column lengths never reached these values. Therefore, the optimization system selects hybrid columns with shorter segments. Hence, when purchasing a column set, short columns of different nature at least at two lengths multiple of each other (e.g. 2 and 4 cm) are advisable.

Another advantage of the proposed approach is the reduction in the number of segments to be connected, which avoids an undesirable increase in the system dead volume associated to the connections (note that in order to get a given length, several short segments may have to be connected, sometimes several 1 cm segments). The extra experimental work for the simultaneous optimization of mobile phase composition, and column nature and length may be reduced to two experiments at different solvent content by column. This greatly facilitates the application of the serially coupled columns approach for method development.

The proposed serially column coupling approach allows the fine tuning of selectivity, with a remarkable increase in chromatographic resolution and decrease in analysis time. There is a wide range of complex problems that cannot be solved with a single column that will be successfully separated using serially coupled columns using appropriate protocols. The results are in the way to two-dimensional liquid chromatography in terms of resolution, and to gradient elution in terms of analysis time, making use of simpler instrumentation, accessible to most laboratories.

Acknowledgements

This work was supported by Project CTQ2010-16010/BQU (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO of Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks a FPI grant from MINECO.

References

- [1] H.J. Maier, O.C. Karpathy, J. Chromatogr. 8 (1962) 308.
- [2] G.P. Hildebrand, C.N. Reilly, Anal. Chem. 36 (1964) 47.

- [3] J.L. Glajch, J.C. Gluckman, J.G. Charikofsky, J.M. Minor, J.J. Kirkland, J. Chromatogr. 318 (1985) 23.
- [4] J.V. Hinshaw, L.S. Ettore, Chromatographia 21 (1986) 561.
- [5] H.J. Issaq, J. Gutierrez, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 2851.
- [6] F. Garay, Chromatographia 51 (2000) 108.
- [7] J.H. Wahl, V.L. McGuffin, J. Chromatogr. 485 (1989) 541.
- [8] Y. Mao, P.W. Carr, Anal. Chem. 72 (2000) 110.
- [9] J.H. Wahl, C.G. Enke, V.L. McGuffin, Anal. Chem. 62 (1990) 1416.
- [10] J.H. Wahl, C.G. Enke, V.L. McGuffin, Anal. Chem. 63 (1991) 1118.
- [11] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, J. Chromatogr. A 691 (1995) 171.
- [12] E. Benická, J. Krupčík, J. Lehotay, P. Sandra, D.W. Armstrong, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 28 (2005) 1453.
- [13] Sz. Nyiredy, Z. Szűcs, L. Szepesy, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 122.
- [14] B. Sreedhar, A. Seidel-Morgenstern, J. Chromatogr. A 1215 (2008) 133.
- [15] M. Zedda, J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8910.
- [16] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 94.
- [17] K. Chen, F. Lynen, R. Szucs, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Analyst 138 (2013) 2914.
- [18] M. Kühnle, J. Rehbein, K. Holtin, B. Dietrich, M. Gradl, H. Yeman, K. Albert, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1655.
- [19] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 279.
- [20] F.M. Matysik, U. Schumann, W. Engewald, Electroanalysis 20 (2008) 98.
- [21] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Chromatographia 69 (2009) 609.
- [22] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D.Y. Chen, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 764.
- [23] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Anal. Chem. 82 (2010) 1733.
- [24] D. Cabooter, G. Desmet, J. Chromatogr. A 1219 (2012) 114.
- [25] K. Bischoff, S. Nyiredy, Z. Szűcs, Elements for separating substances by distributing between a stationary and a mobile phase and method for the production of a separating device, WO/2006/125564; PCT/EP2006/004744, 2006.
- [26] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17.
- [27] M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1786.
- [28] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, Anal. Chem. 69 (1997) 3822.
- [29] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146.
- [30] S.J. López-Grío, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187.
- [31] M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 125.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns. Part I: Single linear gradients[☆]



C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió*, M.C. García-Alvarez-Coque

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2014
 Received in revised form 29 April 2014
 Accepted 4 May 2014
 Available online 14 May 2014

Keywords:

Serially-coupled columns
 Stationary phase optimisation
 Gradient optimisation
 Single linear gradients
 Peak shape prediction
 Sulphonamides

ABSTRACT

A mixture of compounds often cannot be resolved with a single chromatographic column, but the analysis can be successful using columns of different nature, serially combined through zero-dead volume junctions. In previous work (JCA 1281 (2013) 94), we developed an isocratic approach that optimised simultaneously the mobile phase composition, stationary phase nature and column length. In this work, we take the challenge of implementing optimal linear gradients for serial columns to decrease the analysis time for compounds covering a wide polarity range. For this purpose, five ACE columns of different selectivity (three C18 columns of different characteristics, a cyano and a phenyl column) were combined, aimed to resolve a mixture of 15 sulphonamides using acetonitrile–water gradients. A gradient predictive system, based on numerical integration, was built to simulate chromatograms under linear gradient profiles. Two approaches were compared: the optimisation of the combination of columns pre-selecting the gradient profile, developed by De Beer et al. (Anal. Chem. 82 (2010) 1733), and the optimisation of the gradient program after pre-selecting the column combination using isocratic elution, developed for this work. Several refinements concerning the gradient delays along the solute migration and peak half-width modelling were included to improve the realism of the predictions. Pareto plots (expressed as analysis time versus predicted global resolution) assisted in the selection of the best separation conditions. The massive computation time in the gradient optimisation, once the column combination was optimised, was reduced to ca. 3 min by using genetic algorithms.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent advances in column technology have allowed the development of successful functional hybrid column systems, built up by serial coupling of columns containing different stationary phases. The combination of separation mechanisms through columns connected in series is a simple option to improve the resolution, since the overall selectivity will be usually better compared to any single column (i.e. single stationary phase). Even poor separations with a variety of different single columns may succeed when these are combined. Basic requirements for the success of the approach are the proper connection of the columns, with zero dead volume (ZDV) junctions, and a robust and practical system for binding the columns.

In 2005, under a patent, Bischoff Chromatography commercialised a new system of serially-coupled columns, under the trademark “PopLink columns” [1], giving new life to the idea of tuning the selectivity by combining different stationary phases [2,3]. The “PopLink columns” kit consists of PEEK holders that maintain tightly pressed stainless steel cartridges of several lengths differing in one cm, filled with stationary phases of different nature. Recently, we demonstrated the possibility of using with good results conventional short columns linked with ZDV fingertight column couplers, screwed directly to the columns without the need of external holders [4]. This approach allows coupling any already existing or newly branded conventional column available in the market. Chen et al. have also proposed assembling conventional short columns with standard stainless steel tubing of 105 mm length and 0.12 mm i.d. [5]. These authors reported poorer predictions with this system compared to the “PopLink columns”, and suggested shorter tubing or one-piece couplers to improve the predictions by decreasing the void volume in the connections.

The “PopLink columns” approach was developed fixing the mobile phase composition and optimising the combination of column segments (nature and length), based on the PRISMA approach

[☆] Presented at the XIII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECYTA2013), 8–11 October 2013, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Islands, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 963544014; fax: +34 963544436.
 E-mail address: jrtorres@uv.es (J.R. Torres-Lapasió).

[6]. We have also developed, on a different basis, reliable algorithms to optimise serially-coupled columns [4,7]. We first improved the predictions of chromatographic resolution by including an algorithm to predict the peak profiles (width and asymmetry), with results virtually matching the experimental separations [4]. In a second contribution, we developed an approach that optimised simultaneously the mobile phase composition and the stationary phase nature and length [7], which is the most powerful approach to finely tune the selectivity with serially-coupled columns in isocratic elution.

A drawback of the optimisation approach run at fixed mobile phase composition is the requirement of column segments of multiple lengths to achieve an extensive range of combinations of stationary phases, from which the best is selected. Interestingly, the inclusion of the mobile phase composition in the optimisation (which can be finely tuned) reduces the number of column lengths needed, without loss of performance. This has evident consequences in the practical implementation of the serially-coupled columns approach [7].

The initial development of the approach associated to isocratic elution [3,4,6,7] is not surprising, attending to the attractive results that perform closer to two-dimensional liquid chromatography in terms of resolution, and to gradient elution in terms of analysis time, using a simpler and more accessible instrumentation to most laboratories. The optimisation approach implemented with isocratic elution is also relatively simple, especially if it is only based on the prediction of retention. However, mixtures of compounds differing significantly in their polarity require still a gradual increase in the elution strength, in order to obtain practical analysis times and an adequate distribution of peaks along the separation space. This is usually achieved through the application of gradients of organic solvent. Therefore, in spite of the complexity of implementing gradients with serially-coupled columns, several authors have been interested in its development.

Initially, a multi-step isocratic methodology was proposed for the coupled columns [8,9]. The approach reported by De Beer et al. [9] was inspired in the “PopLink columns” optimisation [6], and can be summarised as follows: (i) after analysing the solute mixture using a linear gradient with a conventional single column, solutes were grouped according to their polarity; (ii) independent optimisations at fixed mobile phase composition (isocratic elution), selected from the linear gradient, were then developed to obtain the best column combination for each group of solutes; (iii) among these column combinations, a common combination for all groups was selected; (iv) finally, a multi-step isocratic gradient was built using the selected common column combination and the particular mobile phase composition for each group of solutes.

In a further development, also based on the “PopLink columns” principle, a gradient function (with single or multiple linear segments) was pre-selected, the optimisation being restricted to the selection of the best column combination (nature and length) [10–12]. In order to improve the reliability of the predictions, a linear relationship between the peak standard deviation and the retention time (considering Gaussian chromatographic peaks) was further considered to improve the prediction of peak profiles [5].

In this work, a further step in the systematic method development for serially-coupled columns is proposed: the optimisation of single linear gradient programs. In Part II of this work, multi-linear gradients including isocratic steps will be addressed. Gradient simulations are enhanced considering the formation of skewed peak profiles along the elution through the serially-coupled columns. Several refinements concerning the gradient delays along the solute migration are also included in the approach, which largely improve the realism of the predictions.

2. Theory

In order to optimise rationally serially-coupled columns using gradient elution, the first step is modelling the retention behaviour for each compound in the sample as a function of the solvent content (φ , usually expressed as percentage v/v). It is also convenient to have a system to forecast peak profiles in order to enhance the reliability of the predictions. Predictions of retention time in isocratic or gradient elution, for a given solute in a column assembly, require combining the predictions attained for each column segment.

2.1. Isocratic elution for serially-coupled columns

When several columns are serially coupled, the total retention time for a solute j ($t_{R,j}$) is a linear combination of the extra-column contribution (t_{ext}) and the retention times for each column i ($t_{R,ij}$) in the assembly [4,6]:

$$t_{R,j} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^{nc} t_{R,ij} = t_{\text{ext}} + \sum_{i=1}^{nc} t_{0\text{int},i}(1 + k_{ij}) = t_0 + \sum_{i=1}^{nc} t_{0\text{int},i}k_{ij} \quad (1)$$

where nc is the total number of combined columns, $t_{0\text{int},i}$ the intra-column dead time for each coupled column i (i.e. the column segment dead time without considering the extra-column contribution), t_0 the total dead time for the whole assembly, and k_{ij} the retention factor for solute j in the column segment i , which is invariant with the column length and should be calculated according to:

$$k_{ij} = \frac{t_{R,ij} - t_{0\text{exp},i}}{t_{0\text{exp},i} - t_{\text{ext}}} \quad (2)$$

$t_{0\text{exp},i}$ being the experimental dead time for column i . The final expression in Eq. (1) including the $t_{0\text{int},i}k_{ij}$ terms has the advantage of being directly related to the solvent content for each column segment. In this work, we have used the quadratic model to describe the retention:

$$\log k_{ij}(\varphi) = c_{0,ij} + c_{1,ij}\varphi + c_{2,ij}\varphi^2 \quad (3)$$

where $c_{0,ij}$, $c_{1,ij}$ and $c_{2,ij}$ are coefficients with particular values for each column i and solute j . The individual predictions are initially performed at the length at which the models were obtained (i.e. a reference column with length $l_{r,i}$), and should be scaled up (or down) to the length of the target segment i (l_i) through the column dead time ($t_{0\text{exp},i}$).

The dead time has been observed to depend not only on the column length, but also slightly on the mobile phase composition, owing to changes in the solvent viscosity and the residual interactions of the dead time marker with the stationary phase, among other reasons. In this work, the following equation is used to estimate the dead time for a column of length l_i :

$$t_{0\text{exp},i}(\varphi, l_i) = t_{\text{ext}} + t_{0\text{int},i}(\varphi, l_i) = t_{\text{ext}} + (d_{0,i} + d_{1,i}\varphi + d_{2,i}\varphi^2) \frac{l_i}{l_{r,i}} \quad (4)$$

where $d_{0,i}$, $d_{1,i}$ and $d_{2,i}$ are the fitting parameters for describing the variations in the intra-column dead time with the mobile phase composition in a reference column of the same type (and length $l_{r,i}$). Other details can be found in Ref. [7].

The peak profiles were predicted considering the relationships between the left (A) and right (B) half-widths and the retention times. For column i and solute j [13,14]:

$$A_{ij} = a_{0i} + a_{1i}t_{R,ij} + a_{2i}t_{R,ij}^2 \quad (5)$$

$$B_{ij} = b_{0i} + b_{1i}t_{R,ij} + b_{2i}t_{R,ij}^2 \quad (6)$$

The protocol to predict the peak half-widths for a column of length l_i was carried out as detailed in Ref. [7]. The peaks in the predicted chromatograms for single columns and column combinations were simulated from the predicted peak parameters (t_R , A and B), using hybrid linearly-modified Gaussian models with exponential decays [15,16], and normalised areas.

2.2. Gradient elution for serially-coupled columns

2.2.1. Description of retention

2.2.1.1. Fundamental equation for gradient elution. Gradient elution is the tool that gives answer to the problem of achieving exponentially greater separations between peaks along a chromatogram, when the mixture involves solutes in a wide polarity range, and isocratic elution is used. The literature gathers several approaches to outline gradient elution, generally based on the resolution of the following integral equation [17]:

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \quad (7)$$

which has been called “fundamental equation for gradient elution”. In Eq. (7), t_g is the retention time observed in gradient elution, k the instantaneous retention factor, $\varphi(t)$ the gradient program, and t the time measured at the column inlet corresponding to the gradient composition affecting the solute. The target variable is t_g , which as observed, is found in the upper integral limit. In order to perform the integral (either analytically or numerically), the solvent content at each time should correspond to the location where the solute is inside the column. For this reason, it should be considered that, as the solute is moving along the column, a gradient measured at the column inlet needs a progressively longer time to reach the solute. This effect is accounted by using $t_g - t_0$ instead of t_g in the upper limit of the integral.

2.2.1.2. Numerical integration for serially-coupled columns. The analytical solution of Eq. (7) is only possible in simple cases, such as the elution from a single column under linear gradients when the retention of solutes is described with linear models [17,18]. The case of serially-coupled columns is much more complex, making the analytical solution unfeasible, even for the simplest case involving only two columns, a linear retention model and a linear gradient. It should be considered that the time needed to cross a given column, that is, its contribution to the total retention time, depends on the composition at which the solute left the previous column(s). Also, the retention model and the time interval at which it holds are specific of each solute and column. Thus, the analytical solution of Eq. (7) would require solving the integral for each column once the solution for the former column has been obtained. For this reason, it is not possible to solve analytically the integral equation for the whole assembly in a single step. The situation becomes even more complex with multi-linear gradients.

The numerical integration, which gives rise to discontinuous prediction algorithm [19] is, in any case, a more practical and flexible solution for the fundamental equation for gradient elution. It is based on the fact that when a solute migrates under gradient elution, its movement is determined by the organic solvent content in the microenvironment of the solute band. If the band is inspected in a small enough time interval, the variation in organic solvent content results negligible, and the solute may be considered to migrate as if the elution mode were isocratic, at least for a short time. This allows splitting Eq. (7) in a series of integrals. For a single column i and solute j :

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_1 - t_{01}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_1 - t_{01}}^{t_2 - t_{02}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \dots + \int_{t_{n-1} - t_{0n-1}}^{t_n - t_{0n}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_n - t_{0n}}^{t_{g,j} - t_{0i}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \quad (8)$$

Each term in the summation is associated to an isocratic step along the gradient program ($\varphi(t)$), being related to the column fraction migrated along the time increment covered by the integrals. In Eq. (8), t_1, t_2, \dots, t_n represent the divisions in which the gradient time has been split, whose magnitude can be set attending to the instrument sensitivity in the generation of gradients of organic solvent (e.g. 0.1%), or alternatively, as small enough time increments (e.g. the accuracy that is required in the prediction of the retention times, such as 0.01 min). The time needed (measured from the column inlet) for the gradient to reach the solute in each infinitesimal column section is given by the delay terms $t_{01}, t_{02}, \dots, t_{0n}$, which are specific for each column segment and solute (for simplicity the subindexes i and j have been dropped). The gradient retention time ($t_{g,j}$) of a solute j is the time t_n associated to the term at which the sum in Eq. (8) matches t_{0i} for column i . This treatment is valid for any type of gradient (since the time domain is split in isocratic sub-domains), and for non-integrable retention models.

In practice, the gradient program reaches the column inlet after a delay associated to the instrument tubing, namely the dwell time (t_d), during which the elution is isocratic. This delay has been added in Eq. (8). Besides the dwell time, as commented, there is another delay produced by the progressively longer time that the gradient front needs to reach the solute, which should be accounted in the limits of each term in the numerical integration. Since $k_{ij}(\varphi_n)$ can be considered constant in each step (e.g. the central value in the interval), the solution of the integration is the following:

$$t_{0i} \approx \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{t_1 - t_d}{k_{ij}(\varphi_1)} + \frac{t_2 - t_1}{k_{ij}(\varphi_2)} + \dots + \frac{t_{g,j} - t_n}{k_{ij}(\varphi_n)} \\ = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_1)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_2)} + \dots + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_n)} \quad (9)$$

where it has been considered that $t_{0n} \approx t_{0n-1}$ in each term (see also Eq. (8)), and $k_{ij}(\varphi_n)$ is the retention factor in the solute neighbourhood, associated to each $\varphi(t_n - t_{0n})$ term. The summations involved in Eq. (9) were performed using trapezoidal integration.

Eq. (8) is also valid for the first column in a column assembly. For further columns:

$$t_{0i} = \int_{t_{p,j}}^{t_1 - (t_{p,j} + t_{01})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_1 - (t_{p,j} + t_{01})}^{t_2 - (t_{p,j} + t_{02})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \dots + \int_{t_{n-1} - (t_{p,j} + t_{0n-1})}^{t_n - (t_{p,j} + t_{0n})} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} + \int_{t_n - (t_{p,j} + t_{0n})}^{t_{g,j} - (t_{p,j} + t_0)} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \quad (10)$$

The t_1, t_2, \dots, t_n and $t_{01}, t_{02}, \dots, t_{0n}$ times have the same meaning as for the first column, while $t_{p,j}$ is the gradient time of solute j when it reaches the inlet of the current column, after crossing all previous columns (one or several). Again, in order to simplify the notation in Eq. (10), the ij subindex has been dropped for the t_{0n} variables. The $\varphi(t)$ function describes the gradient composition at the inlet of the first column.

As commented, the column dead time depends on the solvent content (Eq. (4)). This implies that, as the solute is migrating, the solvent content is changing, and accordingly, the dead time should be changing as well. Taking this into account, for simplicity, we took the decision of matching the sum of terms in Eqs. (8)–(10) to the dead time value predicted for the instantaneous composition when the solute reaches the column outlet.

The gradient retention time for the column assembly is a linear combination of the retention times associated to each column, to which the extra-column contributions are added:

$$t_{g,j} = t_{ext} + \sum_{i=1}^{nc} t_{g,ij} \quad (11)$$

All previous calculations should be carried out without including the extra-column contributions, since these are a source of error. The extra-column contributions should be added at the end of the process, once the retention time associated to the transit through the columns has been calculated.

In the serially-coupled columns approach using gradient elution, the retention model used in the numerical integration needs to be monitored and adapted to the column where the solute is located at each time (i.e. the change of column should be accounted to perform the integration). When the cumulative sum in Eqs. (8)–(10) equals the column dead time (t_{0i}), the solute has reached the outlet of that column. From this point, if the solute enters a new column, the $k_{ij}(\varphi)$ function for the new column should be adopted, and a new integral equation should be solved, using as cumulative dwell time ($t_{p,ij}$) the sum of the instrument dwell time plus the sum of the dead times for the previous columns. Owing to the different speeds of solutes, column transitions may happen at different times for each solute, and consequently, will be associated to different stationary phases.

The explanations given above indicate that there are several kinds of delay that should be known to calculate the real solvent content at the solute location: (i) the extra-column (or instrumental) delay (i.e. the dwell time), (ii) the delays generated by the transit through previous columns (i.e. the sum of the dead times for those columns), and (iii) the intra-column (or internal) delay (i.e. the delay associated to the distance migrated by the solute inside the column where the solute is eluting at a given time). These delays force to correct the solvent content in the corresponding term in the integral equation for each column.

2.2.2. Prediction of peak profiles and peak resolution

Gradient profiles can be predicted using the Jandera's approximation [20], which states that the gradient peak width is the peak width if the solute were eluted isocratically at the instantaneous composition when the solute maximum reaches the column outlet. Accordingly, the peak width was calculated by applying Eqs. (5) and (6), setting as t_R the column gradient retention time. Thus, the isocratic treatment for calculating peak widths and asymmetries for combinations of columns in isocratic elution can be easily adapted to gradient elution. The extra-column contributions should be subtracted before summing the contributions of each segment, and added at the end of the process.

Peak resolution was evaluated by measuring the non-overlapped peak area fraction (i.e. peak purity), which is a normalised measurement [19,21]. The global resolution was obtained by considering all compounds in the chromatogram, as the product of the peak purities for the individual compounds.

3. Experimental

3.1. Reagents

The analysed mixture contained a set of 15 sulphonamides: sulphacetamide, sulphachloropyridazine, sulphadiazine, sulphadimethoxine, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole, sulphamonomethoxine, sulphaniilamide, sulphapyridine, sulphaquinoxaline, sulphathiazole and sulphisoxazole, purchased from Sigma (St. Louis, MO). The mixture was made by mixing aliquots of solutions for each

sulphonamide, which were prepared by dissolving the drugs with a small amount of methanol and dilution with water. The concentration of each sulphonamide in the injected solutions was 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The behaviour of each chromatographic column (retention times and half-widths) was modelled using the data obtained from isocratic experiments with mobile phases containing different concentrations (5, 10, 13, 15, 17, 20 and 30%, v/v) of HPLC grade acetonitrile (from Scharlab, Barcelona, Spain), and 0.01 M anhydrous dihydrogen phosphate from Sigma (Roedermark, Germany). The pH was set at 3.5 by addition of 0.01 M HCl and 0.01 M NaOH from Scharlab, and controlled using a pH-metre from Crison (Model MicropH 2002, Barcelona), and a combined glass electrode from Orion (Model 8102, Barcelona) containing Ag/AgCl reference electrodes with 3.0 M KCl aqueous solution as salt bridge.

3.2. Chromatographic instrument and column assemblies

The HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) was equipped with a quaternary pump (HP 1200, Model G1310A), a thermostated column compartment (HP 1100, Model G1316A), an autosampler (HP 1100, Model G1313A) with 2 ml vials, and a UV-visible detector (HP 1200, Model G1315C). The injection volume was 20 μl . The flow-rate was 1 ml/min, the temperature was controlled at 25 °C, and the detector was set at 254 nm. Duplicate injections were carried out. The system was controlled by an OpenLAB CDS LC ChemStation (Agilent B.04.03). The routines used to treat the data were developed in MATLAB 2013b from The MathWorks Inc. (Natick, MA).

Several ACE stainless steel columns of different lengths (4.6 mm internal diameter and 5 μm particle size), and PEEK fingertight column couplers (Aberdeen, Scotland, UK), were used to build the serially-coupled columns. The nature and available lengths of the individual columns were: ACE C18 (separation based on hydrophobic interactions; two 20-mm and one 50-mm long segments), ACE C18-HL (with increased retention compared to ACE C18; one 20-mm and one 30-mm), ACE C18-AQ (with an embedded polar functionality; one 20-mm and one 50-mm), ACE CN (cyano phase with increased retention for polar compounds; one 35-mm and one 75-mm), and ACE Phenyl (phenyl phase with hydrophobicity between C4 and C8 phases, offering alternative selectivity for aromatic, amine and polar compounds; one 20-mm and one 50-mm).

The experimental dead times for each single column ($t_{0,exp,i}$) and column combination (t_0) were obtained by injection of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KBr from Acros Organics (Fair Lawn, NJ), and detection at 210 nm. The extra-column volume ($t_{ext} = 0.137$ min) was also measured by injection of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KBr, replacing the columns by a ZDV coupler. All samples were filtered through Nylon membranes. Other details can be found in Refs. [4,7].

4. Results and discussion

4.1. Accuracy of the predictions

The interpretive optimisation of any chromatographic system relies on the quality of the predictions of the modelling approach. Sections 2.1 and 2.2 describe the theory for the prediction of retention and peak profile carried out in this work, using coupled columns in the isocratic and gradient modes, respectively. In isocratic elution, the prediction of retention time is rather simple, since it is based on linear combinations of retention times and dead times. The complexity of the predictions is remarkably increased in gradient elution. In contrast, the prediction of peak profiles (width and asymmetry) is similar in both elution modes, once the retention times have been calculated.

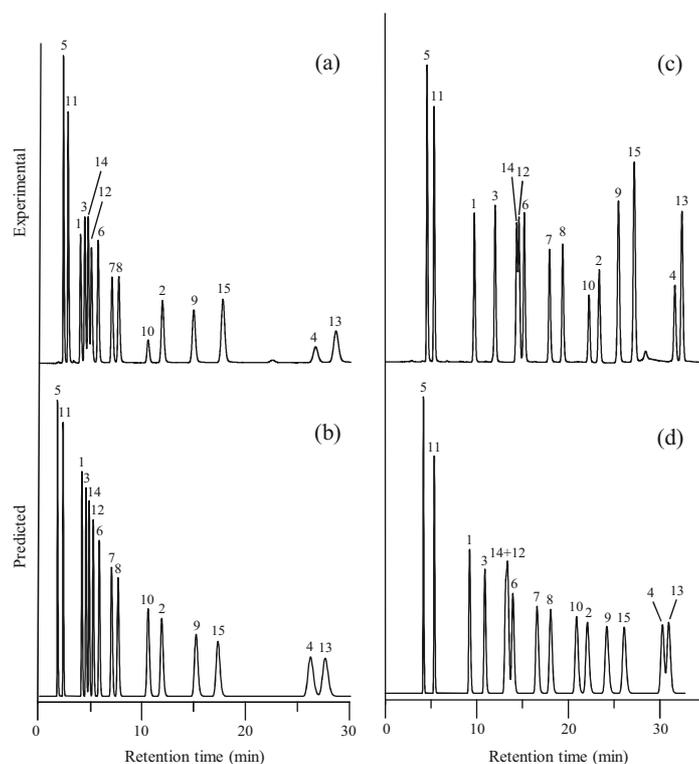


Fig. 1. Chromatograms obtained with the ACE serially-coupled columns using linear gradient elution: (a, c) Experimental chromatograms, and (b, d) predicted chromatograms. Column combinations: (a, b) ACE C18 (70 mm) + ACE C18-HL (30 mm) + ACE C18-AQ (50 mm), and (c, d) ACE C18-HL (30 mm) + ACE C18 (20 mm) + ACE C18-AQ (50 mm) + ACE Phenyl (50 mm) + ACE CN (50 mm). Gradients: (a, b) 17–21% acetonitrile in 30 min, and (c, d) 5–45.5% acetonitrile in 50 min. Solutes: (1) sulphacetamide, (2) sulphachloropyridazine, (3) sulphadiazine, (4) sulphadimethoxine, (5) sulphaguandinine, (6) sulphamerazine, (7) sulphamethazine, (8) sulphamethizole, (9) sulphamethoxazole, (10) sulphamonomethoxine, (11) sulphamylamide, (12) sulphapyridine, (13) sulphaquinoxaline, (14) sulphathiazole, and (15) sulphisoxazole.

All basic measurements to obtain information about the chromatographic performance (retention and peak profile) for the five selected stationary phases were made on columns with the following lengths (indicated in parenthesis): ACE C18 (90 mm), ACE C18-HL (30 mm), ACE C18-AQ (50 mm), ACE CN (110 mm), and ACE Phenyl (50 mm). In this work, seven isocratic experiments by column were carried out for each solute in the 5–30% acetonitrile range to model the retention times and peak profiles. The regression coefficients for the fitted retention models were usually highly satisfactory (see Electronic Supplementary Material).

Fig. 1 illustrates, for the mixture of 15 sulphonamides separated with the coupled ACE columns, the accuracy of predictions in gradient elution. The selected separation conditions show a rather good separation of the probe compounds, but the conditions were not optimal. The solvent content range in the gradient profile was 17–21% and 5–45.5% acetonitrile (Fig. 1a and b, and 1c and d, respectively). As observed, the agreement between experimental and predicted chromatograms is highly satisfactory. The mean relative prediction error for the retention times was 2.2% and 3.7%, respectively.

In Fig. 2, the predicted and experimental retention times for the above separation conditions are correlated (the determination

coefficients were $r^2 = 0.9995$ and 0.9989). The perfect alignment of the points in the correlation plot indicates that the predictions of selectivity will be highly reliable, in spite of minor biases in retention times. These results should be compared with previous work on the optimisation of coupled columns using gradient elution [11]. In that work the authors, in order to improve the accuracy of retention time predictions, proposed an empirical calibration method, which based on the deviations obtained for two selected solutes, the retention times of the predicted chromatogram were corrected. We did not apply such kind of correction.

For comparison, Fig. 3 illustrates the experimental and predicted chromatograms obtained with the ACE serially-coupled columns using isocratic conditions, where an excellent agreement is also observed. In both isocratic and gradient elution, the prediction of peak profiles is also satisfactory, which is translated in reliable chromatograms. To evaluate the results, note that the peaks in the predicted chromatograms are normalised, and the prediction of peak half-widths is carried out by assuming the additivity of variances, which is not strictly valid for non-Gaussian peaks.

Next, we compare two different approaches: the optimisation of the combination of serially-coupled columns for a pre-selected gradient (developed by De Beer et al.), and the optimisation of the

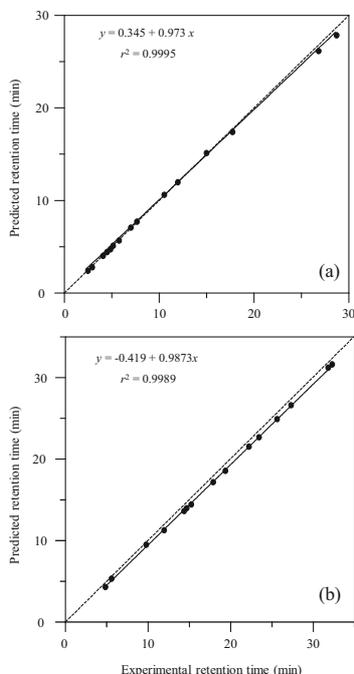


Fig. 2. Accuracy in the prediction of the retention behaviour with the ACE serially-coupled columns, using linear gradient elution. The correlation plot in (a) corresponds to Fig. 1a and b, and the correlation plot in (b) to Fig. 1c and d.

gradient profile for a pre-selected combination of columns (developed in this work).

4.2. Pre-selection of a gradient

Following the initial idea of SOS-LC (stationary phase optimised selectivity liquid chromatography), some authors [9,11,12] optimised the column combination that offers maximal performance using a gradient profile previously selected. We applied first our predictive system to this approach. However, instead of using the POPLink column system, we coupled the described set of conventional columns in series using ZDV connectors. Another difference with the POPLink system is that this allows implementing the column length by adding column segments of one cm for each stationary phase, while there were only a few column lengths available in our laboratory (see Section 3.2).

The implementation of the optimisation approach for coupled columns, where the gradient profile is pre-selected and the optimal combination of columns searched, is relatively simple, but has the drawback that the selected gradient may not be the best. In order to select the applied gradient, we considered the optimal isocratic solvent composition for each stationary phase available in our laboratory (optimal acetonitrile contents are given in parenthesis): ACE C18-HL (14.25%), ACE C18 (14.75%), ACE C18-AQ (8.0%), ACE Phenyl (12.5%) and ACE CN (7.25%). Attending to these compositions, two gradient conditions were selected: a gradient range between 5 and 17% acetonitrile, run in gradient times $t_G = 60$ min

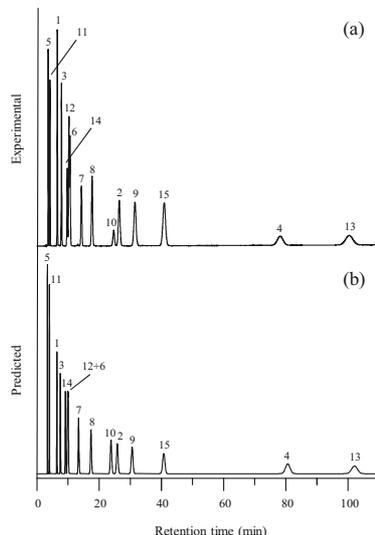


Fig. 3. Chromatograms obtained with the ACE serially-coupled columns using isocratic elution. (a) Experimental chromatogram, and (b) predicted chromatogram. Column combination: ACE C18 (50 mm)+ACE Phenyl (50 mm)+ACE CN (75 mm). Mobile phase composition: 10% acetonitrile. See Fig. 1 for solute identification.

or 40 min, which guaranteed that all solutes were eluted before reaching the t_G value. In order to examine the possibilities of the approach, a third gradient profile in the range 5–30% acetonitrile in 60 min was also predicted.

It should be commented that a systematic search of column combinations, including permutations among columns, was carried out. Also, both resolution and analysis time were optimised. However, the existence of opposite aims (i.e. maximal resolution and minimal analysis time) implies that there is no unique solution to the problem, but a population of solutions. This can be shown as a plot depicting the solutions as a function of the aims (i.e. a Pareto plot [22]). A solution is considered optimal according to the Pareto definition when it cannot be improved for one response without worsening another response. Pareto solutions altogether define the so-called “Pareto front”, where the chromatographer can make his/her choice among several solutions. The Pareto plots shown in this work depict only the front.

Fig. 4 shows the Pareto fronts for the three pre-selected gradients. As observed, the quality of the separation depends on the applied gradient. Also, the number of solutions in the Pareto front (and neighbouring points) is rather small. This means that most column combinations are unable to resolve the probe compounds, in reasonable times, with the applied gradients. Some selected solutions in Fig. 4 with $P > 0.95$ are marked on the plot, and the corresponding chromatograms depicted in Fig. 5a–d. Fig. 5a and d correspond to the same optimal column combination.

In previous work, where the combination of serially-coupled columns was optimised in the isocratic mode, we showed that the maximal separation performance with the available columns depends on the mobile phase composition [7]. This fact also holds when the gradient profile is pre-selected: the optimal combination depends critically on the pre-selected gradient program.

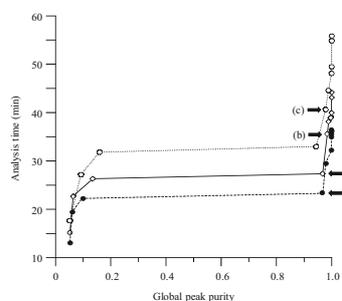


Fig. 4. Pareto fronts for three different gradient profiles, following the gradient pre-selection approach: (○) 5–17% acetonitrile in 60 min, (◻) 5–17% acetonitrile in 40 min, and (●) 5–30% acetonitrile in 60 min. The arrows indicate the resolution and analysis time for the column combinations used to obtain the chromatograms depicted in Fig. 5a–d.

4.3. Pre-selection of the column combination

The pre-selected mobile phase composition in isocratic elution has a decisive influence on the performance of an optimisation focused exclusively on the nature and length of the coupled

columns. Therefore, in order to find the best separation conditions, it is convenient to optimise simultaneously the mobile phase composition, and the column nature and length. In previous work, we demonstrated this possibility, but also the fact that the number of column lengths needed to get the maximal performance is decreased with this approach [7]. In this work, we first considered the simultaneous optimisation of the gradient profile, together with the column nature and length. However, the computation time increased up to an unfeasible volume.

Besides the solution given by Chen et al. with serially-coupled columns using gradient elution [11], we thought in another possibility that can offer better performance, which is described below. In this approach, an optimal combination of column nature and length, together with the mobile phase composition for isocratic elution is first selected on a Pareto basis [7]. Then, the optimal gradient profile is searched for that combination. The computation time allows performing a systematic scan of gradient profiles. However, we opted for a much more rapid search through the use of a genetic algorithms approach [23], which iterates a population of solutions making it evolve according to natural evolution principles, so that gradually the solutions converge in the optimum in a reduced time. The codified variables were the initial and final solvent content, and the column order as a permutation index. The genetic algorithms implemented for this work applies the classical genetic operations (probability given in parenthesis) of mating, reproduction, crossover (100%) and mutation (3%), together with re-appearance of the

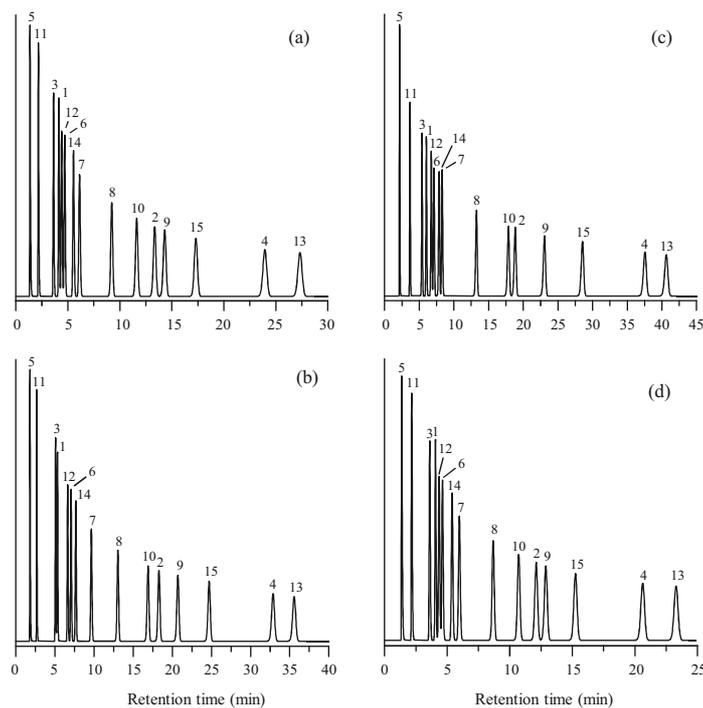


Fig. 5. Chromatograms corresponding to the Pareto-optimal solutions marked in Fig. 4: (a) ACE Phenyl (20 mm) + ACE CN (35 mm) and 5–17% acetonitrile in 40 min ($P=0.967$), (b) ACE C18 (20 mm) + ACE Phenyl (20 mm) + ACE CN (35 mm) and 5–17% acetonitrile in 40 min ($P=0.985$), (c) ACE C18 (20 mm) + ACE CN (75 mm) and 5–17% acetonitrile in 60 min ($P=0.977$), and (d) ACE Phenyl (20 mm) + ACE CN (35 mm) and 5–30% acetonitrile in 60 min ($P=0.968$). See Fig. 1 for solute identification.

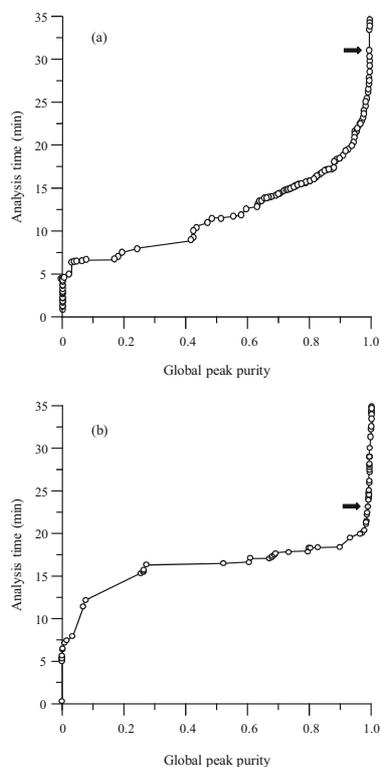


Fig. 6. Pareto plots for: (a) the simultaneous optimisation of column nature and length, and mobile phase composition in isocratic elution, and (b) optimisation of the gradient profile with the column combination marked in (a). Selected column combination: ACE C18 (50 mm)+ACE Phenyl (20 mm)+ACE C18-HL (30 mm)+ACE C18-AQ (20 mm). The arrows in (a) and (b) indicate the resolution and analysis time for the experimental conditions used to obtain the chromatograms in Fig. 7a and b, respectively.

best historical individual (5%). Binary encoding of 8 bits for each variable was used, and the population size accounted 100 individuals. The populations were stored along the generations, and once the genetic algorithm converged, the Pareto plot corresponding to the population of solutions including all individuals in all generations was represented. However, only the Pareto front was finally examined.

In Fig. 6a, the solutions defining the Pareto front for the isocratic optimisation, obtained with a systematic search and restricted to the available column lengths, are depicted. Each point corresponds to a Pareto-optimal combination of columns and mobile phase. As observed, there are several satisfactory solutions. We used this plot to select the best combination to optimise the gradient profile. Since the application of gradients to a given column combination is expected to speed up the separation, we decided to select a combination that offered a relatively long analysis time, but peak purity close to $P=1$ ($P=0.991$). The selected combination marked in Fig. 6a corresponds to ACE C18 (50 mm)+ACE Phenyl (20 mm)+ACE C18-HL (30 mm)+ACE C18-AQ (20 mm),

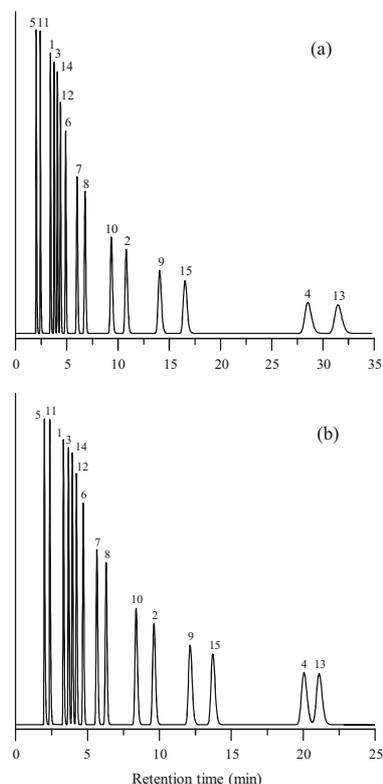


Fig. 7. Chromatograms corresponding to the Pareto-optimal solutions marked in Fig. 6: (a) Isocratic elution with 16.6% acetonitrile, and (b) gradient elution using 16.9–28.8% acetonitrile in 60 min. The column combination is indicated in Fig. 6. See Fig. 1 for solute identification.

and 16.6% acetonitrile. The corresponding chromatogram is depicted in Fig. 7a.

With the selected combination of columns for isocratic elution, the gradient profile was optimised. The Pareto front built as explained above with the populations of the genetic search is given in Fig. 6b. The exploration was restricted to the range 5–30% in 60 min, considering column permutations. Since the pre-selected column combination contained four columns, the number of permutations was 24. As a general indication of performance, a representative figure of predicted gradients with column permutations in the genetic search up to reach convergence was 20,000 (i.e. 20 generations with 100 individuals by generation). From these solutions, only the front showing the optimal gradients was drawn in the Pareto plot (Fig. 6b).

The selected solution (marked in Fig. 6b), which kept the resolution achieved in the isocratic separation, consisted of a gradient increasing the acetonitrile content from 16.9 to 28.8% in 60 min ($P=0.981$). The corresponding chromatogram is shown in Fig. 7b. The analysis time is reduced from above 32 min in the isocratic mode (Fig. 7a) to 22 min in the gradient mode (Fig. 7b). Smaller

analysis times can be achieved with linear gradients with larger slopes, but sacrificing some resolution.

The comparison of the results achieved with the two approaches presented in this work (the optimisation of the column combination with a pre-selected gradient and the optimisation of the gradient using the optimal isocratic column combination, Figs. 5 and 7, respectively) indicates that the latter approach outperforms the former. Note also that the columns in the combinations found in the two approaches are different: the ACE C18-HL and ACE C18-AQ columns are only present in the optimal solution found by the column pre-selection approach.

4.4. Computation time for the two approaches

Naturally, the optimisation of the column combination in gradient elution implies a much longer computation time, with respect to the implementation of an isocratic separation (where the results are independent of the column order). As commented, the comprehensive systematic optimisation of the column combination and gradient program altogether is unfeasible, due to the extremely high number of conditions to be examined. The computation time is much more acceptable when the gradient program or the combination of columns is pre-selected.

When the combination of columns is optimised, once the gradient program has been pre-selected, the number of conditions to be examined is given by the product of the number of possible column combinations and the number of permutations among the columns. In this work, considering five columns and restricting the combined length to 150 mm, the number of conditions was: 409 column combinations \times 120 permutations = 49,080, which represents a computation time of ca. 2.7 h with an Intel Core i7 CPU.

The computation time increases when the gradient program is optimised after pre-selecting a given column combination. The number of conditions to be examined for our case of study, where the selected column combination included four columns, was 1 column combination \times 24 permutations \times 31,626 gradients = 759,024 (42.2 h of computation time). This time was reduced to 3 min by using genetic algorithms, which yielded acceptable solutions in few generations (10 to 20). To this, the computation time needed to find out the best column combination under isocratic elution should be added: 192 column combinations \times 101 mobile phase composition levels (in 0.1% steps) = 19,392 (1 h of computation time). It should be, however, indicated that the isocratic solution is available to the analyst before considering the gradient.

5. Conclusions

There is a wide range of complex analytical problems, unable to be solved with a single column that will be successfully separated using serially-coupled columns, by using appropriate protocols. In this work, we have taken the challenge (with success) of implementing optimal linear gradients, using five ACE columns of different selectivity and length, and acetonitrile–water eluents, aimed to solve a mixture of 15 sulphonamides. Isocratic experiments were developed to model each single column. It should be noted that columns are marketed in segments of pre-defined lengths; therefore, combined columns cannot be set to any arbitrary length by the user. This unfeasibility contrasts with the selection of levels for scanning the organic solvent content in an isocratic mobile phase or gradient program, which being a continuous factor, can be set to any arbitrary value.

The predictive system that we have built can be used to simulate gradients with a single column or with coupled columns, in isocratic and gradient conditions, with linear, multi-linear or multi-isocratic gradients (the two latter types of gradient will be

examined in Part II of this work). It should be also noted that the same predictive system can be used in different optimisation approaches with serially-coupled columns. In this work, we have studied two of them: the optimisation of the combination of columns pre-selecting the gradient program, and the optimisation of the gradient program pre-selecting the column combination.

In gradient elution, each solute migrates according to the strength of the solvent in its band microenvironment. As consequence of the transit along the serially-coupled columns, the gradient front reaches the solute with a progressively longer delay time (associated to the transit through the previous columns and the portion of the current column where the solute is moving through). This forces to implement corrections for accounting all these delays, which enhance notably the quality of the predictions, independently of the optimisation target: the column combination or the gradient. We have observed excellent correlations between experimental and predicted values attending to the selectivity, but small biases in the prediction of retention, especially for the slowest solutes. These biases have been also reported by other authors [11]. The prediction errors can be produced in the column junctions, or more probably, be due to mobile phase mispreparation, loss of volatile components, or long-term changes in the stationary phase.

The comparison of the two optimisation approaches evaluated in this work indicates that the pre-selection of the column combination followed by gradient optimisation is able to find better solutions. In fact, this approach seems to be more reasonable, since the maximal resolution for a separation system is reached in isocratic elution, although often at the cost of inadequate analysis times. Gradient elution tends to achieve that maximal resolution as the complexity of the gradient program increases [24]. In theory, the same solution can be found through the approach that pre-selects the gradient program, provided such gradient is the optimal one, but this information is unknown. Note also that this approach tends to yield only a small number of solutions with sufficiently high peak purity (see the results for the three selected gradients in Fig. 4 with a wide empty region in the range $P=0.2$ – 0.8). In contrast, in the new approach described in this work, the Pareto front (Fig. 6b) included multiple solutions with $P \approx 1$ (complete resolution), better in quality than the solutions given by the approach that pre-selects the gradient.

To our experience, the serially-coupled columns option requires a stepwise protocol. First, it should be only applied if the optimisation with subsequent optimisations with single columns has failed. In this case, the gathered information can be reused to find out the best column combination and solvent content, with the aid of computer simulation in the isocratic mode. If the analysis time is not convenient, the same information can be now reused to find out the best gradient separation. The only additional data to be added for the gradient separation is the dwell time.

Finally, it should be commented that the analysis time will be reduced with the aid of multi-linear gradients. However, the complexity of implementing these gradients and the inclusion of isocratic steps or gradients with small slopes requires a dedicated space and will be the aim of Part II of this work.

Acknowledgements

This work was supported by Projects CTQ2010–16010 and CTQ2013–42558-P (MINECO, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks a FPI grant from MINECO.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.017>.

References

- [1] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, K. Bischoff, Patent Appl. No. 10 2005 024 154.9 (2005).
- [2] H.J. Issaq, J. Gutierrez, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 2851.
- [3] P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, J. Chromatogr. A 691 (1995) 171.
- [4] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 94.
- [5] K. Chen, F. Lynen, T. Szucs, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Analyst 138 (2013) 2914.
- [6] Sz. Nyiredy, Z. Szücs, L. Szepesy, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 122.
- [7] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1317 (2013) 39.
- [8] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 279.
- [9] M. De Beer, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Chromatographia 69 (2009) 609.
- [10] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Anal. Chem. 82 (2010) 1733.
- [11] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7222.
- [12] J. Lu, M. Ji, R. Ludewig, G.K.E. Scriba, D. Chen, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 764.
- [13] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17.
- [14] J.J. Baeza-Baeza, M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1314 (2013) 142.
- [15] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, Anal. Chem. 69 (1997) 3822.
- [16] G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146.
- [17] L.R. Snyder, J.W. Dolan, High-Performance Gradient Elution, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [18] J.J. Baeza-Baeza, C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1284 (2013) 28.
- [19] M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 125.
- [20] P. Jandera, J. Churbeek, J. Chromatogr. 91 (1974) 223.
- [21] S.J. López-Grió, C. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187.
- [22] A.K. Smilde, A. Knevelman, P.M.J. Coenegracht, J. Chromatogr. 369 (1986) 1.
- [23] L. Davis, in: L. Davis (Ed.), Handbook of Genetic Algorithms, Van Nostrand Reinhold, New York, 1991, p. 1.
- [24] V. Concha-Herrera, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1063 (2005) 79.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns Part II: Multi-linear gradients



C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió*, M.C. García-Alvarez-Coque

Departament de Química Analítica, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2014
Received in revised form 6 October 2014
Accepted 25 October 2014
Available online 3 November 2014

Keywords:

Serially-coupled columns
Multi-linear gradients
Pareto optimality
Genetic algorithms
Sulphonamides

ABSTRACT

An interpretive approach is reported for the simultaneous optimisation of resolution and analysis time in the separation of complex samples by reversed-phase liquid chromatography, using serially-coupled columns of different lengths and nature, and multi-linear gradient elution. The results complement those reported in *JCA* 1350 (2014) 51 for single linear gradients, using combinations of five columns: three C18 columns of different characteristics, a cyano column and a phenyl column. The relationships between the logarithm of the retention factor ($\ln k$) and the organic solvent content (ψ), and between the peak half-widths and the retention times, for each analyte, were determined using isocratic retention times. From the established correlations, the gradient retention time was predicted using the fundamental equation for gradient elution (modified to be used for serially-coupled columns), and with this information, the peak profile. Two chromatographic goals (maximal peak purity and minimal analysis time) were simultaneously evaluated using the Pareto optimality concept. The rigorous predictive system can be easily applied to columns from different manufacturers and succeeds at different levels: single and combined columns, using isocratic and gradient elution. The computation time for gradient elution optimisation was significantly reduced to practical values with the help of genetic algorithms (GAs).

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The usual practice for an analyst working in high-performance liquid chromatography is to select a single column to solve a separation problem. However, when dealing with complex problems, despite the continuous developments in the materials used as stationary phases and the improvements in the packing technology (with significant enhancements in the chromatographic selectivity and efficiency), the chromatographic resolution may be insufficient with the available columns. On the other hand, there may be an ideal column for each problem, but this may not be available at the laboratory, or it will be found only after checking the performance of many columns, which is unpractical.

Recently, a simple multi-column approach using serially-coupled columns of different selectivity, under isocratic elution, has been developed, where the mobile-phase composition is optimised together with the nature and length of the combined columns [1]. The approach increases the probability of success, with respect to former reports where the mobile-phase composition was fixed [2,3]. The new approach also allows for the reduction in the

required number of different column lengths without loss of performance. The results are in the way to two-dimensional liquid chromatography in terms of resolution and to gradient elution in terms of analysis time, making use of simpler instrumentation (a unique isocratic HPLC pump), which is accessible to most laboratories. Column coupling is facilitated by the use of PEEK zero dead volume (ZDV) fingertight couplers to connect columns of different lengths, by screwing them directly to each extreme of the columns [3]. In spite of the significantly shorter analysis times achieved with serially-coupled columns in isocratic elution with regard to the single columns, the possibility of shortening the times even more using gradient elution has been investigated. The simultaneous optimisation of the gradient profile and column nature and length is unpractical, due to the extremely long computation times. However, two simpler approaches have demonstrated to be useful: the search of the best column combination after selecting the gradient program [4,5], and the search of the best gradient program after selecting the column combination [5]. The selection of the column combination, followed by gradient optimisation, yields a larger variety of solutions, and usually, optima of better quality. In the suggested approach, the best column combination is that found as optimal using isocratic elution with serially-coupled columns.

In Part I of this work [5], the basic principles to optimise gradient elution with serially-coupled columns were described. In that work,

* Corresponding author.
E-mail address: jrtorres@uv.es (J.R. Torres-Lapasió).

only positive single-step linear gradients were considered. In Part II, the serially-coupled columns approach is extended to the optimisation of multi-linear gradients, which are able to reduce significantly the analysis time with respect to linear gradients. The possibilities of multi-linear gradients including incidental isocratic steps, with a pre-established gradient time, and start and end concentrations, are studied. Pareto plots assisted in the selection of the best separation conditions [6], considering both resolution and analysis time. This work continues the research on the development of tools for optimising serially-coupled columns, using as probe compounds 15 sulphonamides eluted with acetonitrile–water mobile phases at pH 3.5.

2. Theory

Part I describes the basic theory to predict the retention and peak profile in gradient elution, using serial columns [5]. Next, some problems that arise in these calculations, and were not considered in sufficient detail in that work, are discussed. Previously, it should be reminded that, in gradient elution, the gradient profile (i.e. the change in the solvent content with time, $\varphi(t)$) is measured at the column inlet (in a column combination, the column inlet for the first column). However, the relevant concentration in gradient elution is the local concentration at the solute location inside the column, which is related to the time needed by the gradient front to reach the solute. Also, the time the gradient front needs to reach the column inlet (i.e. the dwell time, which depends on the instrument tubing) should be included in the computation. Finally, with serially-coupled columns, the time needed by the solute to transit through the previous column(s) should also be added.

2.1. Integration of the fundamental equation

For a given column i , the prediction of retention in gradient elution is based on the “fundamental equation” [7,8]:

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_{g,j}-t_0} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi(t))} \quad (1)$$

where t_d is the dwell time, $t_{g,j}$ the retention time observed in gradient elution for a solute j (at the column outlet), k_{ij} the instantaneous retention factor (at the column inlet), φ_0 the initial mobile phase composition and $\varphi(t)$ the gradient profile (at the column inlet). A particular equation should be solved for each solute eluted with a different column. A universal approach requires developing predictions with non-integrable models, in order to increase the accuracy of the predictions in wide solvent ranges. Also, particular columns may require specific non-integrable models. In this regard, the only option is to solve the equation numerically.

The numerical integration implies splitting Eq. (1) in a series of integrals:

$$t_{0i} = \int_0^{t_d} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_0)} + \int_{t_d}^{t_1} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \dots + \int_{t_{n-1}}^{t_n} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} + \int_{t_n}^{t_{g,j}} \frac{dt}{k_{ij}(\varphi_s(t))} \quad (2)$$

where t_1, t_2, \dots, t_n are the time divisions in which the gradient time has been split. For sufficiently small time intervals, each term in the summation will represent an isocratic step along the gradient profile. The gradient retention time for a column i ($t_{g,i}$) is the time associated to the term at which the cumulative sum in Eq. (2) matches the dead time for that column (t_{0i}). Since the retention factor is constant in each q isocratic step, the central $k_{ij}(\varphi_q)$ value in the interval can be adopted. For this calculation, Eq. (2) needs

a corrected gradient program ($\varphi_s(t)$) that predicts the concentration of organic solvent at the solute location. The solution of the integration can be outlined as follows:

$$t_{0i} = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{t_1 - t_d}{k_{ij}(\varphi_{s,1})} + \frac{t_2 - t_1}{k_{ij}(\varphi_{s,2})} + \dots + \frac{t_g - t_n}{k_{ij}(\varphi_{s,n})} \\ = \frac{t_d}{k_{ij}(\varphi_0)} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,1})} + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,2})} + \dots + \frac{\Delta t}{k_{ij}(\varphi_{s,n})} \quad (3)$$

Therefore, the gradient retention time for each column in the assembly, and each solute j , is the sum of several time contributions, which may correspond to gradient, isocratic or a mixed elution profile. Meanwhile, the gradient retention time for the column combination is the sum of the retention time associated to each column, to which the extra-column contribution should be added (assuming that the connections between columns have a null volume contribution). An important issue is that the retention model depends on the column where the solute is being eluted and the domain of gradient profile associated to that column. For this reason, knowledge of the time at which the solute leaves a given column, being transferred to the next one, is critical. Getting this information is rather simple, since this happens when the integrals summation (Eq. (3)) matches t_{0i} .

2.2. Protocol to consider the solvent delays inside a column

As commented, along the solute elution, a series of solvent delays should be considered: (i) the extra-column (or instrumental) delay (i.e. the dwell time), (ii) the delay generated by the transit through previous columns (i.e. the sum of the dead times for those columns) and (iii) the intra-column (or internal) delay (i.e. the delay associated to the distance migrated by the solute inside the column where the solute is eluting at a given time). The two first delays can be obtained easily. The real problem is to calculate the internal delay, which is relevant for the numerical integration. This needs a dedicated space.

In principle, the internal delay can be implemented in the time direction or in the solvent content direction. This delay accounts

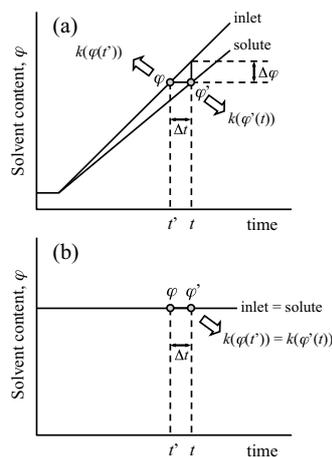


Fig. 1. Delays in gradient elution in the time and solvent contents direction: (a) gradient elution and (b) isocratic elution. In (b), no correction is needed. See text for details.

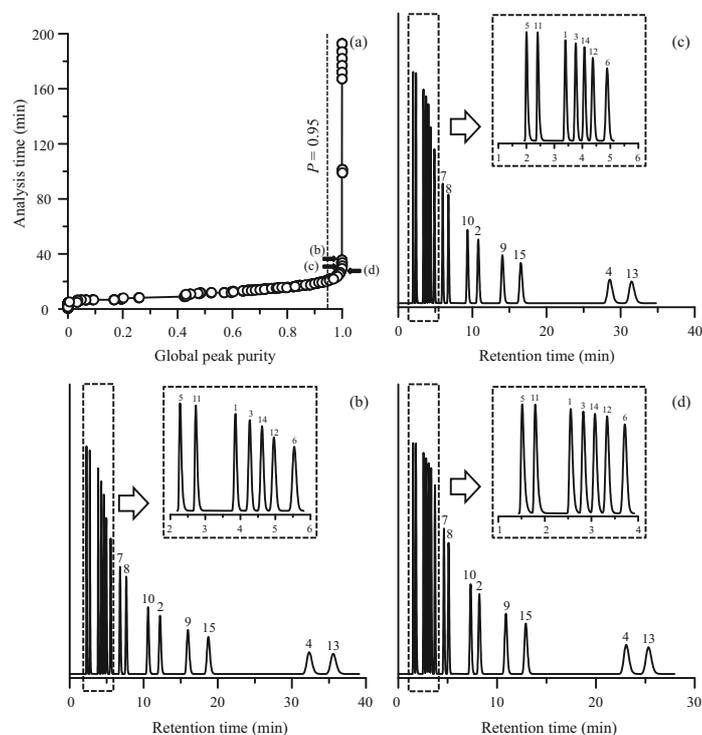


Fig. 2. Simultaneous optimisation of mobile-phase composition, and column nature and length for isocratic elution: Pareto plot (a), and optimal chromatograms (b–d). Column combination and mobile-phase composition: (b) ACE C18 (7 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) at 16.7% acetonitrile ($P = 0.9992$), (c) ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) at 16.6% acetonitrile ($P = 0.9986$), and (d) ACE C18 (5 cm) + ACE C18-HL (2 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) at 16.6% acetonitrile ($P = 0.978$). The arrows in (a) indicate the resolution and analysis time for the chromatograms depicted in (b)–(d). Solutes: (1) sulphacetamide, (2) sulphachloropyridazine, (3) sulphadiazine, (4) sulphadimethoxine, (5) sulphaguandinine, (6) sulphamerazine, (7) sulphamethazine, (8) sulphamethizole, (9) sulphamethoxazole, (10) sulphamonomethoxine, (11) sulphaniilamide, (12) sulphapyridine, (13) sulphaquinoxaline, (14) sulphathiazole and (15) sulphisoxazole.

the time that the gradient front needs to reach the solute (Δt in Fig. 1a and b), or the change in solvent content with regard to the column inlet at the solute location ($\Delta\phi$ in Fig. 1a; in isocratic elution $\Delta\phi = 0$). This is done by correcting t or ϕ , respectively, in $k_{ij}(\phi(t))$. The correction in the time direction seems advantageous in terms of calculation and is also conceptually simpler, since each term in the integral is related to the migrated column volume fraction. It is thus equivalent to a change in the time scale. This would allow using a pre-calculated table of retention factors for all integrations and corrections. However, such a correction is mischievous, especially with gradients that include an isocratic step or steps with small slopes. The failure in the correction in the time direction is due to the fact that the true variable that should be known is the solvent content at the solute location. If a delay in the time direction is not translated in a change in solvent content, the correction will be wrong (Fig. 1b). Therefore, the best outline is implementing the delays in terms of solvent content.

2.3. Design of multi-linear gradients

In a multi-linear gradient, two or more consecutive segments of different slope are defined, where the solvent concentration is

linearly increased. In order to speed up the elution, the gradient slopes should be always positive, but occasionally, one or more isocratic steps can be useful, or the slope is decreased with respect to previous segments to get the optimal separation for some solutes.

A particular case of linear gradients is a gradient with a single step (i.e. without nodes), which was studied in Part I in this work [5]. In that case, the gradient time was fixed at a convenient value, and the initial and final solvent contents were optimised. A multi-linear gradient (i.e. with one or more nodes) has more associated parameters (those for the linear gradient, and the time and solvent content for each node). If all parameters were considered, and a systematic search (i.e. a grid search) carried out, the optimisation would be unfeasible. For this reason, the algorithm was designed by fixing the gradient time, and the initial and final solvent contents. Only the coordinates for the nodes were optimised. Also, the systematic search was replaced by a more efficient search, as explained below. In the optimisation protocol, the first node was searched within the whole domain of organic solvent content, the second one in the space left between the first node and the final solvent content, and so on. The initial solvent content may be arbitrarily set or selected based on the optimal solvent content found in the isocratic optimisation, using the same column combination. The gradient range

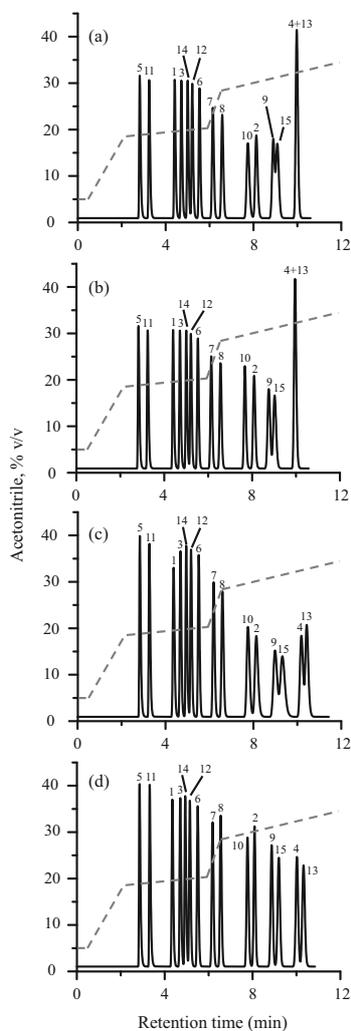


Fig. 3. Influence of the column order for a pre-selected multi-linear gradient (5.0–19.3% acetonitrile in 1.3 min, 20.2% at 5.0 min, 28.5% acetonitrile at 5.6 min, and 45.0% at 20.0 min). Column combination order (global resolution): (a) ACE C18 (5 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) + ACE Phenyl (2 cm) ($P=0.084$), (b) ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) ($P=0.105$), (c) ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) ($P=0.698$), (d) ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) + ACE C18 (5 cm) + ACE C18-HL (3 cm) ($P=0.957$). See Fig. 2 for other details.

can also be delimited by that found in the optimisation of a single linear gradient.

There are at least two cases, for any gradient, attending to the solute retention behaviour that have been considered in the software prepared for this work:

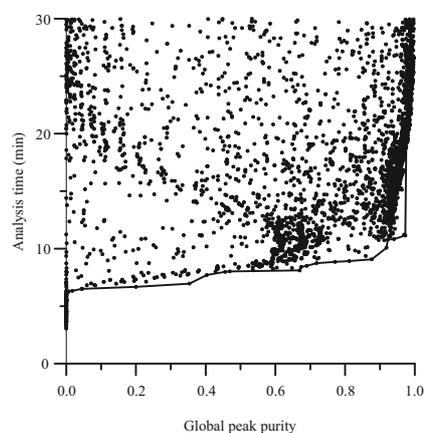


Fig. 4. Pareto plot depicting the historical population of solutions after applying a GAs search in the optimisation of a multi-linear gradient with three nodes, using Column combination II. The Pareto front is depicted by a thin line. See also Fig. 5c and d, which corresponds to the same optimisation.

- (i) *Isocratic end of migration*: The gradient finishes before the solute reaches the outlet of the column combination. Thus, the solute will migrate isocratically through the remaining column fraction (and incidental subsequent columns). In this case, the column fraction where the solute migrates under these conditions should be calculated.
- (ii) *Gradient end of migration*: When there is no previous information, the composition range initially adopted may be too wide and the last node(s) may be found after the elution of the most retained solute (outside the elution region). In this case, the final composition should be decreased, repeating the optimisation under more adapted search limits. If the limits are not correct, the location of the nodes will indicate it, suggesting new limits to repeat the optimisation. This strategy is more flexible than others where the nodes have fixed coordinates of solvent content or time values.

2.4. Optimisation of multi-linear gradients

Each solute in a mixture has specific features. Therefore, an efficient algorithm should be able to forecast gradients quickly and accurately, for a variety of solutes altogether preferably in matrix terms. The simplest approach for multi-linear gradients consists of the insertion of nodes altering an optimal single linear gradient, previously established, which is assisted by the observation of simulated chromatograms [9]. Genetic algorithms (GAs) [10] are useful to speed up the calculation, since the exploration is progressively focused on the most promising regions in the working space. GAs are constrained global optimisation methods and a good alternative in problems where a high number of local solutions exists. One mandatory step in GAs is to encode the information in discrete numbers, usually binary, giving rise to an entity of encoded parameters, called "chromosome". Each parameter in a chromosome has several associated levels, which may correspond to an integer number or a real number which is discretised. A GAs search usually starts with a random population of encoded solutions, consisting typically of 20–500 individuals: the initial population. This is forced to evolve using rules that simulate natural selection processes, so that gradually, the solutions converge in the optimum, hopefully in

Table 1
Performance for all possible permutations using Column combination II.

Permutations ^a	Peak purity ^b		Analysis time ^c	
	P_{\max}	$t = 14$ min	t_{\max}	$P = 0.97$
C18 (5 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm)	0.9966	0.8860	29.69	19.36
C18 (5 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm)	0.9969	0.8874	29.95	18.35
C18 (5 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm)	0.9929	0.8763	26.22	19.84
C18 (5 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm)	0.9963	0.8617	28.18	19.84
C18 (5 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm)	0.9969	0.8338	29.90	18.84
C18 (5 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm)	0.9967	0.8931	29.50	18.54
Phe (2 cm) + C18 (5 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm)	0.9966	0.9488	27.02	18.59
Phe (2 cm) + C18 (5 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm)	0.9960	0.9316	26.97	19.18
HL (3 cm) + C18 (5 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm)	0.996	0.917	28.18	18.92
AQ (2 cm) + C18 (5 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm)	0.990	0.852	27.06	20.54
HL (3 cm) + C18 (5 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm)	0.994	0.957	24.00	18.51
AQ (2 cm) + C18 (5 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm)	0.994	0.967	30.33	19.89
Phe (2 cm) + HL (3 cm) + C18 (5 cm) + AQ (2 cm)	0.997	0.936	26.35	17.09
Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + C18 (5 cm) + HL (3 cm) [*]	0.997	0.958	26.70	14.47
HL (3 cm) + Phe (2 cm) + C18 (5 cm) + AQ (2 cm)	0.995	0.965	28.11	17.15
AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + C18 (5 cm) + HL (3 cm)	0.995	0.951	27.12	18.86
HL (3 cm) + AQ (2 cm) + C18 (5 cm) + Phe (2 cm)	0.997	0.926	28.85	19.06
AQ (2 cm) + HL (3 cm) + C18 (5 cm) + Phe (2 cm)	0.991	0.904	27.25	20.39
Phe (2 cm) + HL (3 cm) + AQ (2 cm) + C18 (5 cm)	0.996	0.961	28.32	18.05
Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + HL (3 cm) + C18 (5 cm) [*]	0.997	0.972	28.35	14.35
HL (3 cm) + Phe (2 cm) + AQ (2 cm) + C18 (5 cm)	0.996	0.948	28.95	15.75
AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + HL (3 cm) + C18 (5 cm)	0.989	0.958	26.86	19.21
HL (3 cm) + AQ (2 cm) + Phe (2 cm) + C18 (5 cm)	0.995	0.954	28.37	19.39
AQ (2 cm) + HL (3 cm) + Phe (2 cm) + C18 (5 cm)	0.992	0.966	29.34	20.75

^a C18: ACE C18; Phe: ACE Phenyl; HL: ACE C18-HL; AQ: ACE C18-AQ.

^b Highest global peak purity (top value in the Pareto front) and maximal peak purity for an analysis time of 14 min.

^c Analysis time for the highest peak purity and for $P = 0.97$.

a short time. The first step consists of evaluating the quality of each individual in the population, which is called "fitness". In this work, we attended to the global resolution to enhance the gradient, not considering the time until convergence was reached. The selection operator was based on the roulette wheel concept.

With the fitness information, the initial population is made to undergo some mathematical operations that mimic genetic processes (the applied probability is given in parenthesis): mating (100%), reproduction (100%), crossover (100%), mutation (3%) and re-appearance of the best historical individual (5%). These operations simulate the way in which the best individuals survive and thrive in Nature, crossing their genetic information to give rise to better new individuals. Each cycle is called "generation". The process stops when no significant improvement (in this work in the resolution) is observed after a reasonable number of generations, which usually happens when a small number of associated solutions dominate the population (i.e. when the genetic diversity falls below a certain threshold).

In this work, the codified parameters were the coordinates (time and solvent content) for each node. The column order was included as a permutation index. Binary encoding of 8 bits for each parameter was used, and the population size accounted 100 individuals. The populations were stored along the generations, and once the GAs search converged, the Pareto plot (analysis time versus resolution) corresponding to the cumulative population (i.e. including all individuals in all generations) of solutions was represented. The architecture of the software developed in our laboratory was carefully designed for quick calculation and save of memory.

The whole approach was implemented with a comprehensive homemade computer program built in MATLAB 2014a, which can be applied to optimise the separation with single or combined columns in isocratic, multi-isocratic (successive isocratic steps) and linear and multi-linear gradients.

3. Experimental

All experimental details are given in Part I of this work.

4. Results and discussion

4.1. Selection of the best column combination

As commented, a good option to implement serially-coupled columns with gradient elution is to optimise first the column combination in isocratic elution and then use that combination to find out the best gradient [5]. This previous optimisation will discard a column if it does not offer any improvement in the separation and will indicate the most adequate combination of stationary phase nature and length.

Fig. 2a represents the Pareto front corresponding to the isocratic optimisation of the mobile-phase composition and the column nature and length, for column combinations built with the ACE columns. In the plot, a line representing peak purity $P = 0.95$ has been added to help in the selection of the column combination. The resolution is the primary aim for the analyst, and $P = 0.95$ was considered as the minimal satisfactory value (the worst resolved peaks will have a minimal individual peak purity, $p = 0.975$). In the figure, three solutions with $P > 0.95$ have been marked with an arrow. In Fig. 2b–d, the corresponding chromatograms are depicted. In each case, the column combination was different and will be called Column combinations I, II and III. Combination I (Fig. 2b) is built with a system of four columns: ACE C18 (7 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) ($P = 0.9992$ for the selected optimum). Combination II (Fig. 2c) is also a system with four columns: ACE C18 (5 cm) + ACE Phenyl (2 cm) + ACE C18-HL (3 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) ($P = 0.9986$). Combination III (Fig. 2d) was obtained with three columns: ACE C18 (5 cm) + ACE C18-HL (2 cm) + ACE C18-AQ (2 cm) ($P = 0.978$). The optimal acetonitrile mobile-phase contents for the three solutions were similar: 16.7, 16.6 and 16.6%, respectively.

Certainly, the criterion to select the column combination may differ according to the analyst priority (e.g. resolution or analysis time), but will also depend on the elution mode. If the aim is to work using isocratic elution, some resolution can be sacrificed to get sufficiently short analysis time. Then, Combination III would be

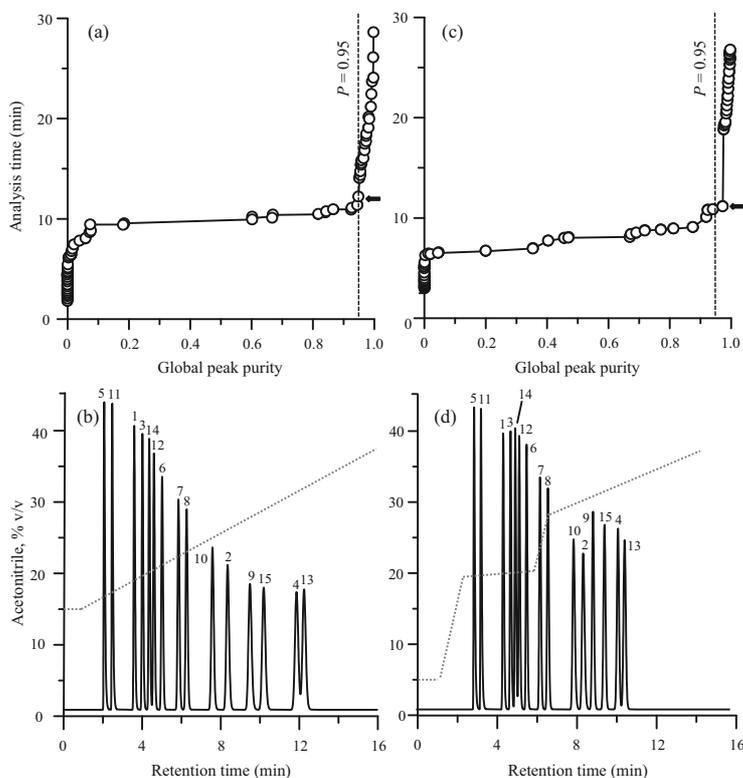


Fig. 5. Pareto plots (a, c), and optimal chromatograms (b, d) for Column combination II using gradient elution, corresponding to the optimal permutation: ACE Phenyl (2 cm)+ACE C18-AQ (2 cm)+ACE C18-HL (3 cm)+ACE C18 (5 cm). (a, b) Single linear gradient (15.0–43.0% acetonitrile in 20.0 min, $P=0.948$), and (c, d) multi-linear gradient (5.0–19.3% acetonitrile in 1.3 min, 20.2% at 5.0 min, 28.5% at 5.6 min and 45% at 20.0 min, $P=0.967$). The arrows in (a) and (c) indicate the resolution and analysis time for the chromatograms depicted in (b) and (d). See Fig. 2 for other details.

the best option. In contrast, if the final aim is to use gradient elution, it may be more interesting to select a combination offering high resolution although at the cost of longer analysis time, which will be reduced by an optimised gradient. This is the case of Combinations I and II. The latter was chosen for the studies in gradient elution shown in Part I of this work.

4.2. Column order

In isocratic elution, the retention times obtained with serially-coupled columns are independent from the column order, provided the connections between columns are correct [3]. The retention times are just linear combinations of the times yielded by each column. However, in gradient elution, the column order will affect the retention times. Each column offers different retention behaviour, and depending on its location in the combination, this will be affected by a different organic solvent domain in the gradient. Although this issue has been previously addressed [4,5], it is interesting to show the effect of the column order in more detail, considering both responses (resolution and analysis time). This is shown in Table 1 for Combination II (built with four coupled

columns) and a multi-linear gradient, where four linear segments (three nodes) were optimised, including all possible column permutations ($4 \times 3 \times 2 = 24$). The data given in the table are the analysis time corresponding to a global peak purity of $P=0.97$ (which was reached in all cases), the global peak purity for an analysis time of $t_{\text{anal}} = 14$ min, and the P and t_{anal} values for the maximal resolution.

The difference in performance among the permutations is evident. Considering all evaluated parameters, it was concluded that the best column permutations were ACE Phenyl (2 cm)+ACE C18-AQ (2 cm)+ACE C18 (5 cm)+ACE C18-HL (3 cm) and ACE Phenyl (2 cm)+ACE C18-AQ (2 cm)+ACE C18-HL (3 cm)+ACE C18 (5 cm) (marked with asterisks in the table; note that only the order of ACE C18 and ACE C18-HL changes).

In Table 1, each permutation was associated to a different optimal gradient. We thus repeated the study by fixing the gradient, to isolate the real effect of the column permutation. The chromatograms obtained for four permutations, including one of the two best and the worst one, among the 24 possible, are given in Fig. 3. The best permutations agreed with those in the previous study.

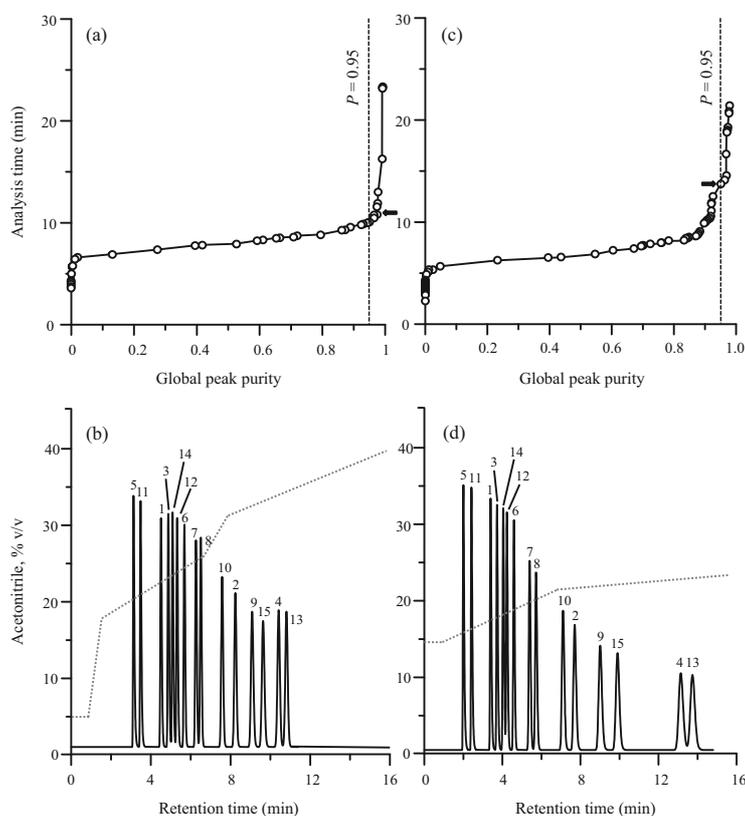


Fig. 6. Pareto plots (a, c) and optimal chromatograms (b, d) for pre-selected column combinations using a multi-linear gradient, corresponding to the optimal column permutations. (a, b) Column combination I: ACE Phenyl (2 cm)+ ACE C18-AQ (2 cm)+ ACE C18-HL (3 cm)+ ACE C18 (7 cm) (5.0–17.9% acetonitrile in 0.6 min, 26.0% at 5.7 min, 31.5% at 7.0 min, and 45.0% at 20.0 min, $P=0.972$), and (d) Column combination III: ACE C18-AQ (2 cm)+ ACE C18-HL (2 cm)+ ACE C18 (5 cm) (14.6–21.4% acetonitrile in 5.9 min, 23.6% at 15.9 min, and 45.0% at 20.0 min, $P=0.951$). The arrows in (a) and (c) indicate the resolution and analysis time for the conditions used to obtain the chromatograms depicted in (b) and (d). See Fig. 2 for other details.

4.3. Selection of the best multi-linear gradient

Multi-linear gradients are more efficient than linear gradients to reduce the analysis time, since they can be adapted to a certain extent to the particular requirements of groups of solutes with close elution. However, the prediction of the best gradients is appreciably more complex. In this work, the same algorithms described in Part I for single linear gradients were used to predict the multi-linear gradients [5]. The optimal conditions were again searched based on both resolution and analysis time, assisted by a Pareto plot.

Multi-linear gradients imply a higher number of parameters, and consequently, the number of solutions to scan is significantly larger, even if only the coordinates for the nodes are optimised, as in this work. Therefore, instead of an exhaustive search, we carried out a GAs optimisation (see Section 2.4). We used this strategy in Part I for optimising single linear gradients, but with multi-linear gradients it is even more necessary. It should be remarked that only the resolution (not the time) is the target being optimised through genetic operations: we are not interested in the final solution (since

it would have a too long analysis time), but in the solutions found along the process (i.e. the cumulative or historical population), which are the data represented in Fig. 4. In other words, we are not actively optimising resolution and analysis time with the Pareto optimality concept, but only the resolution to generate a set of historical populations. Once the GA has converged, the historical population is processed to find out the Pareto front (note in the figure that this kind of search concentrates the scan gradients in the boundary of the Pareto plot). Thus, our final solution is not the one found out by the GA (once all diversity is lost), but one of the solutions perhaps discarded in previous generations, selected according to Pareto principles at the end of the process. The algorithm should be configured in such a way that the diversity is lost gradually to keep the exploration capability high along the process.

Successive evolved populations tend to increase (and explore better) sets of factors in the experimental domain where the resolution is increasing. At the beginning of the GA, the first populations are distributed in the whole experimental domain, and only a few solutions (or perhaps none) are close to the final Pareto front. As

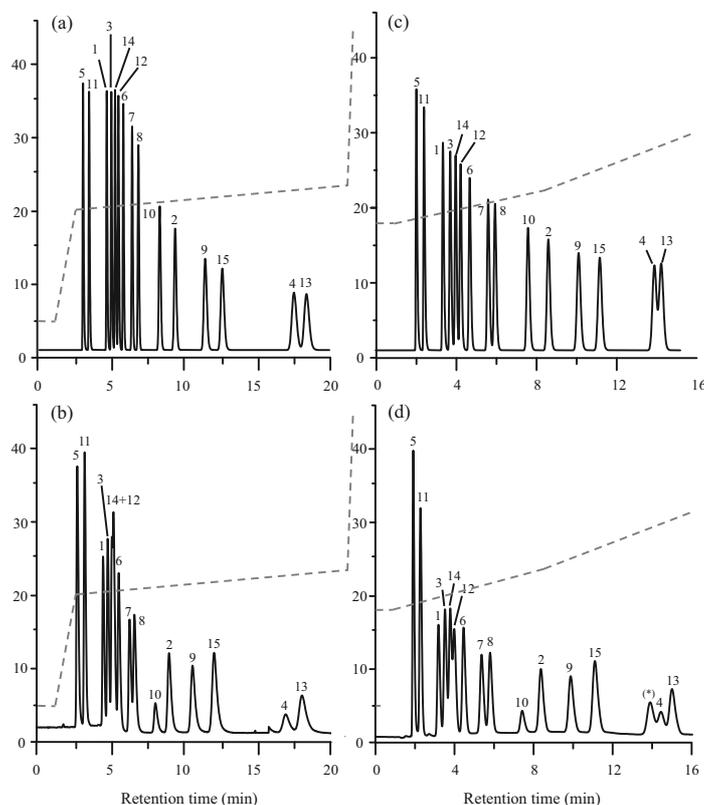


Fig. 7. Predicted (a, c) and experimental (b, d) chromatograms for the mixture of 15 sulphonamides, using a multi-linear gradient and the column combination ACE C18 (5 cm)+ACE Phenyl (2 cm)+ACE C18-HL (3 cm)+ACE C18-AQ (2 cm). Gradient profiles: (a, b) 5.0–20.1% acetonitrile in 1.6 min, 21.7% at 19.6 min and 45.0% at 20.0 min ($P=0.962$) and (c, d) 17.0–22.5% acetonitrile in 7.5 min, and 30.0% at 15.0–20.0 min ($P=0.774$). See Fig. 2 for other details.

the generations succeed in time, the number of solutions with good resolution increase, some of them with long times and other with shorter. Since only the resolution is attended, this kind of search favours the slow solutions. Therefore, at the beginning and at the end of the search, there are no interesting solutions: at the beginning the resolution is poor, and at the end, the time is too long, although the resolution is better. However, when all historical populations of solutions are contemplated altogether, we find some solutions with the performance we were seeking.

A different Pareto plot will be obtained depending on the column combination and assumed nodes in the gradient. Also, each time the search sequence is run, a different plot will be obtained, since the search basis is probabilistic. However, using the protocol described in Section 2.4, we have checked that the Pareto fronts of independent GAs runs on the same problem are rather similar.

Fig. 5 compares the results obtained with one of the best permutations of Column combination II (see Fig. 2a and Table 1), using a single linear gradient (Fig. 5a and b), and a multi-linear gradient with three nodes (Fig. 5c and d). The performance in each case can be evaluated in the Pareto plots (Figs. 5a and c), where several solutions may be observed to offer global resolution $P > 0.95$.

The selected solutions, in both cases, fulfilled this condition at the shortest analysis time. As observed, the multi-linear gradient allowed good resolution ($P=0.967$) with an analysis time of only ca. 10.5 min. This improves the solution obtained with the single linear gradient in both resolution and analysis time: $P=0.948$ in 12.2 min.

The achieved performance will depend on the selected column combination. This selection has certain subjectivity, since the analyst can choose one of several possible column combinations (Fig. 2a), and the performance is reasonably good for a number of combinations. Thus, the best permutations of Column combinations I and III also offered good performance for multi-linear gradients (Fig. 6a and b, and c and d, respectively). These chromatograms should be compared with the chromatograms in Fig. 5b and d for Column combination II.

4.4. Reliability

It can be thought that the complexity of the mathematical algorithm (and even of the column coupling) may give rise to poor predictions of the chromatograms for the selected conditions. Fig. 7 illustrates the good accuracy of the predictions for Column

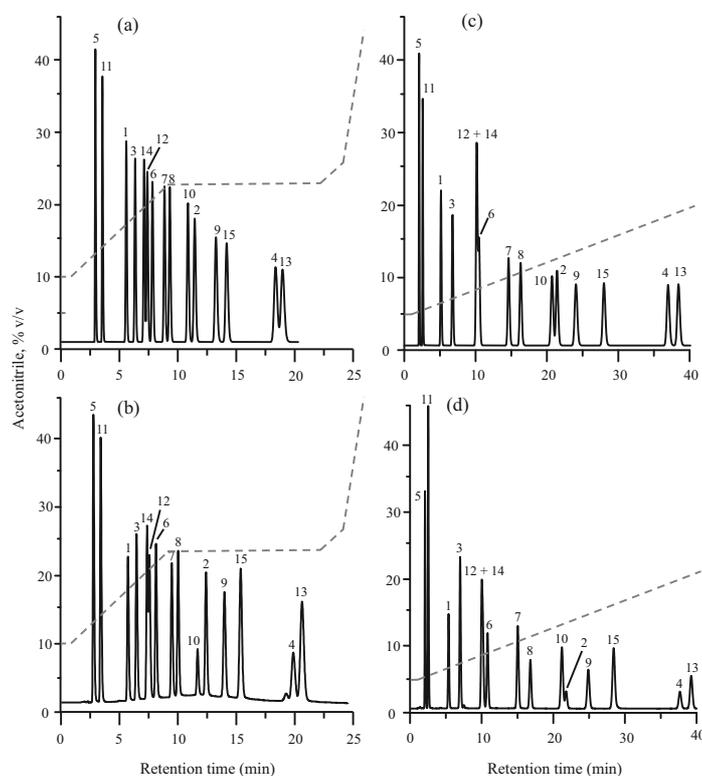


Fig. 8. Predicted (a) and experimental (b) chromatograms for the mixture of 15 sulphonamides, using: (a, b) the column combination ACE C18 (7 cm)+ACE C18-HL (3 cm)+ACE C18-AQ (5 cm) and the multi-linear gradient 10.0–23.5% acetonitrile in 21.3 min, 26.6% at 23.2 min and 45.0% at 25.0 min ($P=0.888$), and (c, d) 9 cm ACE C18 column and the linear gradient 5.0–45.5% acetonitrile in 101.2 min. See Fig. 2 for other details.

combination II using two different gradients. The accuracy of another column combination (ACE C18 (7 cm)+ACE C18-HL (3 cm)+ACE C18-AQ (5 cm)) can be checked in Fig. 8a and b. The agreement between the experimental and predicted chromatograms is again satisfactory. The accuracy is similar to that achieved with a single column (9 cm ACE C18), using a single linear gradient, which is a much simpler situation (Fig. 8c and d).

5. Conclusions

Serial coupling of stationary phases can be easily implemented with conventional short columns assembled through ZDV fingertight couplers, which are screwed directly to the columns without the need of external holders. Any existing (or newly branded) columns available in the market can be used. The drawback of a previous simple approach run at fixed mobile-phase composition, or fixed gradient, is the requirement of columns of multiple lengths to achieve an extensive range of column combinations, from which the best is selected. Also, the selected conditions may not lead to the best performance. A significantly more powerful and competitive approach, in isocratic elution, optimises simultaneously the mobile phase composition, and nature and length of the coupled columns. The optimisation protocol is more complex. However, it

has the advantage of allowing the fine tuning of the selectivity with the aid of the solvent content, which is a continuous variable.

In gradient elution, the number of parameters to be optimised is increased (i.e. initial and final eluent composition and gradient slope for single linear gradients, and at least the location of the nodes for multi-linear gradients, together with the nature and length of the coupled columns). This would make the optimisation of coupled columns unfeasible. However, the search is significantly reduced if the column combination is previously selected, based on the optimal conditions in the isocratic separation, combined with the application of GAs to explore more efficiently the search space.

An important issue in the usefulness and reliability of the serially-coupled column approaches, either in isocratic or gradient elution, is the rigorous optimisation of the involved parameters. The predictive system should imply a reliable modelling of the retention behaviour for each compound in the sample, as a function of the solvent content (or other selected experimental factors), and a system to forecast peak profiles (width and asymmetry). The prediction of retention time and peak profile in the column combinations is finally achieved by combining the predictions attained for each single column. This work explores the potential of this approach and how it is able to succeed at different levels. The algorithm allows for the prediction of isocratic steps included in the multi-linear

gradient and the improvement of the predictions for linear steps with small slopes.

For this study, we took the decision of inspecting the whole possibilities of the system considering 1 cm increments for all columns, with the aim to explore at what extent the resolution could be improved. In our laboratory, we are more limited in column lengths, for economic reasons. Naturally, all the research can be circumscribed only to the available columns [1]. The separation problem and columns used in this work evidenced the good performance of the developed approach, but similar or more attractive results will be obtained with other sets of compounds, or columns from ACE or other manufacturers.

Acknowledgements

This work was supported by Projects CTQ2010-16010 and CTQ2013-42558-P (MINECO, Spain), and FEDER funds. C. Ortiz-Bolsico thanks an FPI grant from MINECO.

References

- [1] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, Simultaneous optimization of mobile phase composition, column nature and length to analyse complex samples using serially coupled columns, *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 39–48.
- [2] Sz. Nyiredy, Z. Szűcs, L. Szepeesy, Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: basic possibilities of serially connected columns using the PRISMA principle, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 122–130.
- [3] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Angel, M.C. García-Alvarez-Coque, Comparison of two serially coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures, *J. Chromatogr. A* 1281 (2013) 94–105.
- [4] M. De Beer, F. Lynen, K. Chen, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Stationary-phase optimized selectivity liquid chromatography: development of a linear gradient prediction algorithm, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1733–1743.
- [5] C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, Optimisation of gradient elution with serially-coupled columns. Part 1: Single linear gradients, *J. Chromatogr. A* 1250 (2014) 51–60.
- [6] A.K. Smilde, A. Knevelman, P.M.J. Coenegracht, Introduction of multi-criteria decision making in optimization procedures for high-performance liquid chromatographic separations, *J. Chromatogr.* 369 (1986) 1–10.
- [7] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [8] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, Some insights on the description of gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2269–2277.
- [9] V. Concha-Herrera, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 79–88.
- [10] L. Davis, A genetic algorithms tutorial, in: L. Davis (Ed.), *Handbook of Genetic Algorithms*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1991, pp. 1–101.