

DESARROLLO COMPUTARIZADO DE SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS.

ALGUNAS IDEAS RENOVADORAS

R. CELA

Instituto de Investigación en Análisis Químicos y Biológicos de la Universidad de Santiago de Compostela (IAQBUS).

Por su dificultad práctica, la necesidad de dedicación y experiencia por parte del cromatografista, y porque siempre fue una técnica relativamente lenta, el desarrollo computarizado de las separaciones en cromatografía líquida fue un objetivo de la investigación en química analítica y en quimiometría desde comienzos de la década de los años 70 del siglo pasado, en cuanto los ordenadores entraron en los laboratorios analíticos. La idea de que un programa de ordenador pudiera no solo controlar y hacer operar de manera autónoma los instrumentos (p.ej., durante la noche, como sugería el nombre *Sentinel* del primer, y efímero, sistema de auto optimización para LC comercializado por Dupont), y que, por simulación partiendo de un pequeño grupo de datos experimentales, resolviera en minutos o segundos lo que al cromatografista le llevaría días o semanas de trabajo fue atractivo desde el primer momento y acaparó la atención de gran número de investigadores durante la década de los 80, en la que aparecieron diversos programas informáticos, algunos comerciales (p.ej., los chips Optim I y II de Spectra-Physics¹, el sistema PESOS de Perkin-Elmer² o el sistema ICOS de Hewlett-Packard), y otros puramente académicos, con estos fines. Después, el interés decayó.

Uno de los softwares comerciales (*Drylab*, lanzado en 1985 por LC Resources, una empresa fundada por Lloyd R. Snyder y colaboradores y actualmente distribuido por el Instituto Molnár para Cromatografía aplicada, en Alemania³), se mantuvo en el tiempo de forma continuada y actualmente es casi hegemónico en el mercado, aunque sus cambios e innovaciones han sido relativamente escasos y afectando esencialmente la parte informática y de gráficos. También se mantiene en el mercado el programa *LC-Simulator* de ACD labs⁴, que en esencia es muy similar a *Drylab* aunque aporta algunas herramientas adicionales importantes para la gestión de los cromatogramas. Otros que parecían una seria competencia (p.ej. *Fusion QbD*,

comercializado por S-Matrix en California¹), finalmente no lo han sido, posiblemente porque tampoco aportaban enfoques realmente novedosos.

La situación actual es que un gran número de cromatografistas continúan desarrollando sus procedimientos de separación por prueba y error, sin confiar en las herramientas comerciales existentes. Un buen número de ellos ha invertido fondos en adquirir alguno de los programas comerciales disponibles, aunque en bastantes casos parecen insatisfechos con su rendimiento práctico. El acceso a precios razonables de los detectores de masa, además, ha eliminado presión en la necesidad de separar todos los picos de las muestras a línea base y, en ocasiones, se aceptan separaciones claramente deficientes confiando y depositando el esfuerzo en las ventajas y posibilidades del detector. 50 años después de su andadura, las expectativas iniciales en los programas de desarrollo computarizado de separaciones en LC están bastante lejos de haber sido alcanzadas.

Entre las diversas posibles causas de esta situación podríamos citar las siguientes:

- a) Las herramientas con enfoques más clásicos (p.ej. *Drylab*), exigen conocer el número y la identidad química de los componentes de las mezclas a separar. Es decir, todos los picos de la mezcla deben ser trazables en los cromatogramas.
- b) La estrategia casi universal está basada en el concepto de resolución crítica o en funciones de suma ponderada que tratan de transformar los objetivos del cromatografista en un escalar.
- c) Las estrategias basadas en la resolución de todos los picos de la mezcla como criterio de optimización no aprovechan las ventajas

de los detectores de masa, cada vez más extendidos en los laboratorios analíticos.

Vamos a analizar estas tres causas y tratar de aportar algunas ideas renovadoras que puedan proporcionar a los programas para el desarrollo de separaciones en LC un interés y utilidad adaptados a la situación de trabajo actual del químico analítico.

El problema de la información acerca de los componentes de la mezcla a separar.

Sin duda, ha sido la mayor limitación asociada a los programas de desarrollo de métodos en LC. Sistemáticamente obviada en las publicaciones relacionadas con esta temática, lo cierto es que supone un factor crítico que se hace aún más problemático cuando se considera el segundo de los elementos anteriormente citado (el recurso a la resolución crítica como criterio básico de optimización). Es cierto que no siempre nos interesan todos los componentes de la mezcla y que solo algunos de ellos deben ser cuantificados, pero, también es cierto que para poder evaluar cualquier separación debemos tomar en cuenta todos los componentes de la mezcla. De otro modo, es imposible generar un modelo matemático de la retención para los componentes de la mezcla (que por cálculo proporciona las posiciones de los picos en otras situaciones diferentes de elución y con ello, proporciona el mecanismo de optimización), ni tampoco medir la resolución crítica. Los componentes no identificados no serán modelados y, por tanto, será imposible saber cuál es su posición y cómo afectan a aquellos otros que si son conocidos y que necesitamos cuantificar.

Sin embargo, admitamos que en muchos casos el conocimiento acerca de la composición de las muestras a separar es incompleto y que, esas muestras, por tanto, quedarán excluidas de un tratamiento mediante las herramientas comerciales más clásicas. Podría pensarse que tales tipos de muestras son minoría, pero en realidad no es así. En la práctica las muestras para las que se conoce con suficiente exactitud la composición suelen estar asociadas a procesos de control de calidad, pero en otros muchos procesos de gran importancia (p.ej. en la industria farmacéutica que es, probablemente el mayor consumidor de LC, los estudios de estabilidad y sobre todo la evaluación de los ensayos que proporcionan los departamentos de Discovery, están claramente enmarcados en el segundo grupo).

A finales de la primera década de este siglo apareció una nueva herramienta comercial (Fusion QbD), que prometía abordar de manera eficaz por primera vez el problema de la exigencia de conocimiento acerca de la composición de las muestras^{5,6,7} y que acuñaba los conceptos de picos *named* y *unnamed* para diferenciar dos tipos de abordaje a los problemas de desarrollo de las separaciones.

La estrategia de picos *con nombre* correspondía a un enfoque clásico, utilizando modelos matemáticos para las características de la separación, mientras que la otra requería un nuevo enfoque, puesto que aquí no es posible desarrollar un modelo de retención ya que los picos no son trazables en los cromatogramas.

Además, los cambios de la selectividad que, por lo general, se producen durante la etapa de optimización y que son la clave para lograr la separación de los componentes de las mezclas tampoco pueden ser seguidos, ya que las posiciones de los picos no pueden ser trazadas. En consecuencia, la optimización debe basarse en información que pueda ser derivada directamente de los cromatogramas registrados, proponiéndose para tal fin medidas como son:

- 1) El número total de picos visibles en el cromatograma,
- 2) El número de pares de picos que exhiben una buena resolución (p.ej. mejor que 1.5),
- 3) El número de picos con buena simetría,
- 4) El pico de área máxima, o
- 5) El tiempo necesario para eluir todos los componentes de la mezcla, etc.

Es lo que en Fusion QbD se denominan las respuestas tendencia⁸ (*trend responses basadas bien en el número de picos, o en características medidas en los picos, que soportan directamente el desarrollo de métodos y los experimentos de screening de columnas y/o disolventes en HPLC*, un concepto que, al igual que el tratamiento de los datos generados, fue patentado por los autores), a las cuales puede ajustarse un modelo de regresión que, de este modo se adaptaría a los objetivos del cromatografista, como por ejemplo: separar todos los picos de la mezcla, aunque su número y naturaleza sean desconocidos; resolverlos tanto como sea posible, lograr que los picos sean simétricos y

fáciles de integrar y hacerlo en el menor tiempo posible.

Una de las ventajas relevantes de Fusion QbD es que se trata de una herramienta que se comunica directamente con el instrumento, de modo que los experimentos generados son comunicados y ejecutados sin apenas participación del usuario. Por otra parte, los ejemplos que proporcionan los manuales de la herramienta⁹ muestran resultados muy satisfactorios para esta estrategia, aunque llama la atención el hecho de que las mezclas que se utilizan no presentan cambios en la selectividad para los diferentes experimentos y solo la retención cambia. Claro que, si no hay cambios en la selectividad tampoco haría falta una herramienta computarizada. Cualquier analista sin demasiada experiencia lograría optimizar ese tipo de separación en 3 o 4 inyecciones. Por tanto, cuando hacia 2015 empezamos a trabajar con el programa, decidimos someterlo a una prueba un poco más exigente y para ello preparamos una mezcla de 20 componentes, algunos de los cuales presentaban proporciones detectables de impurezas, de modo que, en los cromatogramas, al menos, era previsible encontrar 20 picos. No se registraron los espectros de los componentes y las muestras se trataron como totalmente desconocidas. Se utilizó una columna phenyl-hexyl estándar de 5 x 0.46 cm, con partículas de 2.6 micras, considerando fases móviles ternarias acuosas con metanol y acetonitrilo como modificadores. La temperatura de columna se consideró como una variable adicional en el diseño experimental que, por tanto, incluía tres variables: a) el tiempo de gradiente a dos niveles (20 y 60 minutos), la temperatura (30 y 55 °C) y la proporción de ACN en el disolvente B, oscilando entre 0 y 100%.

El diseño experimental propuesto por el programa fue un diseño compuesto centrado en caras que requiere 15 experimentos y dos réplicas adicionales en el punto central. Las gráficas de la figura 1 muestran, a modo de ejemplo, la bondad de ajuste correspondiente a tres de las *respuestas tendencia* utilizadas: a) el número de picos; b) el número de pares con resolución mejor que 1.5 y c) el tiempo total de elución. Es fácil apreciar que solamente en el último caso el modelo ajusta satisfactoriamente los datos.

Una conclusión inmediata podría ser que esta aproximación solo es válida para problemas

relativamente simples, sin embargo, algunos otros test realizados con mezclas mucho más sencillas que la anterior, en cuanto al número de componentes, pero que también mostraban cambios en la selectividad de los picos de unos experimentos a otros, demostraron que el problema no está en la complejidad de las mezclas

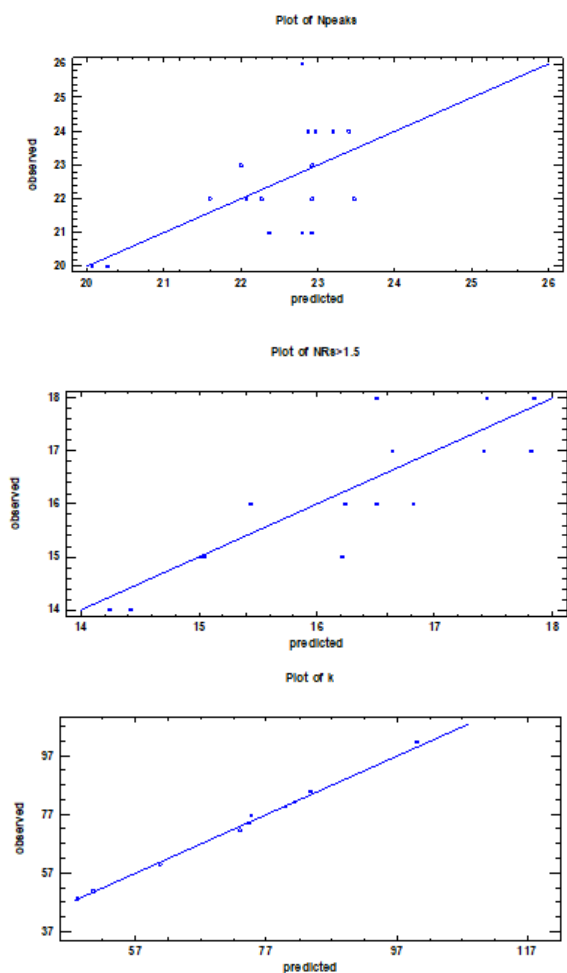


Figura 1. Gráficas de bondad de ajuste para los modelos de regresión generados a partir de las medidas de respuestas tendencia en la separación de una mezcla de 20 componentes no trazables.

El esquema de la Figura 2 muestra que, en realidad, las respuestas tendencia no siguen los cambios en la separación cuando aparecen modificaciones en la selectividad. Las tres situaciones representadas en esa figura corresponden a valores idénticos de las respuestas relativas al número de picos y el número de parejas con resolución mejor que 1.5 y, sin embargo, en el sistema están ocurriendo cambios notables de uno a otro experimento.

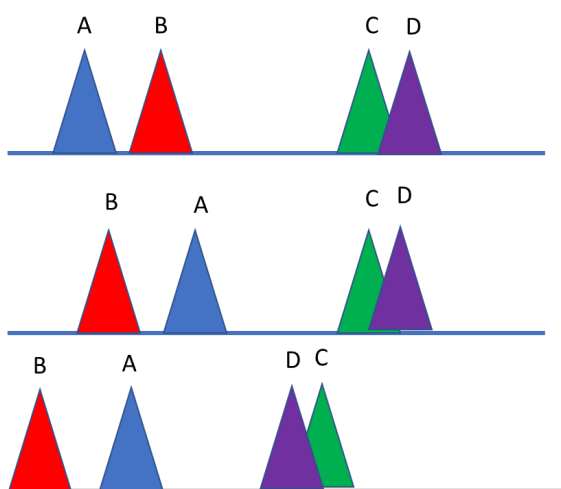


Figura 2. Tres situaciones en una separación para las que las respuestas tendencia no son capaces de apreciar los cambios producidos.

Más aún, es difícil aceptar que se puedan generar modelos de regresión satisfactorios cuando las variables solo pueden adoptar valores enteros, como es el caso de las respuestas tendencia mencionadas, excepto en el caso del tiempo total de elución, lo que no impide que la herramienta proponga resultados en forma de proyección de las intersecciones de las superficies de respuesta cuadráticas para las diferentes respuestas tendencia, tal y como se muestra en la Figura 3, de aspecto sumamente atractivo aunque poco creíbles, tal y como muestra la verificación experimental en la región del óptimo propuesto que está muy lejos de lograr separar los 20 componentes principales de la mezcla. Por tanto, parece poco probable que esta estrategia pueda realmente aportar soluciones a problemas reales en el laboratorio cromatográfico, con lo que volvemos a estar en el punto de partida.

A partir de ese momento empezamos a trabajar en una estrategia alternativa que pudiera aportar soluciones realistas al problema de las mezclas con componentes no trazables, y la solución vino de la mano de quimiometría y algunos de sus principios básicos.

Nuestra idea parte de asumir que la información de los componentes en la mezcla, aun siendo su composición desconocida, está presente en las señales espectrales registradas y, por tanto, el problema consiste en extraer dicha información y utilizarla para generar un modelo de retención convencional, en vez de recurrir a respuestas más o menos simplistas.

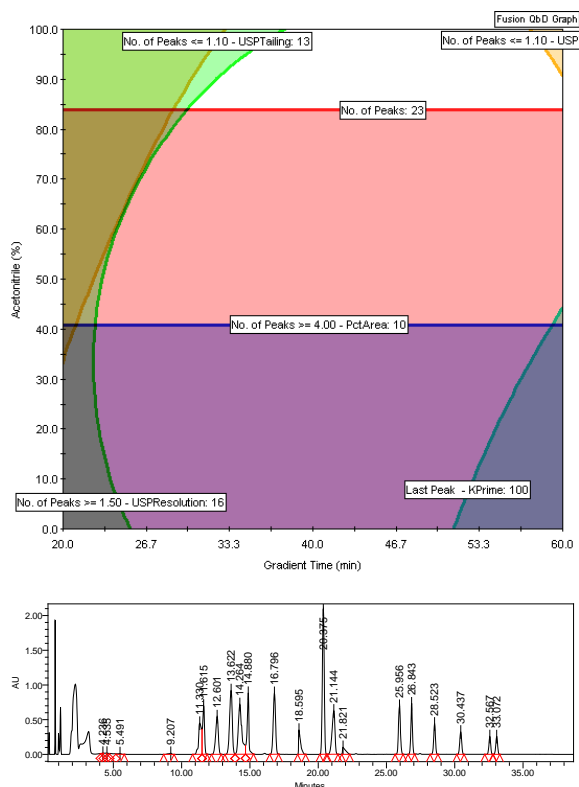


Figura 3. Gráfico de respuesta solapadas para gradientes a 55 °C en el ejemplo de separación de los 20 componentes. La región en color banco corresponde al óptimo propuesto por la estrategia. En la parte inferior se muestra una verificación experimental en dicha región

Obviamente, la extracción de la información espectral para los componentes de la mezcla no es trivial, excepto que en alguno de los cromatogramas todos los picos estuvieran perfectamente separados, en cuyo caso, ya habríamos resultado el problema de separación. Ahora bien, un diseño experimental apropiado no solo sienta las bases para la construcción posterior del modelo de retención, sino que debe maximizar las probabilidades de que los diferentes componentes aparezcan resueltos del resto de los componentes en alguno de los cromatogramas. Si a esto unimos una herramienta poderosa para la resolución de señales espectrales como es la Resolución Multivariada de Curvas por mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS), que ha demostrado su potencia y utilidad en múltiples problemas de importancia práctica⁹, podemos construir una herramienta realmente útil para la separación de mezclas no trazables.

Esquemáticamente el procedimiento tiene las siguientes etapas:

- 1) Se parte de un diseño experimental que exija un número razonable de inyecciones (en general, no más de 6-8 para estudiar la influencia de 2-3 factores en la separación).
- 2) Se registra el espectro-cromatograma en cada inyección en función del sistema detector disponible (DAD-UV y/o MS(+)) y/o MS(-)). Estas matrices de datos contienen la información acerca de todos los componentes de la mezcla.
- 3) Se detectan los picos en cada cromatograma (trabajando con señales de maxplot en el caso de los registros UV y de TIC para los registros MS), mediante un algoritmo estándar de captura de picos y corrección de línea base.
- 4) Se aplica sistemáticamente el algoritmo MCR-ALS a cada uno de los picos detectados en cada cromatograma. Estos picos pueden corresponder a picos bien resueltos que incluyen un solo componente o picos en los que diversos componentes aparecen solapados. De este modo, para cada cromatograma se dispondrá de una "colección" de espectros y perfiles de elución que representa a los compuestos en la mezcla.
- 5) Un análisis de correlación entre las colecciones de espectros y perfiles de los diversos cromatogramas permite identificar cada componente en cada cromatograma y localizar con exactitud su tiempo de retención. Obviamente, cuantas más señales espectrales sean disponibles más segura es la identificación de cada componente y, con ello, la fiabilidad del procedimiento, pero incluso disponiendo solo de los espectros UV pueden abordarse problemas de separación complejos¹⁰.
- 6) Con los tiempos de retención obtenidos se genera un modelo de retención y, a partir de ese punto, el problema es exactamente idéntico a los problemas clásicos de desarrollo de métodos.

Por tanto, la estrategia consiste en aceptar una de las premisas básicas de la quimiometría y utilizar sus herramientas para la extracción de la información latente en las señales que registramos en nuestros instrumentos de laboratorio.

El problema de las funciones objetivo.

Tal y como se mencionó en la introducción, durante décadas se ha recurrido a la resolución crítica como función objetivo esencial en el desarrollo de métodos cromatográficos. La idea es simple. Puesto que la resolución crítica es la resolución de la pareja

de picos peor resueltos en el cromatograma, resulta claro que, si esta es satisfactoria, el resto de los componentes de la mezcla estará igual o mejor separado y, consecuentemente, el conjunto de la separación será también satisfactorio. El uso de esta función objetivo deriva en la construcción de los denominados *mapas de resolución* que constituyen la salida gráfica fundamental de las herramientas de desarrollo convencionales.

Aceptando que la resolución crítica es una medida útil e intuitiva para el analista también es cierto que, detrás de ese concepto está la idea de que todos los picos del cromatograma deben ser separados, lo que no siempre es cierto y además, al menos el tiempo necesario para lograr la separación debe ser también tenido en cuenta. Esto deriva en la construcción de funciones de suma ponderada (las denominadas funciones de repuesta cromatográfica (CRFs), muchas de las cuales proceden de los años 80) o funciones de deseabilidad que, de un modo más o menos ortodoxo han venido siendo propuestas a lo largo de los años. El problema es ¿hasta qué punto esas funciones se adaptan realmente a los objetivos del cromatografista? y si, cuando lo hacen, prejuzgan el resultado que será obtenido. Un ejemplo, puede facilitar la comprensión de este problema.

Tomemos el caso de la función de respuesta cromatográfica propuesta por John Berridge a principio de los años 80¹¹.

$$CRF = \sum_1^L R_i + L^\alpha - \beta |t_A - t_i| - \gamma |t_1 - t_0|$$

Esta función reúne los diversos objetivos que un cromatografista puede desear al desarrollar un método de separación: el primer término suma las resoluciones de los pares de picos visibles en el cromatograma, el segundo contabiliza el número de picos y le aplica un coeficiente que favorece valores mayores de la función cuando el número de picos aumenta, el tercero penaliza la duración total del cromatograma mediante un nuevo coeficiente de ponderación y el cuarto, penaliza que el primer pico tarde demasiado en eluir, usando otro coeficiente. El resultado es siempre un escalar de modo que maximizando esta función debe lograrse optimizar la separación. El problema, sin embargo, está precisamente en

los valores que se asignan a los tres coeficientes de ponderación. Las gráficas de la Figura 4 muestran los óptimos obtenidos mediante esta función para un mismo problema de separación en eluciones isocráticas cuando se modifican ligeramente los valores de dichos coeficientes. Sería erróneo concluir que este tipo de funciones carecen de utilidad práctica. El problema está en su propia naturaleza y es fácil entenderlo al considerar el esquema de la Figura 5 que representa el comportamiento de una de estas funciones de suma ponderada (la más sencilla, contemplando únicamente dos coeficientes que afectan a las dos variables que definen los ejes del gráfico). Asumiendo que ambas variables son conflictivas, es decir, que no pueden ser maximizadas o minimizadas simultáneamente para localizar el óptimo, resulta obvio que los valores de los coeficientes definen en cada caso una familia de rectas que, durante del proceso de optimización, tenderán a un punto tangente en el límite de valores que denominamos frente Pareto. Es decir, una vez definidos los valores de los coeficientes, el "óptimo" está igualmente definido, aunque no sabemos dónde está, y si cambiamos dichos valores, también hemos cambiado el "óptimo", claro que tampoco sabemos a donde habrá ido a parar. La consecuencia es que la asignación de valores a los coeficientes prejuzga donde acabará el proceso de optimización independientemente de cómo desarrollemos dicho proceso, y está claro que no siempre la solución final será la más conveniente a nuestros objetivos, especialmente si el número de coeficientes crece, porque entonces resulta casi imposible estimar a priori cuáles serán las consecuencias de los cambios que introducimos en los coeficientes.

En realidad, la ventaja fundamental de este tipo de funciones es precisamente que producen siempre un escalas como resultado y, por tanto, es muy intuitivo seguir el proceso de optimización por maximización o minimización de dicha respuesta. Además, cuando la respuesta es un escalas, simplemente debemos añadir una dimensión al problema (la propia respuesta) de manera que la gestión de la optimización solo requiere un espacio, el de las variables de operación más la respuesta, que siempre es más sencillo e intuitivo de manejar. Adicionalmente, el "óptimo" es singular, lo que se adapta mejor a la mentalidad general. En cambio, a la vista de los datos anteriores parece claro que resulta fácil sesgar dicho resultado sin que el

operador sea consciente de ello y, por tanto, resultan poco objetivos.

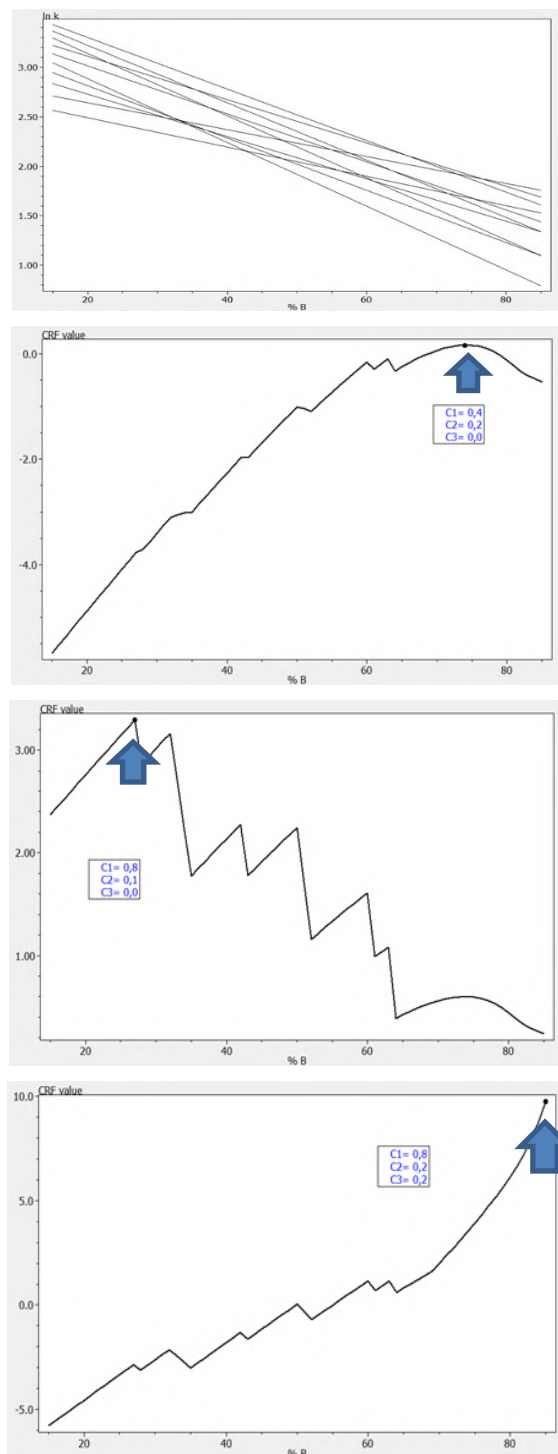


Figura 4. Consecuencias del cambio en los valores de los coeficientes de ponderación en la detección del óptimo para una separación isocrática.

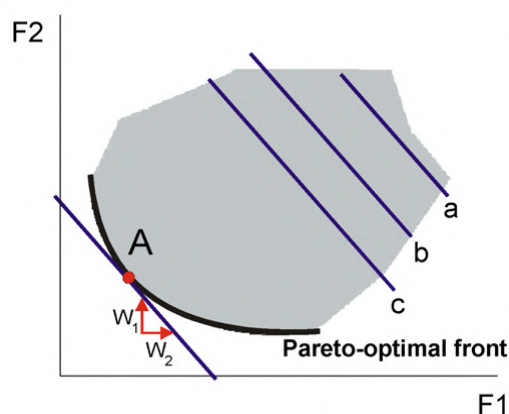


Figura 5. Influencia de los coeficientes de ponderación (w_1 y w_2 en la figura) sobre la localización del óptimo en el frente Pareto.

Nuevamente, aceptando que la optimización de separaciones cromatográficas es siempre un problema de tipo multiobjetivo, nuestro enfoque ha consistido en abordar el problema con una estrategia claramente distinta, y ya a principios de los años 2000 propusimos por primera vez utilizar con estos fines la optimalidad Pareto¹². En estas dos décadas hemos desarrollado esta herramienta hasta convertirla en una solución práctica en manos del cromatografista.

En optimalidad Pareto, se manejan siempre dos espacios, el espacio de las variables de operación (las que definen en qué condiciones se realizan los experimentos) y el espacio de las respuestas, tal y como se representa en la Figura 6. Por tanto, ahora no se intenta transformar los objetivos en un escalar. Cada experimento produce un vector de resultados. Si los objetivos son conflictivos (por ejemplo, la resolución y el tiempo de elución con mucha frecuencia), existirá una región límite de respuestas, el frente Pareto (Figura 5) y entonces no existe “un óptimo” sino “un conjunto de soluciones óptimas”, entre las cuales, tendremos que seleccionar, a posteriori, la(s) más satisfactoria(s), usando incluso otros criterios adicionales.

De este modo, es posible para el cromatografista utilizar un lenguaje natural sin tenerse que preocupar de ecuaciones o coeficientes, simplemente porque no existen, por ejemplo, indicando que funciones objetivo desea incluir en el problema entre las siguientes:

- Resolución crítica
- Suma de resoluciones para los pares de picos visibles

- Número de picos visibles
- Tiempo total de elución
- Resolución para un par de picos específico (tantas como sean necesarias)
- Ventana de resolución alrededor de un pico específico (las necesarias)
- Ventana de tiempo alrededor de un pico específico (las necesarias)
- Ventana de resolución genérica alrededor de los picos
- Ventana de tiempo genérica alrededor de los picos
-

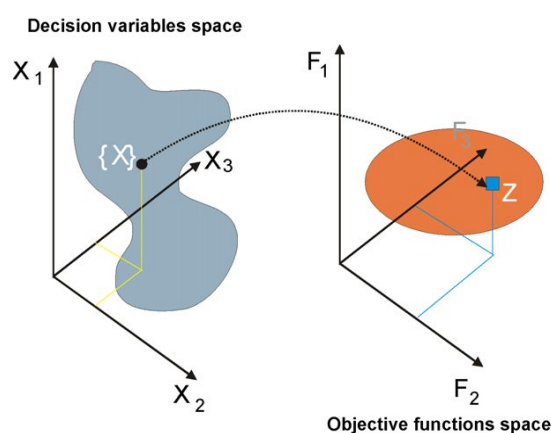


Figura 6. Espacios de decisión y objetivos en optimización multiobjetivo. La función del sistema mapea ambos espacios.

Cada una de estas funciones define una dimensión en el espacio de las respuestas, pero se maneja de modo completamente independiente a lo largo del proceso de optimización. Vemos además que, ahora es muy simple definir objetivos cuando no todos los picos en el cromatograma nos interesan. Además, es posible introducir restricciones en el problema y, nuevamente, el modo de hacerlo es realmente sencillo para el analista. Por ejemplo, es posible:

- Establecer un tiempo máximo para la elución del último pico
- Establecer un tiempo máximo para la elución del primer pico
- Establecer un límite de resolución crítica por debajo del cual el cromatograma no se considera factible
- Establecer un límite de retención para un pico específico (los necesarios)

- Establecer un límite en la ventana de resolución para un pico específico (los necesarios).

Es fácil apreciar que algunas funciones pueden ser utilizadas tanto como “objetivos” como “restricciones” y eso no supone un problema porque el usuario no necesita combinar esa información mediante ningún tipo de ecuación. Por ejemplo, el tiempo total de elución puede utilizarse como objetivo en cuyo caso las separaciones tenderán a minimizar esa función, pero puede fijarse un valor máximo de manera que los cromatogramas en los que algún pico eluya por encima de dicho valor serán considerados no factibles. El que un cromatograma sea declarado factible o no factible solo afecta el modo en que son tratados en el algoritmo de optimización (un algoritmo evolutivo en nuestro caso¹³), de modo que pasa completamente desapercibido para el usuario.

El resultado es que los objetivos de la separación y sus restricciones se definen en lenguaje natural, sin complejidades matemáticas y sobre todo, sin prejuzgar el resultado y finalmente, el usuario selecciona entre las soluciones que pertenecen al frente Pareto la que considera mas apropiada. La decisión es pues, a posteriori y los sesgos asociados a las funciones de suma ponderada son eliminados totalmente. En realidad, ya no hay ninguna razón para seguir utilizando las aproximaciones convencionales.

El problema de la adaptación al detector.

La tercera de las causas que citábamos inicialmente es el hecho de que tras la entrada masiva de los detectores de masa en los laboratorios analíticos el objetivo genérico de lograr la separación de todos los picos en la mezcla ya no es realista en muchos casos. En los 80, cuando se desarrollaron la mayor parte de las funciones de respuesta cromatográfica convencionales el detector universal era el UV y es lógico aceptar que ese objetivo fuera el más habitual en el trabajo práctico con HPLC.

Sin embargo, en la actualidad, los picos que no presentan interferencias espectrales en MS no tienen por qué ser resueltos entre sí de un modo particular. En consecuencia, era necesario desarrollar alguna función objetivo que permitiera adaptar los procesos de desarrollo de métodos y optimización a esa nueva realidad.

Nuestra aportación en este aspecto fue el desarrollo del concepto de la matriz de selectividad¹⁴ como

una función objetivo en los procesos de optimización cuando el sistema instrumental dispone de un detector de masa.

La matriz de selectividad es una matriz que traduce en términos de resolución entre pares de picos las interferencias espectrales de dichos picos en sus iones de cuantificación y cualificación. Desde un punto de vista práctico la representamos gráficamente como un mapa de colores que indican (del blanco al rojo) la exigencia de resolución para cada pareja de picos (Figura 7).

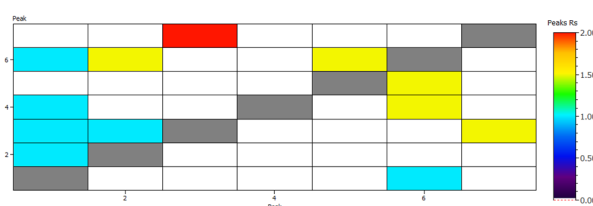


Figura 7. Representación gráfica de la matriz de selectividad para un problema de separación que implica 7 componentes.

Las celdas en blanco en la gráfica indican que no es necesario separar esos componentes entre sí. Por el contrario, cuanto mas color (tendiendo hacia el rojo, de acuerdo con la escala a la derecha) presenta una celda significa que esa pareja debe resolverse porque existen interferencias espectrales. En consecuencia, la matriz representa un objetivo de separación y siempre y cuándo dicho objetivo se cumpla, el tiempo de elución puede reducirse tanto como sea posible. De hecho, utilizamos un proceso de optimización Pareto que considera dos dimensiones en el espacio de los objetivos: a) la matriz de selectividad, y b) el tiempo de elución. Los resultados se presentan de modo que el usuario pueda seleccionar las soluciones mas favorables de una manera simple y eficiente (Figura 8).

El frente Pareto es interactivo y la selección de las soluciones en el mismo se traduce en una simulación de la separación y una imagen del grado de cumplimiento obtenido para la matriz de selectividad, que adopta un aspecto completamente similar al utilizado para la propia definición de la matriz.

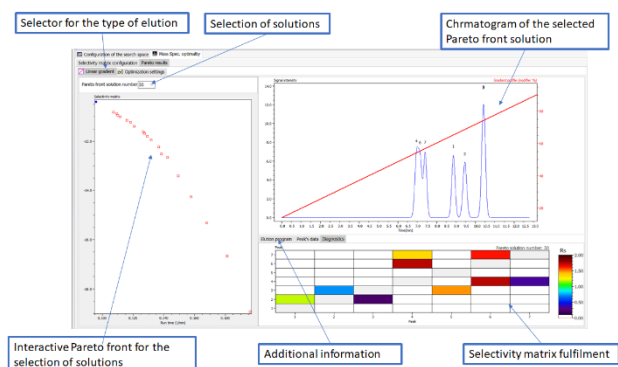


Figura 8. Gestión de las soluciones en el frente Pareto y expresión de la calidad de las mismas.

En el caso ideal, el gráfico de diagnóstico debería presentar todas las celdas de color blanco, lo que significaría que las exigencias propuestas por la matriz de selectividad se han cumplido o superado. Por el contrario, la presencia de celdas con color indica que dichas exigencias no se han cumplido solo en parte, o no se han cumplido en absoluto, para la pareja de picos a la que corresponde la celda en el gráfico. Por tanto, es muy intuitivo valorar el éxito de la separación y con ello, la bondad de la solución considerada.

Se trata pues de alternativas a las aproximaciones clásicas que tratan de adaptar la herramienta al tiempo actual y a las facilidades que hoy tenemos en los laboratorios cromatográficos. Nuestra opinión es que de esta manera se logrará que este tipo de herramientas vuelvan a despertar el interés de los analistas porque apreciarán que les son de utilidad en su trabajo día a día.

Agradecimientos:

Los diversos estudios que se han citado en esta presentación han sido desarrollados mediante la financiación obtenida tanto del Ministerio de Ciencia como de la Comunidad Autónoma de Galicia a través de diversos proyectos y, en la mayoría de los casos, con participación de los fondos FEDER de la U.E. En ellos, han participado diversos componentes del grupo de investigación ChromChem de la Universidad de Santiago y, durante los últimos 6 años, la empresa Mestrelab Research S.L ha participado activamente en los mismos, y posee los derechos de explotación exclusiva, sí como del código informático que transforma estos estudios en una herramienta práctica.

Referencias:

- [1] OPTIM II, Spectra-physics Technical Bulletin D/S-01, Darmstadt-Kranichstein, GE, 1985.
- [2] R.D. Conlon, The Perkin-Elmer Solvent Optimization System, *Internat. Instr. Res.*, September 1985, 77-81.
- [3] I. Molnár, H.J. Rieger, R. Kormány, 'Chromatography Modelling in High Performance Liquid Chromatography Method Development', *Chromatogr. Today*, **6**(1), 3-8 (2013).
- [4] http://www.acdlabs.com/products/com_iden/meth_dev/
- [5] <http://www.smatrix.com/>
- [6] Krull, M. Swartz, J. Turpin, H. Lukulay, R. Versepup, 'A Quality-by-Design Methodology for Rapid LC Method Development, Part I', *LC-GC N. Am.*, **26**, 1190-1197 (2008).
- [7] Krull, M. Swartz, J. Turpin, H. Lukulay, R. Versepup, 'A Quality-by-Design Methodology for Rapid LC Method Development, Part II', *LC-GC N. Am.*, **27**, 48-61 (2009).
- [8] M. Swartz, I. Krull, J. Turpin, H. Lukulay, R. Versepup, 'A Quality-by-Design Methodology for Rapid LC Method Development, Part III', *LC-GC N. Am.*, **27**(4), 328-339 (2009).
- [9] LC Method Development Tutorial, S-Matrix Corp.(V 9.7).
- [10] A. de Juan, S.C. Rutan, R. Tauler, Two-way data analysis: multivariate curve resolution - iterative resolution methods. In S.D. Brown, R. Tauler, W. Walczack, editors. *Comprehensive chemometrics*, vol 2, Amsterdam, Elsevier, 2008, pp. 325-344.
- [11] R. Cela, S Triñanes, C. Cobas, A new strategy for the computer-assisted development of reversed-phase liquid chromatography separation methods of unknown sample mixtures, *Anal. Bioanal. Chem.*, 414, 587-600 (2022).
- [12] J.C. Berridge, 'Automated Multi-Parameter Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Separations Using the Sequential Simplex Procedure', *Analyst*, **109**, 291-293 (1984).
- [13] R. Cela, J.A. Martinez, C. Gonzalez-Barreiro, M. Lores, 'Multi-Objective Optimization Using Evolutionary Algorithms: Its Application to HPLC Separations', *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **69**, 137-156 (2003).
- [14] Robic T, Filipic B. DEMO: differential evolution for multi-objective optimization. In: Coello C. et al. editors, *EMO 2005*, LCNS 3410. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2005. p. 520-533.
- [15] J. García-Lavandeira, B. Losada, J.A. Martinez-Pontevedra, M. Lores, R. Cela, 'Computer-Assisted Method Development in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: New Proposals', *J. Chromatogr. A*, **1028**, 116 - 125 (2008).