

Optimizarea Fazei Mobile la Separarea Cromatografică cu Amestecuri de Trei Solvenți

Introducere

Optimizarea fazei mobile la separarea cromatografică cu amestecuri de trei solvenți este posibilă atunci când numărul determinărilor experimentale ale parametrilor de separare pentru fiecare compus separat în parte se efectuează pentru un număr de compoziții distincte ale fazei mobile cel puțin egal cu numărul de variabile ale modelului matematic [1,2].

Model Matematic

Se presupune într-un amestec de trei solvenți mărimea cantitativă a parametrului cromatografic ales depinde de compoziția fazei mobile printr-o ecuație de dependență de una din cele 2 forme:

$$M6(x_1, x_2, x_3) = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3 \quad (1)$$

$$M7(x_1, x_2, x_3) = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3 + a_7x_1x_2x_3 \quad (2)$$

unde x_1 , x_2 , x_3 sunt fracțiile molare ale celor 3 solvenți ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$), M6 și M7 sunt estimatori și apoi predictorii ai parametrului cromatografic ales iar a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , a_5 , a_6 și a_7 sunt coeficienți care sunt întâi determinați pe baza celei mai bune estimări a parametrului cromatografic ales iar apoi sunt folosiți pentru a prezice valorile acestui parametru pentru orice compoziție a fazei mobile.

Parametrii cromatografici care au fost modelați utilizând ecuațiile (1) și (2) sunt:

- $RF(i,e) = l(i)/l(e) \quad (3)$

unde i este unul din compușii de separat, e este eluentul folosit ca fază mobilă, $l(i)$ este coordonata la care a migrat în eluentul e , $l(e)$ este coordonata la care a migrat eluentul, iar RF este șirul factorilor de retenție ai compușilor de separat pentru eluentul e ;

- $RS(i,j,e) = 2*(l(i)-l(j))/(w(i)+w(j)) \quad (4)$

unde i , j sunt doi compuși de separat, $w(i)$ și $w(j)$ sunt lățimile petelor compușilor, iar RS este matricea rezoluțiilor calculate pentru separarea compusului i de compusul j ;

- $RSO(i,e) = 2*(l_0(i)-l_0(i+1))/(w(i)+w(i+1)) \quad (5)$

unde $lo(i)$ este a i -a coordonată de migrare în lista ordonată a lungimilor de migrare iar RSO este matricea rezoluțiilor ordonate pentru separarea compușilor consecutivi;

$$\bullet \text{ Sm}(e) = \sqrt{(\sum_j (\Delta RFT - \Delta RF(j,e))) / (n+1)} \quad (6)$$

unde n este numărul de compuși de separat, ΔRFT este factorul de retenție ideal în separare ($1/n$), $\Delta RF(j,e)$ este diferența a i -a între 2 factori de retenție consecutivi în lista ordonată a factorilor de retenție, iar Sm este separarea medie înregistrată pentru eluentul e ;

$$\bullet \text{ RSA}(e) = \sum_j \text{RSO}(j,e) / n \quad (7)$$

unde RSA este rezoluția medie a separării folosind eluentul e ;

$$\bullet \text{ RRP}(e) = \prod_j \text{RSO}(j,e) / \text{RSA}(e) \quad (8)$$

unde RRP este produsul ponderat cu media rezoluțiilor în separarea folosind eluentul e ;

$$\bullet \text{ Inf}(e,m) = \sum_k (n_k/n) \log_2(n_k/n) \quad (9)$$

unde n_k este numărul de compuși care migrează în al k -lea interval echidistant din cele m în care a fost împărțită întreaga lungime de migrare $l(e)$ iar Inf este un factor de calitate al separării calculat după metoda Logit și care se anulează pentru o separare ideală;

$$\bullet \text{ FOB}(e,m) = \sum_j a_j F_j(\text{Sm}(e), \text{Inf}(e,m), \text{RSA}(e), \text{RRP}(e)) \quad (10)$$

unde $1 \leq j \leq 4$, F_j sunt funcții care exprimă fiecare câte o expresie de cei 4 parametrii, a_j sunt coeficienți aleși arbitrar sau printr-o relație de ponderare definită matematic, iar FOB este o funcție obiectiv ce caracterizează separarea cu eluentul e în raport cu alegerea coeficienților a_j , a funcțiilor F_j și respectiv a numărului de intervale m .

Prin aplicarea uneia dintre ecuațiile (3-10) pentru un șir de p experimente, rezultă o matrice MOB cu una (ecuațiile 6-10) sau mai multe linii (ecuațiile 3-5) și totdeauna p coloane, câte una pentru fiecare experiment, ale cărei elemente reprezintă valorile parametrului cromatografic care se modelează folosind una din ecuațiile (1) sau (2). Pentru ca algoritmul de optimizare să aibă o soluție unic determinată este necesar ca $p \geq 6$ pentru ecuația (1) și respectiv $p \geq 7$ pentru ecuația (2).

Pentru fiecare linie a matricei MOB se construiește un sistem de p ecuații liniare cu 6 sau 7 termeni (ecuația 1 și respectiv ecuația 2) în coeficienții a_i în forma:

$$\text{MOB}(j) = a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_4 x_1 x_2 + \dots \quad (11)$$

unde x_i sunt fracțiile molare ale fiecărui solvent ($i = 1, 2, 3$) ce intră în compoziția eluentului e_j ($j = 1, 2, \dots, p$).

La sistemul de ecuații liniare de forma (11) se aplică metoda celor mai mici pătrate pentru construirea sistemului de ecuații cu soluție unic determinată MMCP, care se obține după formula:

$$\text{MMCP}(k,0) = \text{M2}(\text{MOB},A(k)), \text{MMCP}(k,1) = \text{M2}(A(k),A(1)) \quad (12)$$

unde $k,l = 1, 2, \dots, 6$ (ecuația (1) sau 7 pentru ecuația (2)), $A(k)$ este șirul termenilor cunoscuți din ecuația (11), M2 calculează media pentru produsul șirurilor MOB și $A(k)$, iar MMCP este matricea extinsă a sistemului de ecuații liniare ce servește la determinarea coeficienților a_k .

Se aplică metoda Gauss pentru determinarea soluției sistemului (12). Fie $A0 = (a_{01}, a_{02}, \dots, a_{06})$ soluția acestui sistem (sau $A0 = (a_{01}, a_{02}, \dots, a_{07})$ pentru cazul ecuației (2)).

Odată determinați coeficienții $A0$ se folosesc valorile acestora pentru a efectua predicția parametrului cromatografic folosind din nou una din ecuațiile (1) și (2) și anume cea pentru care s-au determinat coeficienții.

Fie Y parametrul cromatografic ales. Dacă matricea MOB (predictorul lui Y) are mai mult de o linie, și atunci și estimatorul lui Y are mai mult de o linie. Dacă z este numărul de linii al matricei MOB (și implicit numărul de predictor) atunci putem exprima estimatorul parametrului cromatografic ales \hat{Y} sub forma unui șir:

$$\hat{Y} = (\hat{y}_1, \dots, \hat{y}_z) \quad (14)$$

Optimul se obține prin aplicarea unei funcții de maxim sau de minim (cum este caracterizarea unei separări de mai mulți compuși prin cea mai proastă separare a doi compuși ai acesteia):

$$\hat{y}_o = \text{opt}(\hat{Y}), \text{unde } \text{opt} = \text{"max"} \text{ sau } \text{opt} = \text{"min"} \quad (15)$$

Parcurgând întreg domeniul de valori posibile pentru compoziția fazei mobile se identifică punctul de optim și anume compoziția optimă a fazei mobile (x_1, x_2, x_3):

$$(:, :) | \hat{Y}(:, :) = \text{opt} \{ \hat{Y}(i/100, j/100, k/100) | i=0..100, j=0..100-i, k=100-i-j \} \quad (16)$$

Interfața Programului

Pentru a implementa optimizarea fazei mobile la separarea cromatografică cu amestecuri de trei solvenți s-a creat un pachet de programe PHP (Pre Hypertext Processed) care asigură o maximă portabilitate [3]. Astfel, programul de optimizare poate fi executat de pe orice calculator care este legat la Internet de la adresa:

http://vl.academicdirect.org/molecular_dynamics/mobile_phase_opt/

Trei programe (op1.php, op2.php, op3.php) asigură interfața pentru introducerea datelor experimentale și selecția modelelor folosite.

Astfel, programul *op1.php* permite specificarea celor trei solvenți folosiți și a compușilor care se dorește a fi separați (dacă aceștia sunt cunoscuți). Aceste informații nu afectează modul de calcul pe

care se bazează optimizarea, ci sunt folosiți numai pentru ușurarea manipulării interfeței programului și prezentarea rezultatelor optimizării.

Rezultatul alegerii este transmis programului *op2.php* care dintr-o listă de 10 compoziții ale fazei mobile experimente permite utilizatorului să aleagă exact acele experimente pe care le-a efectuat.

Programul *op3.php* conține ultima interfață pentru introducerea datelor măsurate. Aici pentru fiecare experiment se cere distanța pe care a migrat eluentul și pentru fiecare compus se cere distanța pe care a migrat acesta și lărgimea spotului cromatografic.

Alegerea modelului matematic și a parametrului cromatografic folosite este posibilă în orice combinație dintre modelul cu 6 și cel cu 7 termeni și respectiv funcție obiectiv, rezoluție sau factor de retenție.

Programul *op4.php* efectuează toate calculele solicitate și afișează rezultatele în forma:

- Nume parametru cromatografic;
- Ecuația modelării parametrului cromatografic;
- Valorile parametrului cromatografic ce rezultă din experiment din aplicarea formulelor de calcul ale acestuia, pentru fiecare experiment ales și fiecare compus, pereche de compuși sau sub-funcție obiectiv (vezi modelul matematic);
- Valorile parametrului cromatografic ce rezultă din modelare în aceeași succesiune ca pentru valorile ce rezultă din experiment;
- Lista valorilor prezise de model pentru valorile parametrului cromatografic pentru toate valorile posibile ale compoziției fazei mobile cu un increment de o unitate procentuală de compoziție;
- Compoziția optimă calculată de model și valoarea prezisă a parametrului cromatografic în acest punct;
- O cale de acces către un alt program (*graph.php*) care reprezintă grafic sub formă de suprafață de nivel dependența parametrului cromatografic prezis în funcție de compoziția fazei mobile folosind 4 specificații utilizator (care doi din cei trei solvenți sunt aleși pentru a reprezenta axele O_x și O_y , care este valoarea minimă a parametrului cromatografic care să apară pe graficul rezultat, și câte nuanțe intermediare de culoare între 2 culori de bază să fie folosite pentru reprezentarea suprafeței de nivel între valoarea minimă și valoarea maximă a parametrului cromatografic prezis); programul produce un grafic în format PNG (Portable Network Graphics);
- O cale de acces către salvarea rezultatelor în format text.

Implementare Software

Fișierele *data1.php*, *data2.php* și *data3.php* conțin tablouri uni- și bi- dimensionale a 3 experimente care pot fi folosite drept model în execuția programului de modelare.

Astfel, compușii, solvenții și distanțele de migrare ale eluenților sunt tablouri unidimensionale iar experimentele și rezultatele sunt tablouri bidimensionale. O notă aparte fac rezultatele, a căror implementare ca tablouri bidimensionale (compus vs. data) a fost preferată în favoarea celei naturale a acestora de tablouri tridimensionale (compus vs. experiment vs. data) pentru ușurarea manipulării acestora de către utilizator.

Transmiterea datelor între client (utilizator) și server (programe) se face cu precădere prin metoda POST, însă opțiunea de alegerea datelor model se face prin metoda GET.

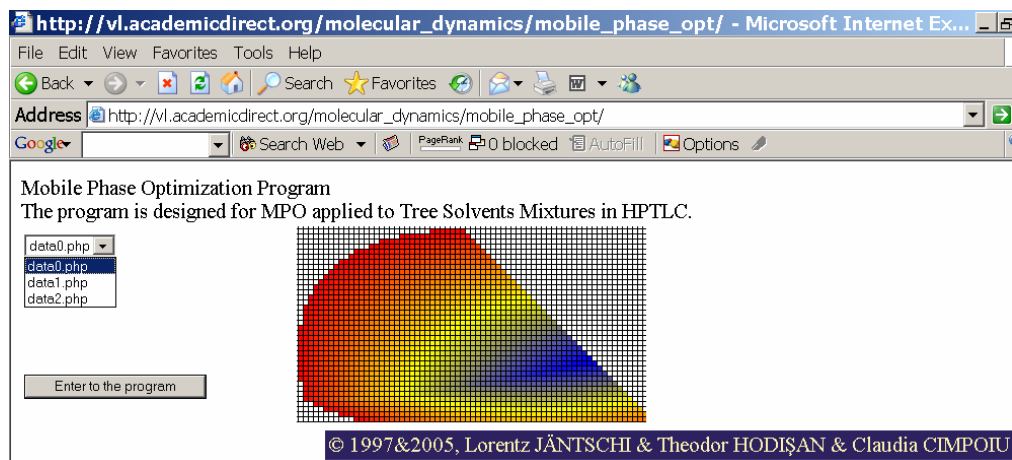
Nucleul principal al aplicație de optimizare este realizat de modulul *z_HPTLC_Models.php*:

- Funcția *MX_Model* întoarce un șir ale cărui valori sunt obținute din efectuarea înmulțirilor acolo unde este necesar conform modelului dat de ecuațiile (1) și (2);
- Funcția *MX_Put* folosește rezultatul dat de funcția *MX_Model* și valorile parametrului cromatografic pentru a construi sistemul de ecuații liniare dat de ecuația (11);
- Funcția *MX_System* folosește rezultatul dat de funcția *MX_Put* pentru a construi sistemul de ecuații liniare cu soluție unic determinată (12);
- Funcția *MX_Gauss* rezolvă sistemul de ecuații liniare (12) dat de funcția *MX_System* și întoarce valorile calculate ale coeficienților modelului (ecuația 13);
- Funcția *MX_Coefs* integrează funcțiile *MX_Put*, *MX_System* și *MX_Gauss* într-un modul care primește ca și date valorile parametrului cromatografic și valorile compoziției fazei mobile și produce valorile coeficienților modelului;
- Funcția *MX_Est* efectuează predicția valorilor parametrului cromatografic folosind datele calculate ale coeficienților modelului și o compoziție dată a fazei mobile;
- Funcția *Worst_RF* definește parametrul care caracterizează o separare modelată prin factorul de retenție ca parametru cromatografic; folosește un șir de valori calculate ale factorului de retenție pentru fiecare compus și întoarce ca valoare cea mai mică diferență care se înregistrează în acest șir;
- Funcția *Worst_RS* definește parametrul care caracterizează o separare modelată prin rezoluție ca parametru cromatografic; folosește un șir de valori calculate ale rezoluției o serie de perechi de compuși și întoarce ca valoare cea mai mică valoare din acest șir;
- Funcția *Worst_OB* definește parametrul care caracterizează o separare modelată prin funcție obiectiv; are o singură dată de intrare, valoarea funcției obiectiv și o întoarce pa aceasta ca valoare;

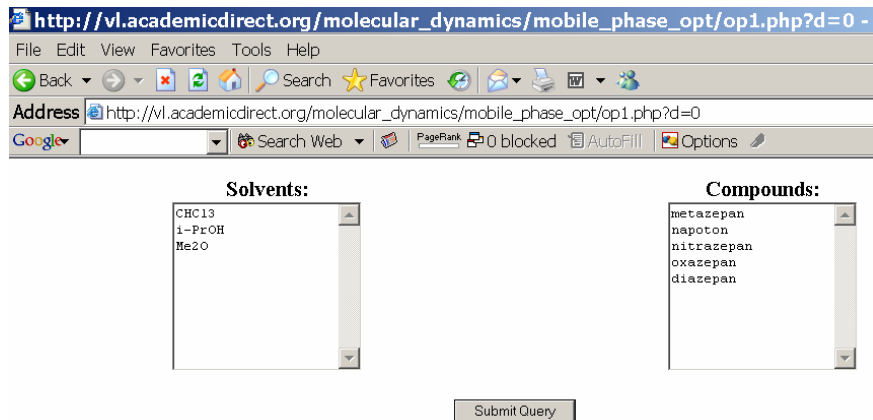
- Funcția f_{sm} implementează calculul separării medii dat de ecuația (6);
- Funcția f_{rsa} implementează calculul rezoluției medii dat de ecuația (7);
- Funcția f_{rrp} implementează calculul produsul ponderat cu media rezoluțiilor dat de ecuația (8);
- Funcția f_{inf} implementează calculul factorului de calitate al separării calculat după metoda Logit dat de ecuația (9);
- Funcțiile f_{obX} ($X=1,2,\dots$) implementează diferite funcții obiectiv date de ecuația (10).

Testarea Aplicației

- În figura următoare este redată interfața de intrare în aplicație:



- Alegerea solvenților și a compușilor este redată în figura următoare:



- Alegerea experimentelor este redată în figura următoare:

http://vl.academicdirect.org/molecular_dynamics/mobile_phase_opt/op2.php?d=0 - Microso...

File Edit View Favorites Tools Help

Back Forward Stop Home Search Favorites

Address http://vl.academicdirect.org/molecular_dynamics/mobile_phase_opt/op2.php?d=0

Google Search Web PageRank 0 blocked AutoFill Options

Experiments:

Experiment	Include	CHCl3	i-PrOH	Me2O
0	<input checked="" type="checkbox"/>	33.3%	33.3%	33.3%
1	<input checked="" type="checkbox"/>	10%	10%	80%
2	<input checked="" type="checkbox"/>	10%	80%	10%
3	<input checked="" type="checkbox"/>	80%	10%	10%
4	<input checked="" type="checkbox"/>	50%	0%	50%
5	<input checked="" type="checkbox"/>	50%	50%	0%
6	<input checked="" type="checkbox"/>	0%	50%	50%
7	<input type="checkbox"/>	0%	0%	100%
8	<input type="checkbox"/>	0%	100%	0%
9	<input type="checkbox"/>	100%	0%	0%

Compounds:

- metazepan
- napoton
- nitrazepan
- oxazepan
- diazepan

Solvents:

- CHCl3
- i-PrOH
- Me2O

Submit Query

- Introducerea rezultatelor experimentului și selecția modelelor se face ca în figura următoare:

http://vl.academicdirect.org/molecular_dynamics/mobile_phase_opt/op3.php?d=0 - Microso...

File Edit View Favorites Tools Help

Back Forward Stop Home Search Favorites

Address http://vl.academicdirect.org/molecular_dynamics/mobile_phase_opt/op3.php?d=0

Google Search Web PageRank 0 blocked AutoFill Options

Compound	Experiments results for solvents = (CHCl3, i-PrOH, Me2O)							
	33.3, 33.3, 33.3	10, 10, 80	10, 80, 10	80, 10, 10	50, 0, 50	50, 50, 0	0, 50, 50	
Mixture characteristic	pos, width	pos, width	pos, width	pos, width	pos, width	pos, width	pos, width	pos, width
metazepan	5.62, 0.39	4.92, 0.37	5.9, 0.39	3.38, 0.41	2.91, 0.43	6.07, 0.44	5.91, 0.51	
napoton	5.95, 0.38	5.42, 0.37	5.35, 0.49	3.84, 0.37	4.52, 0.47	6.3, 0.42	6.47, 0.42	
nitrazepan	6.12, 0.25	5.99, 0.39	6, 0.28	4.67, 0.22	5.6, 0.4	6.79, 0.38	6.64, 0.32	
oxazepan	6.32, 0.3	5.56, 0.49	5.91, 0.32	5.49, 0.28	5.97, 0.42	6.87, 0.33	6.99, 0.36	
diazepan	6.46, 0.32	5.99, 0.32	6.15, 0.35	5.77, 0.28	6.35, 0.36	7.03, 0.29	7.06, 0.47	
eluent	6.88	6.88	6.99	6.97	7.72	7.39	7.64	

Models:

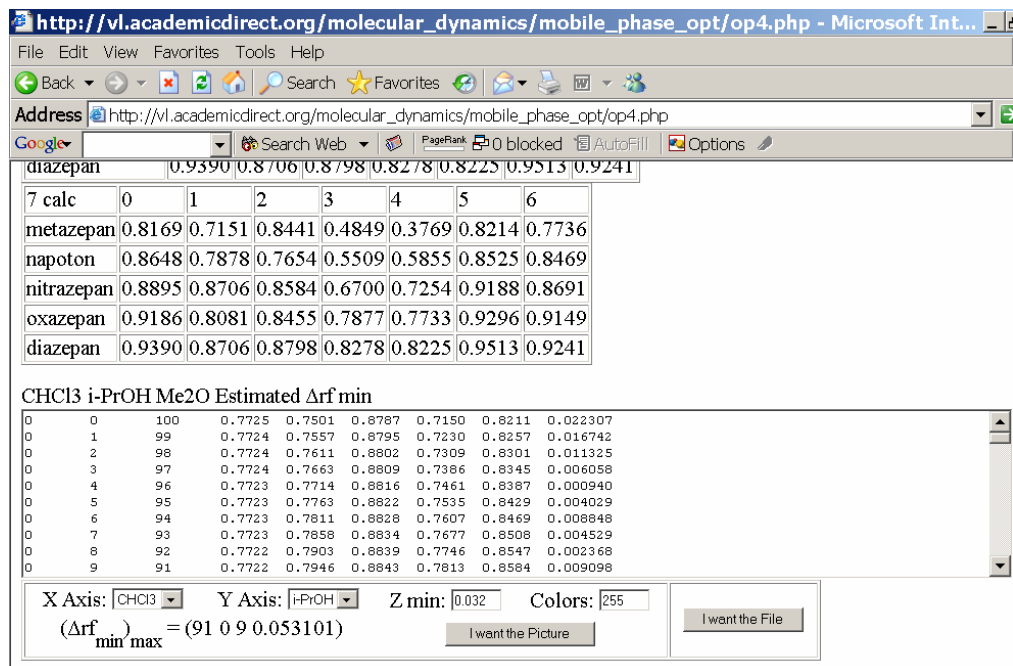
- $Y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3$
- $Y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3 + a_7x_1x_2x_3$

Data

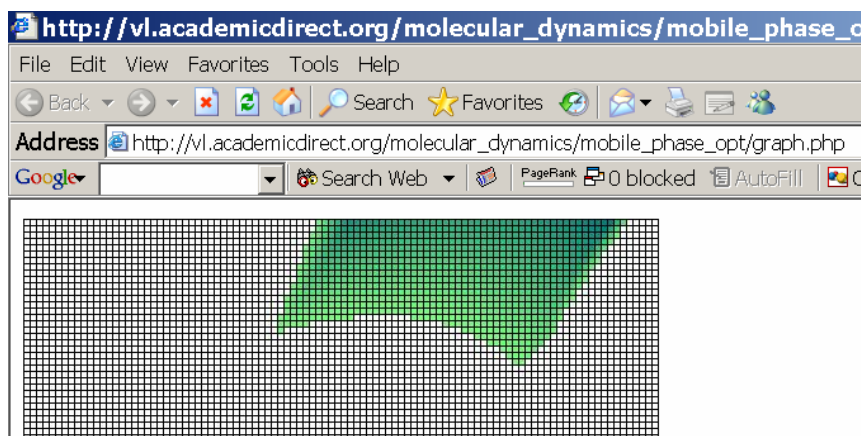
- FO
- RS
- RF

Submit Query

- Rezultatele pot fi vizualizate sub formă de suprafață de nivel accesând butonul *I want the Picture* din figura următoare:



- Graficul este generat de programul *graph.php*:



Referințe

1. Claudia CIMPOIU, Lorentz JÄNTSCHI, Teodor HODISAN, *A New Method for Mobile Phase Optimization in High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, *Journal of Planar*

Chromatography - Modern TLC, Budapest: Research Institute for Medicinal Plants in cooperation with Springer Hungarica, 11(May/June), 191-194, 1998, ISSN 0933-4173.

2. Claudia CIMPOIU, Lorentz JÄNTSCHI, Teodor HODISAN, *A New Mathematical Model for the Optimization of the Mobile Phase Composition in HPTLC and the Comparison with Other Models*, **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, Marcel Dekker Inc.**, 22(10), 1429-1441, 1999, ISSN 1082-6076.

3. Lorentz JÄNTSCHI, *Free Software Development. 1. Fitting Statistical Regressions*, **Leonardo Journal of Sciences, AcademicDirect**, Issue 1, 31-52, 2002, ISSN 1583-0233.