



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modelització de la retenció cromatogràfica

Axel Andrés Sanz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Barcelona

Universitat de Barcelona

Facultat de Química

Departament de Química Analítica

Programa de doctorat: Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

Modelització de la retenció cromatogràfica

Axel Andrés Sanz

Memòria de tesi doctoral presentada per a optar
al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de:

Dra. Elisabeth Bosch José, Dr. Martí Rosés Pascual
del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

Barcelona, setembre de 2015

La Dra. Elisabeth Bosch José i el Dr. Martí Rosés Pascual

CERTIFIQUEN

Que la present memòria de tesi doctoral, que porta per títol “Modelització de la retenció cromatogràfica”, ha estat realitzada sota la seva direcció pel Sr. Axel Andrés Sanz al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, setembre de 2015

Dra. Elisabeth Bosch José

Catedràtica del Departament
de Química Analítica de la
Universitat de Barcelona

Dr. Martí Rosés Pascual

Catedràtic del Departament
de Química Analítica de la
Universitat de Barcelona

AGRAÏMENTS

Si bé és cert que a la portada d'aquesta memòria hi ha el meu nom, no és menys cert que el mèrit d'aquesta tesi no és ni de bon tros només meu. Aquesta tesi no hagués estat possible sense l'ajuda de moltes persones, a les quals m'agradaria agrair l'esforç i els ànims que m'han proporcionat durant tots aquests anys.

Per començar, vull agrair als meus directors de tesi l'esforç que han realitzat al llarg de tota la tesi doctoral. A la Dra. Elisabeth Bosch li dono les gràcies per l'excel·lent tasca realitzada dirigint aquesta tesi a nivell científic però, sobretot, vull agrair-li especialment la seva constància i dedicació en fer un doctor de la meva persona, dia rera dia, des del moment que vaig acceptar fer el doctorat fins a aquests últims mesos. Al Dr. Martí Rosés vull agrair-li haver posat els seus amplis coneixements científics al servei de la tesi, fent evolucionar el treball realitzat en el bon camí i sabent-lo plasmar en tot moment tant en els articles publicats com en aquesta memòria. Moltíssimes gràcies als dos ja que sense el vostre esforç aquesta tesi difícilment s'hagués completat mai.

També m'agradaria agrair a la Dra. Clara Ràfols el seu extraordinari treball en la part de la tesi que fa referència a la lipofilicitat de fàrmacs, així com el seu suport i el seu interès en l'evolució d'aquesta tesi doctoral. Addicionalment, també m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Elisabet Fuguet i al Dr. Xavier Subirats per la seva ajuda i els seus consells sempre que els he necessitat.

Tampoc em vull oblidar dels que han estat els meus companys de laboratori durant tot aquest temps. Sempre he considerat que aquest grup de recerca era un molt bon lloc per fer la tesi doctoral i això, en gran part, és gràcies a tots vosaltres. Tenint en compte que sou molts no ompliré el que queda de pàgina amb tots els vostres noms (entre d'altres coses perquè segur que em deixaria a algú) però sí que m'agradaria destacar a un parell de persones que, després d'haver coincidit amb ells durant el transcurs de la tesi, els considero bons amics. Al Juanma li vull donar les gràcies per haver estat més que un simple company de laboratori a qui preguntar els dubtes, les incomptables converses que hem compartit, tant científiques com no científiques, han estat una constant durant aquests anys i sense elles probablement la tesi s'hagués fet

molt més pesada de fer. I a la Cristina, tot i que la seva estada al laboratori va ser més curta del que a mi m'hagués agradat, vull agrair-li el seu bon humor, les converses amenes i el bon rotllo en general que feia que les estones davant del HPLC es fessin més curtes.

Un altre paràgraf d'aquests agraïments el vull dedicar als Pelícanos. Vam fer la carrera junts, vam fer el Master i, tard o d'hora, els que no ho som encara acabarem sent doctors (esperem). Ja són molts anys de conèixer-nos, de converses i de vivències tant dins com fora de la facultat. Moltes gràcies per estar allà durant tot aquest temps. Ah, i gràcies també per donar-me diverses referències de com es presenta una tesi doctoral, que quan un és dels últims a presentar sempre és més fàcil.

I'd also like to show my gratitude to Dr. Gert Desmet and Dr. Ken Broeckhoven from the Vrije Universiteit Brussel not only for accepting me as a student for my PhD stay but also for making it a wonderful experience. I had a great time working in Brussels, I learned a lot of new concepts and procedures and, besides, I had the opportunity to summarize all the acquired knowledge in the review I'm including in this thesis, and that's mainly because of you. Many thanks for everything. Additionally, I also would like to thank my colleagues at the CHIS and SURF departments for making this PhD stay a really pleasant one.

A títol més personal, també m'agradaria agrair el suport i els ànims rebuts per la gent més important en la meua vida. Per una banda, vull donar les gràcies als meus pares per estar sempre interessats en el desenvolupament de la tesi, per recolzar-me en tot moment i per donar-me energies quan les necessitava. Tota ajuda sempre és bona però les vostres paraules sempre les tinc més en consideració que les d'altra gent, així que moltes gràcies per tot. A més, també m'agradaria donar les gràcies al meu germà ja que les hores de diversió que hem passat junts durant tots aquests anys han estat el complement perfecte a la feina que ha comportat la tesi doctoral.

I per l'altra banda, vull dedicar aquest últim paràgraf a donar les gràcies a la Marta. Hi ha milions de coses per les que et podria donar les gràcies però per mi totes queden resumides en una de sola: moltes gràcies per ser com ets. Ajudant-me sempre que has tingut la mínima opció de fer-ho o animant-me de forma incansable fins que he aconseguit treure aquesta tesi endavant, durant tots aquests anys m'has demostrat dia a dia que, sens dubte, el que més he d'agrair en aquesta tesi és haver-te tingut al meu

costat. Així doncs, vull agrair-te profundament el suport i l'ajuda que m'has donat durant tot aquest temps ja que, encara que ni en la memòria ni en la presentació no en quedi massa constància, per mi és una de les parts més importants d'aquesta tesi. Moltíssimes gràcies!!

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

A	Multiplicitat de camins (terme de l'equació de Van Deemter)
α	Coeficient de forma de la fase estacionària
α_{part}	Permeabilitat relativa de la partícula
a_s	Resolució de la força àcida (pendent de la correlació de pK_a entre solvent i aigua)
A_o	Àrea de pic corresponent a la fracció octanòlica
A_{st}	Àrea de pic corresponent a la solució patró
A_w	Àrea de pic corresponent a la fracció aquosa
a, b, c	Paràmetres del model de tres paràmetres
B	Difusió longitudinal (terme de l'equació de Van Deemter)
β_1	Constant de polaritzabilitat
b_s	Terme independent de la correlació de pK_a entre solvent i aigua
γ_{eff}	Difusió efectiva
C_m	Transferència de massa de la fase mòbil (terme de l'equació de Van Deemter)
C_s	Transferència de massa de la fase estacionària (terme de l'equació de Van Deemter)
D	Grau d'ionització
δ	Diferència experimental entre les escales absoluta i relativa de pH
D_{eff}	Coeficient de difusió efectiu
D_m	Coeficient molecular de difusió
DMSO	Dimetilsulfòxid
d_p	Diàmetre de partícula
D_{part}	Coeficient de difusió intra-partícula

D_{pz}	Coeficient de difusió en la zona porosa
ε	Porositat externa d'una columna cromatogràfica
EMT	<i>Effective medium theory</i>
ε_{part}	Porositat intra-partícula
ε_{pz}	Porositat en la zona porosa
ε_T	Porositat total d'una columna cromatogràfica
$E_T(30)$	Paràmetre de Dimroth-Reichardt
f	Relació entre la retenció de les formes ionitzada i neutra
F	Cabal de la fase mòbil
h	Alçada de plat reduïda
H	Alçada de plat
H_A	Contribució a l'eixamplament de banda del terme A
H_B	Contribució a l'eixamplament de banda del terme B
H_{C_m}	Contribució a l'eixamplament de banda del terme C_m
H_{C_s}	Contribució a l'eixamplament de banda del terme C_s
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
i	Coeficient que pren valor de +1 per àcids i -1 per bases
ISEC	<i>Inverse size-exclusion chromatography</i>
φ	Fracció de modificador orgànic
k o k'	Factor de retenció
k''	Factor de retenció zonal
k_A	Factor de retenció de la forma bàsica (desprotonada)
k_{HA}	Factor de retenció de la forma àcida (protonada)
k_I	Factor de retenció de la forma ionitzada
k_N	Factor de retenció de la forma neutra

L	Longitud de la columna
$\log D$	Coeficient de distribució
$\log D_{7.4}$	Coeficient de distribució a pH 7.4
$(\log k)_0$	Retenció en cas que la fase estacionària i la fase mòbil tinguin la mateixa polaritat
$\log P_{o/w}$	Coeficient de partició octanol-aigua
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
N	Nombre de plats teòrics
p	Paràmetre del model d'un paràmetre
p, q	Paràmetres del model de dos paràmetres
P_m^N	Paràmetre de polaritat de la fase mòbil
P_s^N	Paràmetre de polaritat de la fase estacionària
ρ	Coeficient entre el nucli sòlid i el radi de la partícula
r	Factor de dilució
RP-HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució en fase reversa
Sh_m	Nombre de Sherwood de la fase mòbil
Sh_{part}	Nombre de Sherwood de la partícula
σ_t^2	Variància temporal de pic
σ_x^2	Variància espacial de pic
t_0	Temps mort
t_D	Temps de residència
t_{park}	Temps d'aparcament
TPB	<i>Total pore blocking</i>
t_R	Temps de retenció

u	Velocitat lineal
u_0	Velocitat lineal de la fase mòbil
u_i	Velocitat intersticial
u_R	Velocitat lineal d'un anàlit retingut
UV-Vis	Ultravioleta-visible
v	Velocitat reduïda
v_0	Velocitat de la fase mòbil reduïda
v_i	Velocitat intersticial reduïda
$v_{inj(o)}$	Volum d'injecció de la fracció octanòlica
$v_{inj(st)}$	Volum d'injecció de la solució patró
$v_{inj(w)}$	Volum d'injecció de la fracció aquosa
V	Volum geomètric d'una columna
V_o	Volum de la fase octanòlica
V_w	Volum de la fase aquosa
w	Amplada de pic

ÍNDEX

OBJECTIU	1
ESTRUCTURA DE LA TESI	5
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)	19
1.1.1. Fase estacionària	
1.1.2. Fase mòbil	
1.2. Caracterització de columnes cromatogràfiques	23
1.2.1. Eficàcia	
1.2.2. Porositat	
1.2.3. Anàlisi pas a pas del rendiment cromatogràfic	
1.2.3.1. Terme B de l'equació de van Deemter	
1.2.3.2. Terme C de l'equació de van Deemter	
1.2.3.3. Terme A de l'equació de van Deemter	
1.2.4. Caracterització global	
1.3. Caracterització de fases mòbils cromatogràfiques	37
1.3.1. Estimació de la polaritat	
1.3.2. Mesura del pH	
1.3.3. Evolució del pH de la fase mòbil amb la fracció de modificador orgànic	
1.3.4. Evolució del pK_a de l'anàlit amb la fracció de modificador orgànic de la fase mòbil	
1.4. Retenció en cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)	45
1.4.1. Retenció de substàncies neutres	
1.4.1.1. Retenció en mode isocràtic	
1.4.1.2. Retenció en mode gradient	
1.4.2. Retenció de substàncies ionitzables	
1.4.2.1. Retenció en mode isocràtic	

1.4.2.2. Retenció en mode gradient	
1.5. Lipofilitat de compostos d'interès biològic i farmacèutic	57
2. PUBLICACIONS	63
<i>Article 1. Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: a step-by-step tutorial</i>	
<i>Article 2. Chromatographic models to predict the elution of ionizable analytes by organic modifier gradient in reversed phase liquid chromatography</i>	
<i>Article 3. Gradient retention prediction of acid-base analytes in reversed phase liquid chromatography: a simplified approach for acetonitrile-water mobile phases</i>	
<i>Article 4. Prediction of the chromatographic retention of acid-base compounds in pH buffered methanol-water mobile phases in gradient mode by a simplified model</i>	
<i>Article 5. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts</i>	
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	119
3.1. Caracterització sistemàtica de columnes cromatogràfiques	121
3.1.1. Establiment d'un full Excel per a caracteritzar columnes cromatogràfiques	
3.2. Predicció de la retenció d'anàlits ionitzables en mode gradient	129
3.2.1. Desenvolupament de models	
3.2.2. Disseny del treball experimental	
3.2.2.1. Selecció de substàncies	
3.2.2.2. Selecció de gradients	
3.2.3. Obtenció de dades prèvies	
3.2.3.1. Paràmetres de retenció propis del solut	
3.2.3.2. Grau d'ionització	
3.2.3.2.1. Determinació del pH	

3.2.3.2.2. Determinació del pK_a	
3.2.3.3. Paràmetre f	
3.2.4. Avaluació dels resultats	
3.3. Determinació de la lipofilitat mitjançant una versió optimitzada del mètode de shake-flask	155
3.3.1. Optimització del mètode de <i>shake-flask</i>	
3.3.1.1. Establiment de particions	
3.3.1.2. Desenvolupament de procediments	
3.3.2. Avaluació dels resultats	
CONCLUSIONS	167
REFERÈNCIES	173

OBJECTIU

Aquesta tesi doctoral té com a objectiu principal l'estudi de la retenció cromatogràfica en RP-HPLC. Per tal d'assolir aquest objectiu, s'han estudiat les contribucions a la retenció cromatogràfica tant de la fase estacionària com de la fase mòbil, així com algunes de les propietats característiques dels soluts a mesurar involucrades en el procés de retenció.

En aquesta tesi es proposa per una banda establir un procediment sistemàtic i eficient per a caracteritzar la fase estacionària de les columnes cromatogràfiques centrat en l'equació de van Deemter i en les contribucions que els diferents termes d'aquesta equació tenen en l'eixamplament de banda dels pics cromatogràfics. Per altra banda, es proposen diversos mètodes de predicció de la retenció d'anàlits per predir amb exactitud la retenció d'anàlits ionitzables, àcids i bàsics, en mode gradient. Com a part important dins del desenvolupament dels diferents models de predicció, s'estudia la influència de la variació d'algunes propietats fisicoquímiques rellevants involucrades en la retenció d'anàlits ionitzables com són el pH de la fase mòbil o el pK_a de l'anàlit que s'elueix amb la composició de la fase mòbil.

Un altre objectiu d'aquesta tesi és el d'establir millores en el mètode de *shake-flask*, mètode de referència per a la determinació de la lipofilitat de substàncies ($\log P$ o $\log D$). Avui en dia, la indústria farmacèutica sintetitza un gran nombre de productes candidats a ser nous fàrmacs, compostos que presenten cada cop valors de lipofilitat en un interval més ampli i, a més, en sintetitzen en poca quantitat. Per tant, és recomanable optimitzar el mètode de *shake-flask* per fer-lo apte per a substàncies compreses en un interval de lipofilitat el més ampli possible i per poder-lo posar en pràctica utilitzant molt poca quantitat de mostra.

ESTRUCTURA DE LA TESI

Aquesta tesi doctoral es presenta com un recull de publicacions, per la qual cosa aquesta memòria està escrita fent referència als articles publicats. Així doncs, la memòria comença amb una introducció on s'exposen diversos conceptes teòrics d'utilitat, posteriorment es troba una còpia completa dels cinc articles publicats en revistes científiques i, per últim, hi ha una discussió conjunta dels resultats obtinguts.

La introducció està dividida en diferents blocs. En el primer, s'explica com l'elució cromatogràfica consisteix en l'equilibri d'un anàlit entre una fase estacionària i una fase mòbil i, posteriorment, s'analitzen al detall cadascuna d'aquestes dues fases. En el cas de la fase estacionària, el treball es centra en l'equació de van Deemter i en els seus diferents termes que expliquen l'eixamplament del pic cromatogràfic, mentre que en el cas de la fase mòbil s'incideix en paràmetres fisicoquímics com podrien ser la seva polaritat o el seu valor de pH, entre d'altres. Seguidament, s'estudia la retenció cromatogràfica de compostos, primer es fa referència a les substàncies neutres i posteriorment, a les substàncies ionitzables, és a dir, compostos amb propietats àcid-base. En ambdós casos, es tracta la retenció en mode isocràtic (la composició de la fase mòbil es manté constant durant el procés d'elució) com també la retenció en gradient (la composició de la fase mòbil varia durant l'elució). Per últim, en un apartat una mica més diferenciat, s'explica de forma bàsica què és la lipofilitat dels compostos (tant neutres com ionitzables) i es descriu el procediment anomenat *shake-flask* com el mètode de referència per a determinar-la. També es fa èmfasi en la necessitat de millorar aquest mètode de *shake-flask* per tal d'adaptar-lo a les noves necessitats de la indústria farmacèutica (ampliar l'interval de lipofilitat on sigui vàlid, fer-lo apte per a baixes quantitats de mostra).

Posteriorment, en aquesta memòria s'adjunta una còpia de les cinc publicacions a les quals ha donat lloc la recerca que s'ha portat a terme en el transcurs d'aquesta tesi doctoral. En les publicacions adjuntades es poden consultar els detalls experimentals específics de cadascun dels estudis realitzats, ja que aquests no han estat explicats en cap altre apartat d'aquesta memòria.

Finalment, la tercera part d'aquesta memòria està dedicada a explicar de forma resumida el treball dut a terme en el transcurs de la tesi i a avaluar-ne els resultats obtinguts. Dins d'aquesta part de resultats i discussió, el primer apartat explica de

forma detallada la caracterització de columnes cromatogràfiques mitjançant un arxiu Excel dissenyat per a aquest propòsit. En ell, un cop s'han introduït paràmetres específics de la columna (com poden ser la seva porositat o el seu diàmetre de partícula, entre d'altres), es pot fer una avaluació detallada del rendiment d'una columna a partir de les dades d'alçada de plat i de temps de retenció corresponents a la clàssica equació de van Deemter. La caracterització mitjançant aquest full Excel no només consisteix en donar valor a la qualitat dels pics cromatogràfics sinó que permet desgranar les causes que provoquen l'eixamplament de pic, ja que analitza i estima de forma quantitativa un per un els diferents termes de l'equació de van Deemter. Aquesta part dels resultats fa referència a l'article 1.

En el següent apartat es desenvolupen tres models capaços de predir la retenció de substàncies amb propietats àcid-base en mode gradient. Després de realitzar un procés de disseny del treball experimental, també explicat en aquest bloc, els tres models es posen a prova per tal de comprovar quin d'ells és millor per a la predicció de la retenció en aquestes condicions. Posteriorment, s'avalua la validesa del model més adequat per a un conjunt de substàncies més gran, utilitzant dos modificadors orgànics de la fase mòbil diferents i, addicionalment, fent servir dues aproximacions diferents que permeten saber com varia el valor de pK_a dels diferents anàlits en funció de la composició de la fase mòbil (una d'elles basada en treball experimental, l'altra fonamentada en equacions i coeficients que depenen del grup funcional de l'anàlit que s'està estudiant). Aquest apartat fa referència al treball corresponent als articles 2-4.

En el bloc final d'aquesta part de la memòria, s'explica l'optimització del mètode de *shake-flask* i posterior validació de les millores que s'hi han introduït. En una primera secció, es proposen diferents relacions de volum entre les dues fases (particions) i diversos procediments que permetin la determinació experimental de la lipofilitat utilitzant aquestes particions. Posteriorment, aquestes particions i procediments es validen utilitzant un conjunt de substàncies que inclou fàrmacs de diferent naturalesa i compresos en un ampli interval de lipofilitat. Aquest últim bloc resumeix el treball realitzat i descrit a l'article 5.

Finalment, després dels tres grans blocs de la memòria mencionats prèviament (introducció, publicacions i resultats i discussió), es troben les conclusions més rellevants que s'han extret d'aquesta tesi doctoral.

Aquesta tesi opta a la menció internacional de doctorat, ja que s'ha realitzat una estada de recerca de quatre mesos de durada al Departament d'Enginyeria Química (CHIS) de la Vrije Universiteit Brussel (VUB). Durant aquesta estada es va realitzar tot el treball que fa referència a la caracterització de columnes cromatogràfiques que es presenta en aquesta tesi, un estudi que amplia el coneixement adquirit del procés d'elució. Addicionalment, està previst que les dades experimentals obtingudes durant l'estada donin lloc a, com a mínim, una nova publicació. Ara bé, tenint en compte que aquest estudi encara no està finalitzat i que la tesi es presenta en forma de compendi de publicacions ja enviades, aquesta part no s'ha pogut emmarcar dins d'aquesta tesi doctoral.

ABSTRACT

The title of this thesis is *Modelization of the chromatographic retention*. Hence, its main goal is to study in a detailed way the retention of analytes in HPLC and the most relevant factors involved in the elution process.

One of the most important applications of HPLC is its ability to separate the different compounds of a mixture thanks to the different interactions of the analytes with the stationary phase in the chromatographic column. Therefore, understanding how the retention of analytes works is an issue of utmost importance because, if the behavior of analytes inside the chromatographic column is known, one can try to predict their retention time, which would make the design of the experimental separation a lot easier. Besides, to achieve good separations in HPLC the chromatographic peaks must be totally resolved (completely separated one from the other) and, in order to do that, peaks must be as narrow as possible. Therefore, understanding the reasons for band broadening and trying to reduce the different terms that contribute to the peak width are also key issues when trying to achieve full chromatographic separations. Thus, the work performed in this thesis, which is mainly directed to address these topics, becomes fairly interesting in the field of separation science.

Chromatographic retention is usually defined as the equilibrium of an analyte between a stationary phase and a mobile phase so, in order to understand how the retention of analytes works, one must first understand the role of both the stationary phase and the mobile phase in the elution process. Since the chromatographic column is usually responsible of the peak width, a thorough characterization of the stationary phase has been carried out in this work. In it, the classic van Deemter equation has been split into its different terms (eddy-dispersion, diffusion and resistance to mass transfer) and their contributions to band broadening have been estimated. Several experimental procedures, like the *peak parking* method or the *total pore blocking* method, have been successfully employed in order to obtain a full stationary phase characterization. Article 1, besides focusing on these topics, provides an Excel file that allows a quick stationary phase characterization that takes into account all the different terms of the van Deemter equation and the procedures previously mentioned.

On the other hand, although the retention time depends strongly on both phases, modifying the mobile phase properties such as the composition or the pH will have a large effect on the retention of analytes. Therefore, understanding how the different analytes behave depending on the mobile phase composition is very important in order to estimate their retention. This can be especially tricky in gradient mode because properties like the mobile phase pH or the analyte pK_a strongly depend on the organic fraction of the mobile phase. Therefore, since gradient runs are measurements where the mobile phase composition is not constant, these properties change their value during the elution process and that makes them difficult to evaluate. Several predicting models were tested in acetonitrile in article 2 and a model depending on two variable parameters was decided to be the one that worked best. This predicting model was later used in articles 3 and 4 to predict the retention of ionizable analytes in gradient mode. In these two articles, a new approach to estimate the pK_a variation during the gradient was used; this approach was based on equations and empirical coefficients that depend on the functional group of the analyte. Additionally, in article 4 the organic modifier employed changed from acetonitrile to methanol and, besides, it also features some relevant pharmaceutical analytes (with a complex structure) that were included in the set of tested compounds. Since the predictions performed under all these conditions were considered to be accurate, the model was considered as robust and able to successfully predict the retention of acid-base analytes under gradient elution.

As a separate section, this thesis also includes a study on drug lipophilicity and the best way to determine it. The reference method to obtain $\log D$ values is the traditional *shake-flask* method but, despite its high reliability because of its resemblance to the actual biological partitioning (in cell membranes, for example), the new needs of the pharmaceutical industry requires an optimization to the method that widens its applicability $\log D$ range and that works using an amount of compound as small as possible. Several different partitions (ratios of volumes of each phase) and procedures, designed to make the *shake-flask* method able to determine lipophilicities ($\log D_{7.4}$ values) between -2 and 4.5, were proposed and later tested. The results were quite satisfactory, falling into the reasonable limits of overall accuracy and precision.

The optimization to the method was later successfully validated in an external company.

The research carried out in this doctoral thesis has led to the publication of five articles in peer-reviewed journals of significant impact factor. Since this thesis is presented as a compilation of publications, the five articles which compose it have been attached in the dissertation. Thus, although the actual dissertation is written in Catalan, English readers should be able to follow the thesis through the different publications. Additionally, this brief abstract and the conclusions that have been reached at the end of the work are also written in English to facilitate the comprehension and evaluation of the thesis for English readers.

INTRODUCCIÓ

1.1. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC)

La cromatografia és avui una de les tècniques analítiques més importants tant en els laboratoris de la indústria química com en els de la indústria farmacèutica. Essencialment, la cromatografia és un mètode físic de separació en el que els anàlits es distribueixen entre una fase estacionària (que es manté quieta) i una fase mòbil (que travessa la primera en una direcció definida) d'acord amb la interacció d'aquests anàlits amb cadascuna de les fases esmentades [1]. En funció de la naturalesa dels components del sistema cromatogràfic, es coneixen diferents tipus de cromatografia: de líquids, de gasos, de fluids supercrítics, etc. En el cas de la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC), en fer passar les substàncies a través de la fase estacionària arrossegades per un cabal de fase mòbil, aquells compostos que interaccionin més amb la primera els costarà més d'avançar per la columna i, per tant, d'eluir. Com que les substàncies interaccionen amb les dues fases d'acord amb la seva pròpia polaritat, és aquesta polaritat la que condicionarà els temps de retenció de cadascuna d'elles i facilitarà la separació física dels diferents compostos d'una mescla en solució. S'ha convingut que quan la fase estacionària és més polar que la fase mòbil es tracta de cromatografia en fase normal mentre que, si és la fase mòbil la més polar, de cromatografia en fase reversa (RP-HPLC), essent aquest últim el mètode de treball més habitual. Per tant, per entendre com funciona la retenció cromatogràfica de substàncies i poder desenvolupar models per predir-la, és necessari entendre el paper que juguen tant la fase estacionària com la fase mòbil.

1.1.1. Fase estacionària

En un sistema de HPLC, la fase estacionària sol estar constituïda per un material que permet la separació dels anàlits i que està situat dins d'un tub metàl·lic, el que es coneix convencionalment com a columna cromatogràfica. En funció del material de rebliment de la columna (sòlid, líquid, resina, etc.) s'establirà un procés de naturalesa

específica dins de la mateixa (adsorció, distribució, bescanvi iònic, etc.) i, per tant, la columna tindrà una o altra utilitat a l'hora de realitzar mesures o separacions. El tipus de columnes més comú en l'actualitat són les columnes empaquetades amb una fase estacionària composta per partícules esfèriques poroses a les quals s'enllacen cadenes hidrocarbonades de caràcter apolar per mitjà de grups silanol, essent C_{18} la cadena més habitual donada la seva marcada apolaritat (Figura 1).

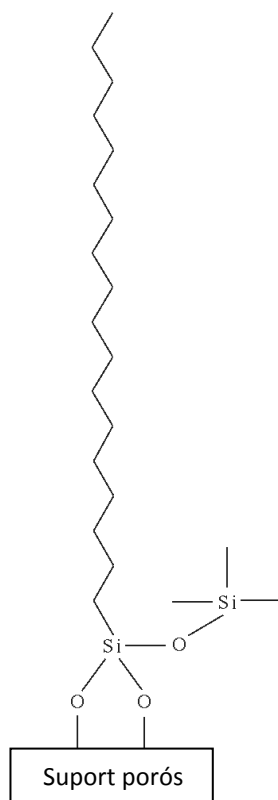


Figura 1. Exemple de fase estacionària en RP-HPLC

Tot i que les columnes més utilitzades al llarg del temps tenen suports sòlids formats per partícules totalment poroses, en els últims anys s'han desenvolupat partícules que tenen un nucli dur i una capa porosa a l'exterior (tecnologia core-shell), un tipus de partícules que dóna lloc a mesures de més qualitat. Per últim, també existeixen columnes monolítiques, on la columna està formada per una única barra de fase estacionària (en comptes de partícules esfèriques empaquetades). En aquest treball, aquestes últimes no seran tractades.

1.1.2. Fase mòbil

La fase mòbil es defineix com un líquid que circula pel sistema cromatogràfic i provoca l'elució de l'anàlit. Tenint en compte que en RP-HPLC la fase mòbil ha de tenir caràcter polar, aquesta sol estar formada per un o per una mescla de més d'un solvent de polaritat elevada. El més habitual en HPLC és utilitzar una mescla hidroorgànica com a fase mòbil, és a dir, una mescla d'aigua i un altre solvent de tipus orgànic (també conegut com a modificador orgànic); la proporció entre aquests dos solvents condicionarà la polaritat de la fase mòbil. En RP-HPLC, com menys percentatge de solvent orgànic hi hagi a la fase mòbil més polar serà i, per tant, més retinguts estaran els anàlits.

Els modificadors orgànics més habituals en HPLC són l'acetonitril (MeCN) i el metanol (MeOH). Tot i que existeix una àmplia varietat de solvents orgànics que poden ser emprats, es considera que aquests dos són els més adequats ja que, entre d'altres factors, presenten una baixa viscositat, no absorbeixen en un ampli interval de longitud d'ona (i per tant no interfereixen en la detecció per espectroscòpia UV-Vis) i presenten un punt d'ebullició relativament elevat (82°C i 65°C a pressió atmosfèrica, respectivament), fet que garanteix la composició constant de la fase mòbil. A més, com a avantatge addicional, són solvents que es poden adquirir amb un grau elevat de puresa a un preu relativament assequible. Cal tenir en compte que, al tenir una major viscositat, les mesures en fases mòbils que contenen metanol sempre donaran lloc a temps de retenció més grans que les mesures realitzades en fases mòbils que contenen acetonitril.

Pel que fa a la part aquosa de la fase mòbil, tot i que es pot fer servir simplement aigua, és habitual l'ús de solucions amortidores aquoses. És ben sabut que les solucions amortidores regulen el pH del medi, en aquest cas de la fase mòbil, paràmetre que pot fer variar notablement la retenció d'un anàlit si aquest té caràcter àcid o bàsic. A l'hora de preparar una solució tampó, cal tenir en compte que la concentració de l'agent amortidor sigui prou elevada com per poder dur a terme la seva funció reguladora sense problemes però, a la vegada, que sigui prou baixa com per no causar interferències en el sistema cromatogràfic (en forma de precipitació o en

el procés de detecció, per exemple). També cal tenir present que les solucions amortidores només poden tamponar en un interval d'una unitat per sobre o per sota d'algun valor de pK_a de l'agent amortidor, per la qual cosa la selecció d'un tampó adequat resulta essencial per obtenir solucions amortidores correctes que tinguin l'efecte desitjat en la fase mòbil.

Tal i com s'ha dit anteriorment, de la fracció (o percentatge) de modificador orgànic en la fase mòbil en dependrà la seva polaritat, fet que tindrà un efecte molt important en la retenció dels anàlits. En aquest sentit, la tècnica d'HPLC permet que aquesta proporció sigui constant durant l'elució de la substància (mode isocràtic) o, per contra, que varïi de forma controlada (mode gradient). Les possibilitats que ofereix el mode gradient a l'hora de dissenyar mètodes experimentals i processos de separació són molt més nombroses que les que ofereix el mode isocràtic, per la qual cosa el treball en mode gradient és força més habitual. Dins dels gradients, cal diferenciar entre gradients lineals, on el percentatge de modificador orgànic varia de forma constant, i els gradients en corba, on la variació de modificador orgànic pot ser creixent o decreixent respecte al temps d'elució, donant lloc a gradients còncaus o convexos, respectivament. Aquests diversos tipus de gradients es poden combinar entre ells i permeten desenvolupar mètodes cromatogràfics sofisticats per realitzar mesures o separacions complexes.

1.2. CARACTERITZACIÓ DE COLUMNES CROMATOGRÀFIQUES

Després de recórrer la columna arrossegats per la fase mòbil, els anàlits arriben al detector i generen un pic cromatogràfic, pic que idealment hauria de tenir una forma gaussiana, tot i que no sempre és així. Com que la cromatografia és una tècnica analítica que permet la separació dels diversos components d'una mescla, l'usuari de RP-HPLC està interessat en dos aspectes diferents: realitzar separacions en el menor temps possible i aconseguir que els pics resultants d'una separació siguin el més estrets possible ja que, en cas contrari, és més fàcil que se solapin entre ells i les separacions no siguin completes. Així doncs, obtenir pics estrets i regulars és sinònim d'obtenir pics de qualitat, per la qual cosa resulta un tema de màxima importància en cromatografia. Tenint en compte que la causa principal d'eixamplament de pic és la interacció de l'anàlit amb la fase estacionària, entendre les causes d'aquest eixamplament i quins factors hi contribueixen resulta clau per aconseguir pics estrets i, per tant, aquest esdevé un punt important a l'hora de modelitzar la retenció cromatogràfica.

1.2.1. Eficàcia

La manera més habitual de determinar la qualitat d'un pic cromatogràfic és mitjançant l'estimació de la seva eficàcia, és a dir, del nombre de plats teòrics (N) que li corresponen. El nombre de plats és un concepte matemàtic que es calcula relacionant el temps de retenció d'un anàlit amb la variància associada al pic obtingut, de la manera que mostra l'equació (1):

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} \quad (1)$$

En aquesta equació, t_R representa el temps de retenció i σ_t^2 és la variància del pic expressada en unitats de temps. Aquest darrer paràmetre està estretament lligat a

l'amplada del pic cromatogràfic i, per tant, la manera més habitual de determinar el nombre de plats és a través de la relació entre el temps de retenció i l'amplada de pic. Ara bé, en aquest sentit cal tenir compte que l'amplada de pic depèn de l'alçada a la qual es mesura, tal i com es mostra a la Figura 2.

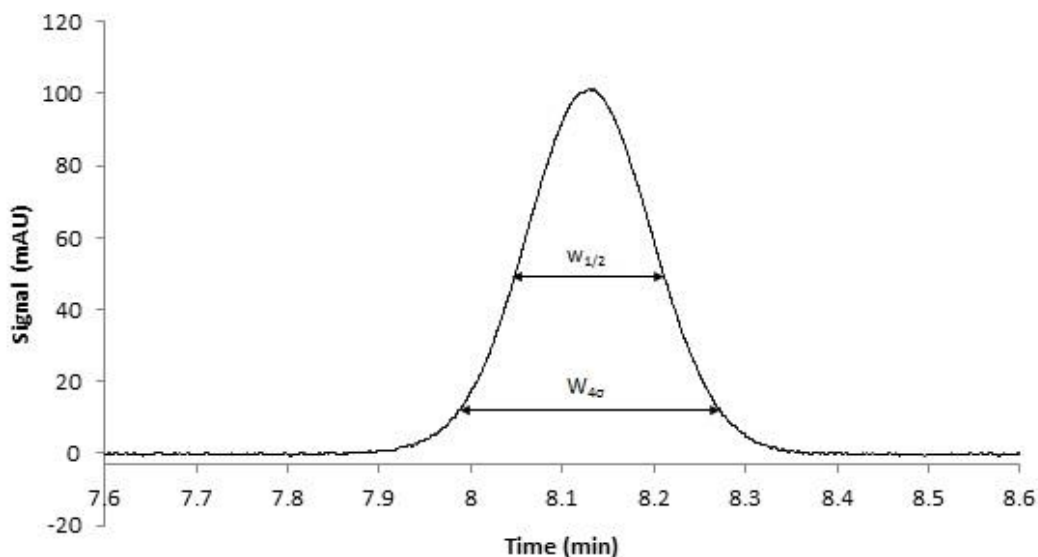


Figura 2. Diferents amplades d'un mateix pic cromatogràfic

Les dues maneres més habituals de mesurar l'amplada d'un pic cromatogràfic són les que es mostren a la Figura 2: a mitja alçada i a l'alçada que correspon a l'amplada de 4σ . La primera consisteix en mesurar l'amplada del pic a la meitat de la seva alçada ($w_{1/2}$), mentre que la segona equival a l'amplada que s'obté a la línia base prolongant el pic a través de les seves tangents ($w_{4\sigma}$); aquesta amplada equival exactament a la que es mesura a un 13.4% de l'alçada en un pic perfectament gaussià. Degut a que aquestes són les amplades que s'utilitzen de manera més habitual, les expressions que les relacionen amb el nombre de plats del pic cromatogràfic estan ja establertes i són les que figuren en l'equació (2):

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \frac{t_R^2}{w_{4\sigma}^2} \quad (2)$$

Tot i això, tal i com s'observa a la Figura 2, per a un mateix pic cromatogràfic es poden mesurar una gran quantitat d'amplades diferents, on cadascuna d'elles es relacionaria amb el nombre de plats d'una manera diferent. En cas que el pic cromatogràfic fos perfectament gaussià, l'alçada on s'adquirís l'amplada de pic no

tindria importància ja que qualsevol d'aquestes expressions (ja siguin les establertes en l'equació (2) o d'altres que s'estableixen per a una mesura en concret) donarien exactament el mateix nombre de plats. Desafortunadament, molt poques vegades un pic cromatogràfic és perfectament simètric ja que, especialment prop de la línia base, els pics solen ser força irregulars. Tenint en compte aquest fet, com més amunt es mesuri l'amplada d'un pic cromatogràfic, més informació es perdrà sobre la forma del propi pic i, per tant, menys fiable serà el nombre de plats obtingut.

Un dels factors que influeix en l'eixamplament de banda i en la forma dels pics és la qualitat de l'instrument, qualitat que depèn únicament de les característiques del sistema HPLC com poden ser la distribució i qualitat dels tubs i dels mòduls. Per tant, si es vol avaluar el rendiment d'una columna de manera exclusiva, cal conèixer abans l'eixamplament de banda provocat per l'instrument i fer la correcció pertinent, cosa que s'aconsegueix realitzant mesures en absència de columna.

Ara bé, tot i que el nombre de plats és una bona manera de conèixer el rendiment aproximat d'una columna, no explica què és el que provoca l'eixamplament de banda d'un pic cromatogràfic ni què es pot fer per intentar reduir-lo. Per abordar aquesta qüestió, el primer que cal fer és transformar les dades de nombre de plats en dades d'alçada de plat (H) mitjançant l'expressió que la relaciona amb la longitud de la columna L :

$$H = L/N \tag{3}$$

A partir de l'alçada de plat, l'anàlisi del rendiment de les columnes cromatogràfiques es du a terme mitjançant l'equació de van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \tag{4}$$

Tot i que l'eixamplament de banda havia estat estudiat prèviament per Martin i Synge primer [2] i per Lapidus i Amundson [3] posteriorment, no va ser fins l'any 1956 que van Deemter va proposar la seva coneguda equació, en la que va suggerir que l'eixamplament de banda provocat per l'equilibri imperfecte entre fase mòbil i fase estacionària podia explicar-se mitjançant diferents contribucions [4]. El terme A fa referència a la multiplicitat de camins, també coneguda com a dispersió d'eddy, i es

defineix com la tendència de l'anàlit en seguir diversos possibles camins dins de la columna per arribar al detector. El terme B representa la difusió longitudinal de l'anàlit, és a dir, la tendència que té el solut a expandir-se per la fase mòbil (fet que pot tenir lloc mentre està dins la columna). Per últim, el terme C descriu la resistència a la transferència de massa, és a dir, el temps que triga un anàlit per passar d'una fase a l'altra; es divideix entre C_s i C_m en funció de si fa referència a la fase estacionària o a la fase mòbil. Per últim, el paràmetre u fa referència a la velocitat lineal de l'anàlit. En cas que l'anàlit sigui un marcador de temps mort s'obté u_0 , un tipus de velocitat que es considera també com la velocitat de la fase mòbil. Aquest paràmetre es pot calcular per a cada cabal de fase mòbil a partir de la determinació del temps mort del sistema ($u_0 = L/t_0$), tot i que cal anar amb compte ja que els marcadors de temps mort no sempre estan totalment no retinguts. Des que es va proposar, aquesta equació s'ha convertit en un mètode de referència per avaluar el rendiment cromatogràfic [5–9].

La representació gràfica de l'equació de van Deemter es pot obtenir amb facilitat si es mesura la retenció d'una mateixa substància a diferents cabals de fase mòbil (diferents velocitats) i es determina el nombre de plats de cada pic. La corba resultant és sempre semblant a la que es mostra a continuació:

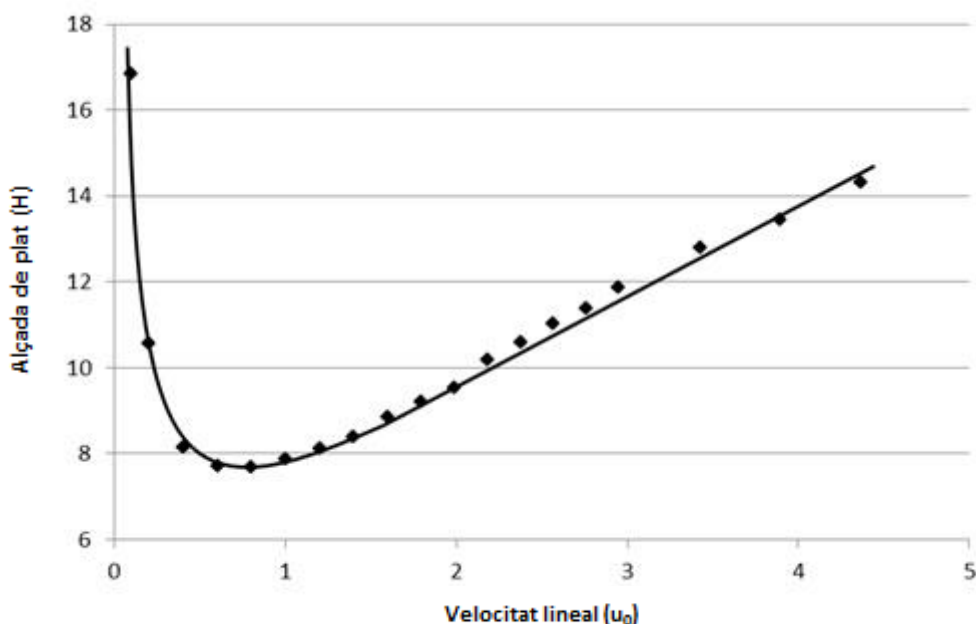


Figura 3. Exemple de corba de van Deemter

Com es pot veure en la pròpia equació de van Deemter, el terme A és totalment independent de la velocitat de la fase mòbil (u_0), el terme B n'és inversament proporcional i el terme C , tant C_s com C_m , són directament proporcionals a la velocitat. Així doncs, la part esquerra d'una corba de van Deemter estarà regida pel terme B mentre que la part dreta estarà regida pel seu terme C . Aquesta equació respon al fenomen físic que es produeix dins la columna ja que a velocitats baixes l'anàlit passa més temps dins de la columna i acusa més els efectes de la difusió longitudinal mentre que, com més alta sigui la velocitat, més significatiu serà el temps necessari per a la transferència de massa en relació al temps de retenció dels anàlits. Per últim, el mínim de la corba de van Deemter marca la velocitat de treball òptima (que es tradueix en el cabal de fase mòbil òptim), ja que els pics en aquestes condicions tindran la màxima qualitat possible amb aquesta columna.

1.2.2. Porositat

La porositat d'una columna cromatogràfica es defineix com l'espai no ocupat per la fase estacionària, és a dir, l'espai ocupat per la fase mòbil durant qualsevol elució cromatogràfica. La porositat total d'una columna (ϵ_T) engloba dos tipus de porositat diferents. La porositat externa (ϵ) és la fracció de la porositat que representa l'espai intersticial, és a dir, l'espai que existeix entre les diferents partícules de la fase estacionària i proporciona informació sobre l'empaquetament, com més baix sigui el seu valor més quantitat de partícules hi haurà dins de la columna i, per tant, millor serà el seu empaquetament. Per altra banda, la porositat interna (ϵ_{part}) descriu el percentatge de la partícula que està buit i, per tant, dóna informació sobre el disseny de les partícules que componen la fase estacionària. En aquest punt cal discernir entre els diversos tipus de partícula ja que el paràmetre global ϵ_{part} només fa referència a partícules totalment poroses, en cas que les partícules siguin de tipus core-shell (amb un nucli dur i una zona porosa al seu voltant) cal referir-se a la porositat de la zona porosa ϵ_{pz} , un paràmetre que es pot calcular a partir de la relació dels diàmetres de la partícula i del nucli. Els dos tipus de porositat es poden relacionar amb la porositat total de la columna mitjançant:

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_{part} \quad (5)$$

D'entre tots els tipus de porositat, la més senzilla de determinar és la porositat total, que es troba mitjançant la relació:

$$\varepsilon_T = (F \cdot t_0)/V \quad (6)$$

on F és el cabal de fase mòbil, t_0 és el temps mort i V és el volum geomètric de la columna. Ara bé, la porositat total no és un paràmetre rellevant en l'anàlisi del rendiment cromatogràfic d'una columna sinó que el valor realment important és el de la porositat externa. Tenint en compte que la resistència al cabal i la permeabilitat de la fase estacionària depenen de la porositat externa en un factor de ε^5 [10], obtenir un valor de porositat externa el més precís possible resulta clau a l'hora de fer una anàlisi acurada de la columna. Tot i que tradicionalment s'ha utilitzat el mètode ISEC (*inverse size-exclusion chromatography*), la recerca en aquest camp s'orienta a trobar mètodes que el millorin. En aquest sentit, un dels mètodes més utilitzats és l'anomenat TPB (*total pore blocking*).

El mètode TPB va ser proposat per Desmet i col·laboradors l'any 2007 [11] i es basa en fer passar un solvent orgànic completament immiscible amb la fase mòbil per la columna, de tal manera que aquest solvent ompli totalment els porus de la fase estacionària i hi quedi retingut, procediment que convertirà les partícules poroses de fase estacionària en partícules totalment lliures i sòlides. D'aquesta manera, en no existir porositat interna ja que els porus estan bloquejats pel solvent orgànic, la porositat calculada mitjançant l'equació (6) equivaldrà a la porositat externa. Per bloquejar la columna se segueix un procediment consistent en tres etapes:

- 1) Fer passar isopropanol per la columna per tal de netejar-la de qualsevol fase mòbil anterior que pugui interferir en el procés de bloqueig.
- 2) Fer passar el solvent orgànic per la columna per tal de bloquejar els porus de les partícules de fase estacionària. Alguns estudis han demostrat que el decà i el dodecà són els solvents més adequats per fases estacionàries silanitzades de fase reversa.
- 3) Arrossegat el solvent orgànic de l'espai intersticial amb un tampó aquós. En aquest pas és convenient utilitzar un cabal relativament baix per tal que el

solvent orgànic, que en principi hauria de quedar-se retingut als porus degut a la forta interacció hidrofòbica amb les cadenes apolars de la fase estacionària, romanguí immobilitzat dins de les partícules.

La figura 4 recull de manera esquemàtica el procés descrit anteriorment, on cada requadre recull una de les etapes descrites del procediment:

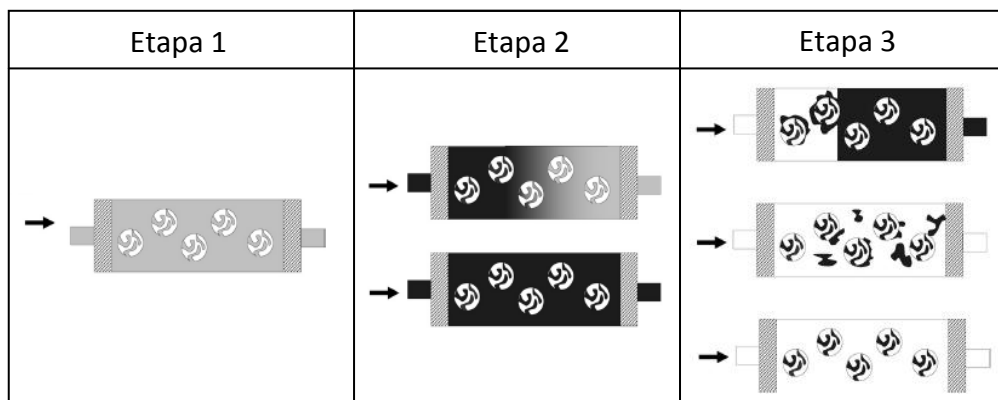


Figura 4. Successives etapes del mètode TPB [11]

Altres mètodes per determinar la porositat externa són el prèviament esmentat mètode ISEC (mètode basat en la diferent retenció de polímers de diferent grandària) [12–15], el mètode d'exclusió de Donnan (mètode basat en l'exclusió de sal de Donnan) [16] o la picnometria (mètode basat en la diferent densitat de solvents orgànics i els diferents pesos de la columna plena amb cadascun d'aquests solvents) [17]. Un cop determinat el valor de la porositat externa, la porositat interna (ja sigui ε_{part} o ε_{pz}) és fàcilment determinable per diferència mitjançant l'equació 5.

1.2.3. Anàlisi pas a pas del rendiment cromatogràfic

Com s'ha comentat anteriorment, el rendiment d'una columna cromatogràfica s'avalua mitjançant l'equació de van Deemter (equació (4)), una equació que conté tres termes (A , B i C) que expliquen l'eixamplament de banda. Si bé globalment això és correcte, es pot aconseguir una anàlisi més detallada si es consideren, una a una, les diferents contribucions estimades per cadascun dels termes de l'equació de van Deemter a l'alçada de plat total obtinguda per a cada pic, tal i com mostra l'equació (7):

$$H = H_A + H_B + H_{Cs} + H_{Cm} \quad (7)$$

on els subíndexs de cada alçada de plat indiquen els diferents termes de l'equació de van Deemter.

1.2.3.1. Terme B de l'equació de van Deemter

El terme B de l'equació de van Deemter fa referència a la difusió longitudinal dels anàlits dins de la columna cromatogràfica, és a dir, a la tendència que tenen a expandir-se en la direcció de la fase mòbil [18]. Un dels mètodes més habituals a l'hora de mesurar la contribució que té aquesta difusió en l'eixamplament de banda és el mètode de *peak parking* (també conegut com a *arrested elution* [19]).

D'acord amb el treball de Knox i Giddings [20], el mètode essencialment consisteix en aturar el cabal de fase mòbil durant l'elució d'un anàlit aproximadament quan aquest es troba al mig de la columna durant un temps conegut (entre 15 i 60 minuts normalment) i, passat aquest temps, reprendre el cabal de fase mòbil perquè el pic acabi d'eluir-se. Tenint en compte que mentre està "aparcad" dins la columna (d'aquí el nom de *peak parking*) el solut no pot fer res més que patir els efectes de la difusió, l'amplada que s'observi en els diferents pics cromatogràfics obtinguts per a diferents temps d'aparcament serà únicament deguda a aquest fenomen i, per tant, al terme B de l'equació de van Deemter.

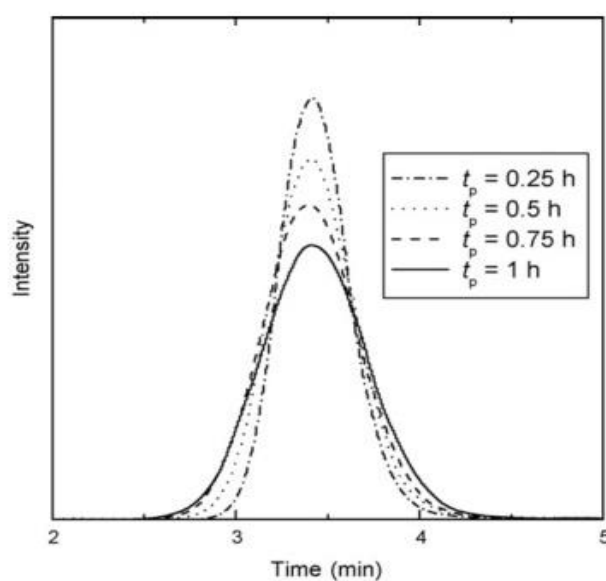


Figura 5. Pics cromatogràfics obtinguts a diferents temps de *peak parking* [21]

En aquest sentit, cal apuntar que és necessari realitzar una mesura correctora amb un temps d'aparcament de 1 segon, per evitar que l'aturada i posterior posada en marxa del cabal de fase mòbil tingui efectes addicionals en l'eixamplament de banda.

En gràfics el de com la Figura 5 es pot veure com varia la forma d'un pic cromatogràfic en funció del temps d'aparcament (t_{park}) únicament per l'efecte de la difusió. Però sí bé veure gràficament la influència de la difusió és senzill, quantificar-la és més complicat. En primer lloc, es considera que la variància d'un pic (σ_x^2) varia linealment amb el seu temps d'aparcament d'acord amb la següent expressió [21–23]:

$$\Delta\sigma_x^2 = 2 \cdot D_{eff} \cdot t_{park} \quad (8)$$

En l'equació (8) D_{eff} és la constant de difusió del compost i la variància està expressada en unitats de longitud. Per obtenir aquesta variància espacial, cal obtenir primer la variància temporal per a cada pic reordenant l'equació (1) i substituint el temps de retenció pel temps total (temps de retenció + temps d'aparcament). Posteriorment, aquesta variància temporal es pot transformar en variància espacial multiplicant-la per la velocitat lineal del compost retingut u_R ($u_R = L/t_R$, on L és la longitud de la columna); per la qual cosa caldrà fer una mesura del compost sense aparcar-lo per obtenir el temps de retenció del compost [24]. Per últim, caldrà fer una mesura amb un temps d'aparcament mínim (normalment 30 segons) per eliminar l'eixamplament de banda causat per l'apagament i posterior posada en marxa de les bombes cromatogràfiques (per aturar i reestablir el cabal de fase mòbil), mesura que s'haurà de restar a les mesures de *peak parking* obtenint així la difusió provocada únicament pel temps d'aparcament.

Un cop obtinguts els diferents valors de $\Delta\sigma_x^2$, es pot obtenir fàcilment el valor de D_{eff} , valor que es pot correlacionar amb l'alçada de plat associada al terme B de l'equació de van Deemter mitjançant la següent relació [22]:

$$H_B = \frac{2 \cdot D_{eff}}{u_0} (1 + k') \quad (9)$$

on u_0 és la velocitat de la fase mòbil, un paràmetre que es determina dividint la longitud de la columna (L) pel temps mort del sistema (t_0).

Si es desitja obtenir una avaluació encara més detallada de la difusió dels anàlits, el paràmetre D_{eff} es pot dividir entre la difusió en l'espai intersticial de la columna (D_m), constant per a cada combinació de compost i fase mòbil però que no depèn del factor de retenció, i la difusió dins dels porus de la fase estacionària (D_{part} per a partícules totalment poroses, D_{pz} per a partícules de tipus core-shell), que sí depèn del factor de retenció. El paràmetre D_m es pot trobar tabulat a la literatura o es pot calcular mitjançant expressions com per exemple l'equació de Wilke-Chang [25]. Per altra banda, pel que fa al terme D_{pz} , existeixen diferents aproximacions més o menys acurades que permeten el seu càlcul.

1.2.3.2. Terme C de l'equació de van Deemter

Tot i que la difusió dels anàlits es recull bàsicament en el terme B de l'equació de van Deemter, també el terme C_s de l'equació mostra una certa dependència d'aquesta difusió. Així doncs, la prèviament esmentada difusió de l'anàlit en la zona porosa de les partícules (D_{pz}) també afecta a la resistència a la transferència de massa, és a dir, al pas del propi anàlit d'una fase a l'altra, per tant la seva determinació resulta essencial per a estimar la contribució del terme C_s de l'equació de van Deemter a l'eixamplament de banda. Ara bé, la determinació de D_{pz} no és un procés gens senzill. Tradicionalment, el mètode més freqüent per a determinar el valor de D_{pz} era el *residence time weighted model* (RTW-model), un mètode introduït per Knox [22], Stout i de Stefano [26] i Giddings [27], però estudis recents demostren que aquest model no estima la dependència amb el factor de retenció de manera acurada, fet que dóna lloc a que, en ocasions, el *RTW-model* no sigui tant exacte com es voldria [28–30]. Com a procediment alternatiu, Desmet i col·laboradors proposen l'estimació de D_{pz} a través de la *effective medium theory* (EMT), un model capaç de predir propietats en medis binaris heterogenis i que, en aquest cas, entén la columna cromatogràfica com un medi heterogeni que consta d'una zona intersticial i d'una zona formada per les partícules de fase estacionària. La relació de volums entre les dues zones pot obtenir-se mitjançant un estudi previ sobre la porositat de la columna.

Tenint en compte que el terme C_s fa referència a la transferència de massa en la fase estacionària, el primer que cal fer per conèixer la relació entre aquestes partícules

de la fase estacionària i la difusió observada és eliminar la part de la difusió en l'espai intersticial de la columna. Això es pot aconseguir a través de l'aproximació de Maxwell al model EMT [31].

D'acord amb la literatura [24,30], la constant de polaritzabilitat (β_1) es defineix mitjançant l'equació (10):

$$\beta_1 = \frac{1 - \gamma_{eff} \cdot \varepsilon_T (1 + k') - 1}{1 - \varepsilon_T + \gamma_{eff} \cdot \varepsilon_T (1 + k')} \quad (10)$$

on γ_{eff} és la difusió efectiva ($\gamma_{eff} = D_{eff}/D_m$). Utilitzant dades experimentals de porositat i de difusió obtingudes prèviament, és senzill determinar aquesta constant. A partir del valor de la constant de polaritzabilitat, per a partícules esfèriques (com és el cas), es pot obtenir la permeabilitat relativa de la partícula (α_{part}) a través de la següent expressió:

$$\alpha_{part} = \frac{1 + 2\beta_1}{1 - \beta_1} \quad (11)$$

Si s'aplica l'aproximació de Maxwell a la teoria EMT, es pot trobar la difusió de l'anàlit dins de la partícula (D_{part}) a través de l'equació (12):

$$D_{part} = \frac{\alpha_{part} (1 - \varepsilon)}{\varepsilon_T (1 + k') - \varepsilon} D_m \quad (12)$$

La conversió de D_{part} en D_{pz} dependrà del tipus de partícules de fase estacionària que s'estiguin analitzant. En el cas de partícules completament poroses ambdós paràmetres són totalment equivalents ja que la zona porosa és la totalitat de la partícula. Per altra banda, en el cas de partícules amb nucli central dur (core-shell) l'aproximació EMT permet la determinació de D_{pz} [30,32], per la qual cosa cal relacionar les diferents difusions mitjançant la següent expressió:

$$\frac{D_{part}}{D_{pz}} = \frac{2}{2 + \rho^3} \quad (13)$$

on D_{pz} fa referència a la difusió únicament en la zona porosa de la partícula mentre que ρ és la relació entre el diàmetre del nucli sòlid i el diàmetre total de la partícula.

Un cop coneguda la difusió dins de la zona porosa, es pot calcular la contribució de la resistència a la transferència de massa de la pròpia fase estacionària [33] mitjançant l'equació (14):

$$H_{C_s} = \frac{2}{\alpha} \frac{1}{Sh_{part}} \frac{k''}{(1+k'')^2} u_i \frac{d_p^2}{D_{pz}} \quad (14)$$

En aquesta equació, α és un coeficient relacionat amb la forma de la fase estacionària que equival a 6 en partícules esfèriques [33,34], k'' es defineix com el factor de retenció zonal i equival al factor de retenció associat a un t_0 únicament intersticial (k'' es relaciona fàcilment amb el factor de retenció a través de valors de porositat), u_i és la velocitat intersticial de la fase mòbil i d_p és el diàmetre de les partícules de la columna. Per últim, Sh_{part} és el nombre de Sherwood de la partícula, és a dir, el coeficient de transferència de massa en la partícula, un paràmetre que es regeix per la següent expressió [35]:

$$Sh_{part} = \frac{4}{3} \frac{1-\rho^3}{\frac{2}{15} - \frac{2}{3}\rho^3 + \frac{6}{5}\rho^5 - \frac{2}{3}\rho^6} \quad (15)$$

on ρ és la prèviament mencionada relació entre el diàmetre del nucli i el diàmetre de la partícula. Per a partícules de tipus totalment porós, el valor de Sh_{part} és de 10.

Per altra banda, la contribució de la resistència a la transferència de massa de la fase mòbil també es pot estimar, però cal tenir en compte que és una determinació menys fiable ja que es basa en dues aproximacions que poden no ser del tot correctes. Una d'elles és considerar que el cabal de fase mòbil és pla quan més aviat té una naturalesa parabòlica [36], mentre que l'altra està en l'estimació del nombre de Sherwood, ja que la correlació utilitzada només s'ha verificat en velocitats de cabal més elevades de les que se solen utilitzar habitualment en HPLC [34]. Així i tot, la millor manera de conèixer la contribució de H_{C_m} és a partir de l'equació (16) [33,34]:

$$H_{C_m} = \frac{2}{\alpha} \frac{1}{Sh_m} \frac{k''^2}{(1+k'')^2} \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \frac{d_p^2}{D_m} u_i \quad (16)$$

on la majoria de paràmetres tenen el mateix significat que en l'expressió que estima H_{C_s} (equació (14)) i on Sh_m representa el nombre de Sherwood de la fase mòbil.

1.2.3.3. Terme A de l'equació de van Deemter

La contribució a l'eixamplament de banda deguda al terme A de l'equació de van Deemter és possiblement la més complicada d'avaluar, ja que no hi ha una manera senzilla de determinar-la amb exactitud. Inicialment, van Deemter va considerar el terme A com un paràmetre proporcional al diàmetre de partícula (d_p) de la columna ($A = 2\lambda d_p$), on λ és simplement una constant de proporcionalitat, però posteriorment ha quedat demostrat que aquesta estimació no és tan senzilla. Giddings va desenvolupar la teoria de l'emparellament (*coupling theory*) [27] en la que s'afirmava que a velocitats altes aquesta relació era correcta perquè la dispersió d'eddy anava regida pel cabal de la pròpia fase mòbil però que a velocitats més baixes aquesta dispersió també estava controlada per la difusió de l'anàlit [27,37]. A més, tenint en compte que la dispersió d'eddy està provocada per les irregularitats de velocitat de la fase mòbil, Giddings va enumerar fins a cinc tipus de contribucions diferents per explicar les diferències de velocitat en funció de la distància que les separava. Així doncs, per explicar la dispersió d'eddy de forma completa caldria avaluar les diferències de velocitat entre partícules adjacents (*trans-channel*), en un diàmetre de poques partícules (*short-range inter-channel*), en un diàmetre d'un nombre notable de partícules (*long-range interchannel*), en el diàmetre sencer de la columna (*trans-column*) i dins de la pròpia partícula (*trans-particle*) [27,38]. Tot i que estudis posteriors van permetre negligir l'efecte *trans-column* i eliminar l'efecte *trans-particle* [8], resulta molt complicat fer una bona estimació de la dispersió d'eddy total quan són tants els factors que hi intervenen. Altres models que s'han proposat al llarg del temps per determinar la dispersió d'eddy, com podrien ser el model de Huber [5], el model de Horváth [7] o el model de Bouchaud [39], si bé són correctes quant al fonament no són prou acurats per a la quantificació [37].

Així doncs, degut a la gran complicació que suposa la determinació directa de la dispersió d'eddy, la manera més lògica de realitzar aquesta estimació és per diferència amb la resta de contribucions de l'equació de van Deemter a l'alçada de plat total d'acord amb l'equació (7). Tot i això, cal tenir en compte que es tracta d'una estimació força aproximada ja que la determinació de H_{Cm} es basa en aproximacions que poden no ser del tot correctes.

1.2.4. Caracterització global

La caracterització pas a pas del rendiment de columnes cromatogràfiques és un procediment força interessant i útil per a la indústria però, en ser un procediment bastant extens i detallat, també esdevé força laboriós ja que dur a terme una caracterització completa requereix una quantitat significativa de temps. Així doncs, un mètode sistemàtic i relativament automatitzat que permetés caracteritzar la columna, analitzar les diferents contribucions a l'eixamplament de banda segons l'equació de van Deemter i avaluar el seu rendiment i eficàcia globals seria una eina de treball força interessant ja que, en gran mesura, facilitaria la feina als membres de la comunitat científica que necessitin fer aquest tipus de determinacions. L'obtenció d'una eina d'aquestes característiques ha estat un dels objectius d'aquest treball.

1.3. CARACTERITZACIÓ DE FASES MÒBILS CROMATOGRÀFIQUES

En RP-HPLC, la fase mòbil és un solvent de caràcter polar que arrossega els anàlits a través de la columna i, generalment, consta d'una fracció de caràcter aquós (habitualment tamponada) i d'una altra fracció de caràcter orgànic. La relació entre aquestes dues fraccions afectarà en gran manera les propietats de la pròpia fase mòbil, la més rellevant de les quals és la d'eluir diferentment els diversos compostos d'una mescla problema. Aquesta propietat es relaciona directament amb la polaritat i, pels compostos amb propietats àcid-base, amb el valor de pH de la mescla hidroorgànica. És ben sabut que la polaritat és una propietat que depèn directament de la composició de la fase mòbil, és a dir, de la proporció de les seves fraccions aquosa i orgànica, però cal fer èmfasi en què el valor de pH d'una fase mòbil tamponada també és funció de la seva pròpia composició [40,41]. Aquestes dependències resulten crítiques a l'hora de caracteritzar una fase mòbil i d'avaluar la retenció cromatogràfica. Addicionalment, si la fase mòbil va arrossegant un anàlit amb propietats àcid-base pel sistema cromatogràfic, el pK_a d'aquest últim també es veurà afectat pel contingut de modificador orgànic d'acord amb la naturalesa del propi anàlit. Així doncs, caracteritzar una fase mòbil de forma correcta implica necessàriament una bona avaluació tant de la variació de la polaritat i del pH de la fase mòbil, com de l'efecte d'aquesta fase mòbil en el pK_a dels anàlits que elueixi.

1.3.1 Estimació de la polaritat

Al llarg del temps, s'han proposat diversos paràmetres de mesura de la polaritat de mesclures hidroorgàniques. Un dels més coneguts és potser el paràmetre de Dimroth-Reichardt, $E_T(30)$, un paràmetre basat en l'energia d'excitació de l'indicador solvatocròmic anomenat $E_T(30)$ [42] i pel qual s'ha observat una dependència lineal amb la retenció cromatogràfica de compostos neutres obtinguda a partir de fases mòbils amb diversos continguts de modificador orgànic [43–45]. A partir d'aquesta

relació lineal, es va establir un nou paràmetre normalitzat de polaritat del solvent que es va denominar P_m^N i que es va establir com a paràmetre de polaritat de la fase mòbil en el marc d'un model de polaritat per a la retenció en cromatografia de líquids [46]. Les relacions establertes entre el paràmetre P_m^N i la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil són funció de la naturalesa del solvent orgànic que es faci servir [46–49]:

$$P_m^N(\text{MeCN}) = 1 - \frac{2,13\varphi}{1 + 1,42\varphi} \quad (17)$$

$$P_m^N(\text{MeOH}) = 1 - \frac{1,33\varphi}{1 + 0,47\varphi} \quad (18)$$

on les abreviacions *MeCN* i *MeOH* fan referència a mescles hidroorgàniques que continguin acetonitril i metanol respectivament. Com que les fases mòbils habitualment contenen acetonitril o metanol com a modificador orgànic, per caracteritzar-les és imprescindible conèixer la relació entre P_m^N amb la naturalesa i fracció (φ) de solvent orgànic a la fase mòbil (equacions (17) i (18)). En el cas que el modificador orgànic no fos ni acetonitril ni metanol, s'hauria d'establir una equació similar però amb els seus propis coeficients numèrics.

1.3.2. Mesura del pH

El pH d'una solució es defineix com el logaritme decimal negatiu de l'activitat de l'ió hidrogen; magnitud relacionada amb la seva concentració a través del coeficient d'activitat. Aquest coeficient equival a la unitat quan s'assoleix l'estat estàndard de l'activitat de l'ió hidrogen que, en el cas de l'aigua, és el de dilució infinita. Ara bé, quan es considera l'estat estàndard d'una mescla hidroorgànica (com podria ser una fase mòbil) es pot escollir entre dos estats estàndard diferents: la ja esmentada dilució infinita de l'ió hidrogen en aigua o bé la dilució infinita de l'ió hidrogen en aquesta mescla hidroorgànica concreta. Això dóna lloc a dues escales diferents de valors de pH, en l'escala ${}_w^s\text{pH}$ l'estat de referència és el protó a dilució infinita en aigua mentre que en l'escala ${}_s^s\text{pH}$ l'estat de referència és el protó a dilució infinita en la mescla hidroorgànica. Els índexos que figuren a l'esquerra del símbol són els indiquen com es realitza la mesura i en quina escala de pH es treballa. En aquest sentit, el superíndex

dóna informació sobre el medi en el que es fa la determinació del pH mentre que el subíndex fa referència al solvent per al qual s'agafa l'estat estàndard; en ambdós casos w significa aigua i s significa mescla hidroorgànica (o qualsevol altre solvent orgànic). Aquesta nomenclatura és la que està aprovada per la IUPAC [50]. A efectes pràctics, l'elecció del solvent per al qual el coeficient d'activitat a dilució infinita és la unitat (estat estàndard) es veu reflectida en el medi de calibració de l'elèctrode de pH, una calibració prèvia en tampons aquosos dóna lloc als valors de s_w pH mentre que a partir d'una calibració en el mateix solvent hidroorgànic en el que es fa la mesura s'obtindrien valors de s_s pH. Per a mesures de pH en un medi totalment aquós s'utilitzaria l'escala de w_w pH, que no és altra cosa que una escala s_s pH on el solvent s és aigua (w), però aquesta escala en cap cas es podria utilitzar per a obtenir el pH d'una mescla hidroorgànica, ni abans de barrejar la solució tamponada i el solvent orgànic ni, per descomptat, un cop ambdós solvents estiguin mesclats.

El s_s pH presenta un gran inconvenient experimental ja que, com l'escala és diferent per a cada solvent i fracció de modificador orgànic, caldria preparar tampons de calibració per a cada composició de fase mòbil en la que s'hagués de mesurar el pH, fet que fa quasi impossible el seu ús pràctic. Per altra banda, els valors de s_w pH sí que es poden correlacionar entre sí ja que el seu estat estàndard és el mateix en qualsevol cas. Tanmateix, és possible obtenir dades de s_s pH donat que els seus valors es poden relacionar amb els de s_w pH a partir de la següent expressió [51–54]:

$${}^s_w \text{pH} = {}^s_s \text{pH} + \delta \quad (19)$$

Tot i que la relació sembla senzilla, el sentit físic del terme δ és força complex. Aquest terme es basa en les contribucions de l'efecte primari del medi (que està relacionat amb el canvi en l'energia de Gibbs en la transferència d'ions H^+) i de la diferència en el potencial d'unió líquida del sistema d'elèctrodes entre el solvent hidroorgànic i la solució aquosa. Per tant, δ depèn pràcticament en la seva totalitat de la composició de la fase mòbil. La determinació d'aquest paràmetre, tant en mesclades d'aigua amb metanol [43,44,53,55] com amb acetonitril [54,56,57], ha donat lloc a equacions (20) i (21), que permeten l'estimació de δ únicament en funció del percentatge de modificador orgànic present a la fase mòbil [58,59]:

$$\delta = \frac{-0.446\varphi_{MeCN}^2}{1 - 1.316\varphi_{MeCN} + 0.433\varphi_{MeCN}^2} \quad (20)$$

$$\delta = \frac{0.09\varphi_{MeOH} - 0.11\varphi_{MeOH}^2}{1 - 3.15\varphi_{MeOH} + 3.51\varphi_{MeOH}^2 - 1.35\varphi_{MeOH}^3} \quad (21)$$

on φ_{MeCN} i φ_{MeOH} fan referència a la fracció en tant per u d'acetonitril i de metanol en la fase mòbil, respectivament. Aquestes equacions no són aplicables per a tot l'interval de fracció orgànica de la fase mòbil; en metanol es poden fer servir de manera fiable fins a un 80% en volum mentre que per acetonitril només es poden utilitzar fins a un 60% en volum de fracció orgànica en la fase mòbil.

1.3.3. Evolució del pH de la fase mòbil amb la fracció de modificador orgànic

Existeixen tres factors importants a l'hora d'avaluar la variació del pH d'una solució amortidora en funció de la quantitat de solvent orgànic que se li afegeixi. El primer és la pròpia concentració del tampó, ja que com més quantitat d'agent amortidor hi hagi en la solució més petita serà la variació del seu pH en afegir la mateixa quantitat de solvent orgànic. Anàlogament, com més gran sigui la fracció de modificador orgànic, més diferència hi haurà entre els valors de w_w pH i de s_w pH. Però el factor més important és la naturalesa de l'agent amortidor. Com a norma general, el valor de s_w pH de les solucions amortidores preparades a partir de substàncies amb caràcter àcid (ja siguin neutres o aniòniques) tendeix a pujar quan s'afegeix una fracció de solvent orgànic a la solució tamponada (per exemple tampons d'àcid fosfòric, àcid acètic, àcid fòrmic, etc.). Per altra banda, si la solució amortidora es prepara amb una substància de caràcter bàsic, el s_w pH del tampó baixarà conforme se li vagi afegint solvent orgànic (per exemple tampons d'amoni, TRIS, pirrolidina, etc.). Aquesta diferència de comportament pot explicar-se a partir de la teoria establerta per Izmailov [60], que relaciona la constant d'acidesa dels compostos amb les seves interaccions electrostàtiques, acidesa i basicitat intrínseques i altres efectes de solvatació. Tot i aquest comportament general, el valor de s_w pH de les solucions amortidores tant de

caràcter àcid com bàsic augmenta bruscament a fraccions molt elevades de modificador orgànic.

Tot i que mesurar el valor real de ^spH d'una fase mòbil és senzill, aquesta mesura no és fàcil en un procés d'elució en gradient ja que el percentatge de modificador orgànic varia durant l'elució. Per aquest motiu, el que cal fer és estimar-lo per a cada moment d'elució. Tot i que la literatura proposa aproximacions que permeten modelitzar com canvia el pH en funció de la composició de la fase mòbil [61,62], la manera més habitual i més senzilla d'estimar el pH de la fase mòbil durant una elució en mode gradient és a través de diverses mesures de valors de ^spH en mode isocràtic i, posteriorment, l'ajust d'aquests valors a una equació que podrà ser més o menys complexa en funció de la precisió requerida.

1.3.4. Evolució del pK_a de l'anàlit amb la fracció de modificador orgànic de la fase mòbil

D'una manera semblant a la definició del pH, el pK_a d'un compost és el logaritme decimal negatiu de la seva constant d'acidesa. De fet, el pK_a de l'anàlit i el pH d'una solució són dues propietats fisicoquímiques que es poden relacionar matemàticament a través de la coneguda equació de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{c_A}{c_{HA}} \quad (22)$$

on c_A i c_{HA} són les concentracions de solut en la seva forma desprotonada i protonada, respectivament. Aquesta equació es compleix sempre independentment de l'escala en la que estiguin els valors de pH, però això significa que els valors de pK_a estan en la mateixa escala i que, com en el cas del pH, el pK_a es pot expressar en valors de $^w\text{pK}_a$, $^s\text{pK}_a$ o $^s\text{pK}_a$, on les lletres s i w tenen el mateix significat que en el cas del pH. Així doncs, ambdues propietats mostren un comportament semblant quan s'afegeix una certa quantitat de solvent orgànic a una solució aquosa. Els soluts amb caràcter àcid (com els fenols o els àcids carboxílics) veuran com creix el seu pK_a conforme augmenta la fracció de modificador orgànic afegida mentre que els compostos amb caràcter bàsic

(com les amines o les piridines) experimentaran un descens en el seu valor de pK_a . Per últim, tal i com també passa amb el pH, és possible utilitzar el paràmetre δ a l'hora de transformar valors de ${}^s_w pK_a$ en valors de ${}^s pK_a$ [63].

Ara bé, en una elució en mode gradient on la composició de la fase mòbil varia constantment (i, per tant, el valor de ${}^s_w pK_a$ del compost), no és tan senzill estimar l'evolució d'aquest pK_a com ho és estimar l'evolució del pH. El mètode experimental per dur a terme aquesta estimació consisteix en mesurar la retenció del compost en mode isocràtic a diversos valors de s_w pH perfectament coneguts (es podria fer també amb valors de s pH, però no resulta pràctic a nivell experimental) i, posteriorment, substituir les dades obtingudes a l'equació fonamental de retenció d'anàlits ionitzables:

$$k = \frac{k_{HA} + k_A \cdot 10^{pH - pK_a}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (23)$$

on k_{HA} i k_A són els factors de retenció de la forma àcida i la forma bàsica de l'anàlit, respectivament (també definides com a formes protonada i desprotonada). Les càrregues de les diferents espècies s'han omès per simplicitat.

L'equació anterior descriu una corba sigmoide quan es representa gràficament el factor de retenció d'un anàlit ionitzable front el pH de la fase mòbil, el punt d'inflexió de la qual equival al valor de pK_a que es vol determinar. Repetint el procés per a diverses composicions isocràtiques de fase mòbil s'obtenen valors de pK_a a diferents fraccions de modificador orgànic i, per tant, és possible ajustar els valors obtinguts a una equació tal i com es fa també amb els valors de pH. El gran avantatge que té aquest mètode és que, en ser un mètode experimental, permet obtenir una bona estimació de l'evolució del pK_a però, per contra, requereix una gran quantitat de treball experimental.

Com a alternativa, la literatura proposa equacions que permeten estimar el valor de ${}^s_w pK_a$ de les substàncies en funció del seu grup funcional. Aquesta idea neix del treball de Chantooni i Kolthoff [64], qui van ser els primers en proposar una relació lineal entre els valors de ${}^s pK_a$ i ${}^w pK_a$ per a compostos d'una mateixa família que responia a l'expressió que es mostra a l'equació (24):

$${}^s pK_a = a_{s_w}^w pK_a + b_s \quad (24)$$

on el pendent a_s fa referència a la resolució de la força àcida (d'una determinada família de compostos en un solvent hidroorgànic, o completament orgànic, en referència a l'aigua) mentre que el terme independent b_s reflecteix les diferències entre les interaccions del compost en medi aquós i en medi hidroorgànic o orgànic. Aquesta relació per a les diferents famílies de compostos ha estat àmpliament tractada en la literatura [65–71].

El desenvolupament d'aquesta expressió lineal per a mescles hidroorgàniques [72–74] va donar lloc a expressions específiques per a aquests dos paràmetres a_s i b_s , tal i com es mostra a les equacions (25) i (26):

$$a_s = \frac{1 + a_{s1}\varphi + a_{s2}\varphi^2}{1 + a_{s3}\varphi + a_{s4}\varphi^2} \quad (25)$$

$$b_s = \frac{b_{s1}\varphi + b_{s2}\varphi^2}{1 + b_{s3}\varphi + b_{s4}\varphi^2} \quad (26)$$

En aquestes dues equacions, a_{s1} , a_{s2} , a_{s3} , a_{s4} , b_{s1} , b_{s2} , b_{s3} i b_{s4} són coeficients d'ajust constants per a cada família de compostos mentre que φ és, com sempre, la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil. Estudis experimentals presents a la literatura han permès donar valors d'aquests coeficients per a algunes famílies de compostos tant per acetonitril [57,75] com per metanol [72–74], valors que es recullen a la Taula 1.

Taula 1. Coeficients d'ajust que permeten el càlcul dels paràmetres a_s i b_s

	Mesclres hidroorgàniques amb acetonitril							
	a_{s1}	a_{s2}	a_{s3}	a_{s4}	b_{s1}	b_{s2}	b_{s3}	b_{s4}
Àcids carboxílics alifàtics	9.97	-8.59	8.83	-8.72	-0.68	9.94	8.45	-8.59
Àcids carboxílics aromàtics	52.04	-10.93	49.33	-32.69	-5.32	8.99	22.56	-23.21
Fenols	10.05	-10.04	7.97	-8.37	-5.33	9.95	0.19	-0.70
Amines	-0.73	-0.27	-0.87	-0.12	-1.82	2.25	-1.75	0.90
Piridines	-1.67	0.67	-1.66	0.67	-1.78	1.89	-0.58	-0.40
	Mesclres hidroorgàniques amb metanol							
	a_{s1}	a_{s2}	a_{s3}	a_{s4}	b_{s1}	b_{s2}	b_{s3}	b_{s4}
Àcids carboxílics alifàtics	-1.406	0.680	-1.551	0.827	1.034	-0.898	-1.250	0.277
Àcids carboxílics aromàtics (amb orto-substituents)	-1.189	0.190	-1.424	0.425	0.449	-0.429	-1.674	0.677
Àcids carboxílics aromàtics (sense orto-substituents)	-1.101	0.103	-1.516	0.518	-0.178	0.187	-1.699	0.702
Fenols	-0.656	-0.030	-0.844	0.133	-0.454	0.866	-0.017	-0.865
Amines	-0.476	0.209	-0.400	0.158	-0.458	0.477	-1.674	0.690
Piridines	2.617	0.000	2.809	0.000	-1.733	1.763	-1.214	0.272

Aquestes equacions són vàlides fins a un 100% de metanol però només fins a un 60% en volum d'acetonitril excepte en el cas de les piridines, on les equacions han pogut ser validades fins a un 100% gràcies a les dades experimentals obtingudes per Pawlak [76]. Per obtenir els valors finals de s_pK_a , que són els més interessants cromatogràficament, cal sumar el paràmetre δ als valors de s_pK_a obtinguts, un paràmetre que es pot calcular directament mitjançant les equacions (20) i (21) per fases mòbils on el modificador orgànic sigui metanol o acetonitril, respectivament, donant lloc a l'expressió:

$${}^s_pK_a = a_s {}^w_pK_a + b_s + \delta \quad (27)$$

Gràcies a l'equació (27), es pot estimar el valor real del s_pK_a a qualsevol composició de la fase mòbil únicament coneixent el seu valor de pK_a en aigua (w_pK_a), dada que es pot trobar amb relativa facilitat a la literatura [77–79].

1.4. RETENCIÓ EN CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC)

La capacitat més important de la cromatografia de líquids d'alta resolució, coneguda habitualment amb el nom de HPLC, és la de separar els compostos d'una mescla partir de les diferents interaccions que aquests tenen amb les dues fases cromatogràfiques. La manera més habitual de quantificar l'efecte d'aquestes interaccions és mitjançant la mesura de la retenció, ja que les substàncies que interaccionin més amb la fase estacionària estaran més retingudes i viceversa. Tot i que des d'un punt de vista de fonaments és més correcte utilitzar el volum de retenció, la mesura més habitual és el temps de retenció (t_R), que és el temps que triga un anàlit en recórrer la columna cromatogràfica. En el cas que una substància no interaccionés en absolut amb la fase estacionària es tractarà d'una substància no retinguda, i el temps de retenció mesurat serà considerat el temps mort del sistema cromatogràfic (t_0). La relació entre aquestes dues dades dóna lloc al que es coneix com a factor de retenció, k , tal i com es defineix a l'equació (28):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (28)$$

La retenció de les diferents substàncies es veu altament influenciada per les condicions experimentals d'elució (pH de la fase mòbil, naturalesa i fracció del modificador orgànic de la fase mòbil, etc.), per la qual cosa és força habitual modificar aquestes condicions per tal d'obtenir separacions de mescles més eficaces. L'habilitat de poder predir quina retenció tindrà un anàlit en funció de les condicions experimentals d'elució abans de realitzar la mesura cromatogràfica pot resultar una eina força interessant, especialment de cara al desenvolupament de metodologies analítiques que impliquin la separació d'una mescla de substàncies. Per aquest motiu, el desenvolupament i establiment de models que permetin la predicció de la retenció és un camp de gran interès en HPLC.

1.4.1. Retenció de substàncies neutres

Es considera una substància neutra aquella que no presenta propietats àcid-base en l'interval de pH propi de la fase mòbil i que, per tant, a efectes pràctics no es pot ionitzar. Aquest és un fet força significatiu ja que vol dir que la substància es mantindrà invariable sigui quin sigui el pH de la fase mòbil. Per tant, predir la retenció de substàncies neutres resulta relativament senzill ja que, atès que la seva retenció només depèn de la polaritat de la fase mòbil i és independent del seu pH, els diversos models proposats per explicar la retenció d'aquest tipus de compostos només cal que relacionin directament la retenció cromatogràfica (k) amb la composició de la fase mòbil (φ).

1.4.1.1. Retenció en mode isocràtic

El mode isocràtic és un mode d'elució en el qual la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil es manté constant durant tot el procés d'elució i, per tant, les propietats fisicoquímiques de la fase mòbil involucrades en l'anàlisi cromatogràfica, com per exemple la polaritat (P_m^N), no variaran durant el procés d'elució. En conseqüència, predir la retenció de compostos neutres en elucions isocràtiques resulta relativament senzill degut a que tant la composició de la fase mòbil com els paràmetres que en depenen mantindran un valor constant durant la totalitat del procés.

Tot i que inicialment es va proposar una relació lineal entre la retenció ($\log k$) d'un compost i la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil (φ) [80] està demostrat que aquesta relació dóna lloc a desviacions massa significatives [81], per la qual cosa una relació quadràtica com la que es mostra a l'equació (29) resulta força més adequada [82]:

$$\log k = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 \quad (29)$$

A més de l'expressió quadràtica, la literatura n'ofereix d'altres que relacionen aquestes dues variables, expressions normalment basades en coeficients empírics o semiempírics [1,83–85]. Una d'aquestes expressions és l'equació (30), expressió que està basada en els tres paràmetres empírics a , b i c :

$$\log k_{\varphi} = a - \frac{c\varphi}{1 + b\varphi} \quad (30)$$

a , b i c són constants per a cada solut i específics de cada sistema cromatogràfic, entenent per sistema cromatogràfic el conjunt de columna i tipus de modificador orgànic. Aquest model, model de tres paràmetres d'ara en endavant, s'ha fet servir amb èxit per predir temps de retenció de molts compostos neutres [86–88]. Addicionalment, aquest darrera equació també s'ha utilitzat amb èxit en mode gradient [89].

Alternativament als models que relacionen la retenció (k) i la fracció de modificador orgànic (φ), també es va proposar que la retenció dels anàlits podia no expressar-se directament mitjançant la fracció de modificador orgànic sinó a partir de descriptors de polaritat de la fase mòbil, com per exemple el de Dimroth-Reichardt, E_T^N [45]. Així doncs, en utilitzar aquest paràmetre en la seva versió normalitzada, s'obtenia la següent expressió [47]:

$$\log k = q' + p' E_T^N \quad (31)$$

En l'equació (31) s'inclouen dos descriptors propis de cada solut, q' i p' , així com el descriptor de polaritat normalitzat de la fase mòbil E_T^N . Posteriorment, es va veure que ambdós descriptors del solut estan correlacionats, per la qual cosa es va assumir una relació lineal entre q' i p' [46,90]. Aquesta relació, que es va observar per a una gran varietat de substàncies, va donar lloc a una nova expressió:

$$\log k = (\log k)'_0 + p' (E_{Tm}^N - E_{Ts}^N) \quad (32)$$

en la qual es troben un total de quatre descriptors que fan referència als diferents factors que intervenen en el procés de retenció com el solut (p'), la polaritat de la fase mòbil (E_{Tm}^N) o la polaritat de la fase estacionària (E_{Ts}^N). Per últim, $(\log k)'_0$ representa la retenció de l'anàlit en el cas hipotètic que la polaritat de la fase mòbil i de la fase estacionària fos exactament la mateixa.

Tot i que la correlació entre $\log k$ i el paràmetre de polaritat de la fase mòbil (E_{Tm}^N) és força bona, està limitada a un cert interval de linealitat (0-80% en volum per acetonitril, 20-100% en volum per metanol). Per tal d'eliminar aquesta limitació, els paràmetres de polaritat basats en E_T es van substituir pel prèviament esmentat

paràmetre de polaritat de la fase mòbil P_m^N , descrit per a acetonitril i per a metanol en les equacions (17) i (18) respectivament. Així doncs, després d'aquesta substitució l'equació (31) va donar lloc a l'equació (33), expressió que depèn de dos paràmetres empírics, p i q , i que d'ara en endavant serà anomenada model de dos paràmetres:

$$\log k = q + pP_m^N \quad (33)$$

Per altra banda, la substitució dels paràmetres de polaritat a l'equació (32) va requerir no només la presència del paràmetre de polaritat de la fase mòbil P_m^N sinó que també va necessitar la introducció del seu homòleg de la fase estacionària P_s^N . Així doncs, es va obtenir l'equació (34) que depenia només del paràmetre empíric p i que és coneguda com a model d'un paràmetre:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (34)$$

Aquests canvis en els paràmetres de polaritat utilitzats van donar lloc a models de predicció que van permetre cobrir la totalitat de l'interval de composicions de fase mòbil (0-100% tant en acetonitril com en metanol) de forma fiable.

Dels quatre paràmetres que conté l'equació (34), només un depèn de l'anàlit d'interès (p), ja que P_m^N depèn de la polaritat de la fase mòbil i tant P_s^N com $(\log k)_0$ són paràmetres propis del sistema cromatogràfic (columna i tipus de modificador orgànic). Ara bé, encara que aquests dos últims siguin paràmetres constants per a cada sistema cromatogràfic, cal determinar-ne el valor per tal de poder utilitzar el model de predicció. El mètode més adequat per dur a terme aquesta determinació és un procediment conegut com a caracterització de columna. Aquest procediment consisteix en la mesura de la retenció en mode isocràtic d'un conjunt de 12 substàncies predeterminades a diverses composicions de la fase mòbil [47,91] i el posterior ajust de les dades experimentals a l'equació (33). Aquest ajust permet la determinació de valors independents de p (pendent) i q (ordenada a l'origen) per a cada compost de caracterització. Si posteriorment aquests valors s'ajusten a l'equació (35), resultant de substituir l'equació (33) a l'equació (34), és possible obtenir els valors de $(\log k)_0$ i de P_s^N per al sistema cromatogràfic:

$$q = (\log k)_0 - pP_s^N \quad (35)$$

Posteriorment, és recomanable sotmetre aquests valors inicials de $(\log k)_0$ i P_s^N a un procés d'iteració consistent en reduir la suma de mínims quadrats entre els valors de $\log k$ experimentals i els valors calculats a partir de l'equació (34) fins assolir un mínim. Aquest procés és utilitzat per tal de refinar els valors dels paràmetres propis del sistema cromatogràfic i guanyar exactitud en la predicció. Un cop els valors de $(\log k)_0$ i P_s^N són perfectament coneguts, la retenció del solut només dependrà del valor de p d'acord amb l'equació (34). Aquest model s'ha fet servir amb anterioritat de forma satisfactòria per predir els factors de retenció de soluts neutres en RP-HPLC [41,47–49,86,91–95].

Un dels aspectes més interessants a l'hora d'establir models de predicció és que requereixin el mínim treball experimental previ possible, fet que porta a buscar models senzills o simplificacions sobre els models habitualment utilitzats. Un dels exemples més clars està en el prèviament mencionat model de tres paràmetres. Els tres paràmetres experimentals de l'equació (30) han de ser determinats de forma simultània en condicions isocràtiques abans de poder utilitzar-lo per realitzar les prediccions, fet que requereix una quantitat considerable de treball experimental preliminar. Per tal de reduir la feina experimental necessària, es pot considerar b com la constant d'equilibri del procés d'adsorció entre el modificador orgànic i la fase estacionària, fet que dóna lloc a un valor constant [83]. Realitzant aquesta aproximació, s'arriba a l'equació (33), una expressió que depèn de dos paràmetres [46,96] i expressa la relació entre la retenció i la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil per mitjà del paràmetre de polaritat P_m^N .

De totes maneres, el model de dos paràmetres segueix requerint un treball experimental significatiu. Com ja s'ha vist, una possible simplificació d'aquest model consisteix en assumir una relació lineal entre q i p , desenvolupant així un model que depèn només d'un paràmetre [46,90] com és l'equació (33). Aquesta equació en realitat implica tres paràmetres però només un d'ells, p , és realment un paràmetre variable que depèn de cada compost en particular, ja que cal recordar que $(\log k)_0$ i P_s^N són constants per un determinat sistema cromatogràfic (és a dir, per a una mateixa combinació de columna cromatogràfica columna i tipus de modificador orgànic utilitzat). El paràmetre p depèn bàsicament de la polaritat del solut, els anàlits polars

tenen valors baixos de p mentre que les substàncies apolars tenen valors més elevats. Tot i això, encara que en menor mesura, p també depèn del tipus de modificador orgànic que es faci servir i de la fase estacionària utilitzada. Encara que existeixen diverses maneres de determinar el valor de p , la més habitual i més senzilla és realitzant un experiment en isocràtic, essent suficient una sola mesura de la retenció, i substituint el valor de retenció a l'equació (34), sempre tenint en compte que el sistema cromatogràfic estigui prèviament caracteritzat. A més, aquesta mesura pot realitzar-se a qualsevol fracció de modificador orgànic de fase mòbil, ja que la retenció es relacionarà amb la composició de la fase mòbil mitjançant el valor de P_m^N corresponent. Addicionalment, cal afegir que els valors de p tabulats o obtinguts experimentalment poden correlacionar-se d'una columna a una altra [47,97].

Per últim, encara que la seva aplicació més habitual sigui la de predir temps de retenció, cal afegir que aquest paràmetre p també està relacionat amb alguns paràmetres físics de rellevància, com per exemple el logaritme del coeficient de partició octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) [98,99].

1.4.1.2. Retenció en mode gradient

L'elució en gradient és un dels mètodes de treball més interessants i més emprats en HPLC ja que, en ser un mode en què la composició de la fase mòbil es pot fer variar a voluntat durant l'elució, es pot aconseguir la separació completa de diferents soluts en un temps relativament curt [1]. Per tant, un dels temes de major interès és el desenvolupament de models que siguin capaços de predir el temps de retenció en mode gradient, ja que d'aquesta manera es podran optimitzar anàlisis i procediments, fet que comportarà un estalvi en temps i en recursos més que interessant. Així doncs, s'han proposat diferents models capaços de descriure com es comporten i retenen els anàlits durant l'elució en RP-HPLC en mode gradient [86,89,100–109].

Una de les maneres de desenvolupar mètodes de predicció de la retenció cromatogràfica és partir de l'equació fonamental de l'elució en gradient [110–112], que respon a la següent expressió:

$$\int_0^{t_R-t_0} \frac{dt}{t_0 k_\varphi} \quad (36)$$

En aquesta equació, t_R és el temps de retenció del solut, t_0 és el temps mort del sistema cromatogràfic, mentre que k_φ és el factor de retenció del solut per a una fracció de modificador orgànic de la fase mòbil determinada (φ), composició expressada en tant per u. Entre totes les aproximacions a l'equació fonamental de l'elució en gradient destaca la de Nikitas i col·laboradors, que van establir que el gradient continu format en el mesclador és equivalent a una successió de múltiples fases mòbils, cadascuna d'elles de concentració fixa i amb una durada igual al diferencial de temps δt [88,89,113]. L'equació (37), que dóna resposta a l'equació (36), és la següent:

$$\int_0^{t_R - t_D^*} \frac{dt_c}{t_0(1+k_\varphi)} + \frac{t_D}{t_0 k_\varphi} = 1 \quad (37)$$

on dt_c és l'interval infinitesimal de temps en el que l'anàlit està sota la influència d'una concentració concreta de fase mòbil (de composició φ) i t_D és el temps de residència del sistema, és a dir, el temps que triga el gradient establert en el mesclador en arribar al començament de la columna cromatogràfica. Addicionalment, t_D^* és el temps de residència corregit del sistema, calculat a partir de la següent equació:

$$t_D^* = t_D + \frac{(1+k_{\varphi_{in}})}{k_{\varphi_{in}}} \quad (38)$$

on $k_{\varphi_{in}}$ és el factor de retenció del solut en les condicions inicials d'elució.

A partir de l'equació fonamental de l'elució cromatogràfica (equació (36)) i de l'aproximació anterior (equació (37)), la condició que ha de complir un solut per eluir-se és que la suma de la distància relativa recorreguda pel propi solut en cada composició de fase mòbil fixa sigui igual o superior a la longitud de la columna. Aquesta condició es mostra a la següent expressió:

$$\sum \frac{\delta L_a}{L} = \sum_{i=1}^n \frac{\delta t}{t_0 k_\varphi} \geq 1 \quad (39)$$

En l'equació (39), es substitueixen els diferencials de temps (d) presents en les anteriors equacions per increments de temps (δ). De cara a respectar el concepte matemàtic del diferencial, se solen agafar els increments petits, temptativament de 0.01 minuts. Un cop es determina el valor n , que representa el valor enter més petit

que fa que es compleixi la condició necessària per a l'elució, es pot determinar el temps de retenció mitjançant la següent expressió:

$$t_R = t_D^* + \alpha t \sum_{i=1}^n \frac{1+k_{\varphi}}{k_{\varphi}} \quad (40)$$

Així doncs, a l'hora d'utilitzar l'equació (40) per determinar el temps de retenció es fa imprescindible conèixer la relació existent entre el factor de retenció dels anàlits (k) i la fracció de modificador orgànic de la fase mòbil (φ), relació que s'explica extensament en l'apartat anterior.

1.4.2. Retenció de substàncies ionitzables

Es coneix com a anàlit ionitzable a aquell compost que presenta propietats àcid-base per la qual cosa, en funció del pH del medi, pot estar en la seva forma neutra o en la seva forma ionitzada. Per a un anàlit ionitzable, la relació entre les concentracions de la forma neutra i la forma ionitzada ve determinada per la constant d'equilibri àcid-base, que pren la següent forma pels anàlits monopròtics:

$$K'_a = a_H \frac{[A]}{[HA]} \quad (41)$$

on $[HA]$ i $[A]$ són les concentracions de la forma àcida i de la forma bàsica de l'anàlit, respectivament. Depenent de la constant d'acidesa, normalment expressada en forma de pK_a (el seu logaritme decimal negatiu) i del pH del medi, els compostos es trobaran en la seva espècie neutra o ionitzada. Cal recalcar que la constant d'acidesa s'expressa mitjançant les activitats de les diferents espècies, el paràmetre que es defineix amb les concentracions de les diferents formes de l'anàlit és la constant d'acidesa K'_a .

1.4.2.1. Retenció en mode isocràtic

Tal i com passava per a la retenció d'anàlits neutres, la composició de la fase mòbil constant en el mode isocràtic fa que el seu pH així com el pK_a de l'anàlit que s'elueix no varii durant l'elució cromatogràfica. Aquests dos paràmetres tenen una gran influència en la retenció d'anàlits ionitzables, tal i com mostra l'equació (23) [58,59,84,85,114]. En aquesta equació també hi apareixen els factors de retenció tant de la forma àcida

com de la forma bàsica de l'anàlit (k_{HA} i k_A respectivament); en aquest sentit cal tenir en compte que la forma neutra d'una substància es reté força més que la seva forma ionitzada (en àcids, la forma àcida del compost serà l'espècie neutra mentre que per bases, la forma àcida serà l'espècie ionitzada).

La Figura 6 és un exemple de representació gràfica de l'equació (23) per a un àcid i per a una base monoprotòtica. A través de la figura, resulta senzill estimar de forma aproximada tant el valor de pK_a del compost (en el seu punt d'inflexió) com els temps de retenció de l'espècie neutra i de l'espècie ionitzada (en els braços horitzontals de la corba, on el temps de retenció més elevat és el que fa referència a l'espècie neutra de l'anàlit):

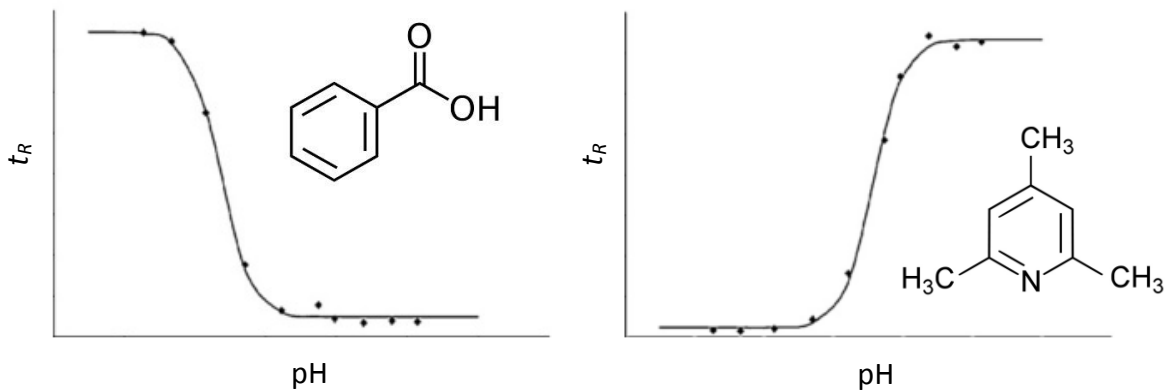


Figura 6. Exemple de corba de retenció per un àcid (esquerra) i per una base (dreta)

Cal aclarir que, tot i que l'equació original fa referència a factors de retenció, és possible obtenir la mateixa relació si es substitueixen aquests factors de retenció per altres magnituds relacionades, com per exemple el temps de retenció, el temps de retenció ajustat, el volum de retenció o el volum de retenció ajustat [58,59,115].

Així doncs, si es parteix de la base que la retenció d'un anàlit ionitzable és una mitjana ponderada entre la retenció de l'anàlit en forma totalment neutra i la retenció de l'anàlit en forma totalment ionitzada, s'obté la següent relació:

$$k = (1 - D)k_N + Dk_I \quad (42)$$

on k_N és el factor de retenció de l'espècie neutra de l'anàlit, k_I el de l'espècie ionitzada i D representa el grau d'ionització de l'anàlit, és a dir, la fracció en tant per u d'ionització

de l'anàlit (essent 0 per a l'anàlit en estat neutre i 1 per a l'anàlit en estat completament ionitzat). D es defineix mitjançant la següent expressió:

$$D = \frac{1}{1 + 10^{i(\text{p}K_a - \text{pH})}} \quad (43)$$

on i , en anàlits monoprotics, pren el valor de +1 per a àcids i de -1 per a bases [116].

Tal i com s'ha explicat als apartats 1.3.3 i 1.3.4, cal tenir present que afegir modificador orgànic a una solució aquosa tamponada altera el pH de la mateixa, així com el $\text{p}K_a$ dels anàlits que s'hi continguin, alteració que dependrà del volum i del tipus de modificador orgànic que s'afegeixi. Per tant, el grau d'ionització de l'anàlit en la fase mòbil de treball també variarà en funció de la fracció de modificador orgànic. Tot i això, quan l'elució és en mode isocràtic, ni el pH de la fase mòbil ni el $\text{p}K_a$ de l'anàlit (ni, per extensió, el seu grau d'ionització) variaran durant l'elució ja que la composició de la fase mòbil es mantindrà constant.

Un cop solucionada la modelació de l'ionització, cal integrar la retenció de les dues espècies de l'anàlit monoprotic (neutra i ionitzada) dins l'equació (23) per tal de desenvolupar un model robust. Una de les aproximacions que relaciona els factors de retenció de les dues espècies de l'anàlit consisteix en considerar que la retenció de la forma ionitzada és una fracció de la retenció de la forma neutra [117,118], a través de la simple expressió següent:

$$f = \left(\frac{k_A}{k_{HA}} \right)^i \quad (44)$$

on els subíndexs fan referència respectivament a la forma desprotonada i protonada de l'anàlit mentre que el paràmetre i equival al que s'ha fet servir en l'equació (43).

Si s'introdueixen els paràmetres D i f (descrits en les equacions (43) i (44), respectivament) a l'equació (23) i es reorganitzen els termes s'arriba a la següent expressió, que permet la predicció de la retenció d'un anàlit monoprotic en mode isocràtic:

$$\log k = \log k_N + \log [1 - D(1 - f)] \quad (45)$$

tenint en compte que $\log k_N$ es refereix a la retenció de la forma neutra (no ionitzada) de l'anàlit.

1.4.2.2. Retenció en mode gradient

Tot i que hi ha alguns articles on és tractada [119,120], la predicció de la retenció en mode gradient d'anàlits amb propietats àcid-base no és un tema resolt i, per tant, es fa necessari l'establiment de models robustos que permetin predir la retenció cromatogràfica de compostos ionitzables. Això resultaria de gran utilitat ja que ajudaria a reduir el màxim possible el temps i els recursos dedicats al treball experimental previ al disseny de mètodes de separació o de metodologies d'anàlisi en HPLC. L'establiment de models per a la predicció d'àcids i de bases senzills i d'utilitat pràctica ha estat un dels propòsits d'aquest treball.

1.5. LIPOFILICITAT DE COMPOSTOS D'INTERÈS BIOLÒGIC I FARMACÈUTIC

La lipofilitat és una propietat que, en avaluar l'afinitat d'una substància per un entorn lipídic, el que realment fa és donar una idea sobre les seves propietats biològiques, farmacocinètiques i metabòliques [121–123]. Això converteix la lipofilitat en un aspecte essencial dels compostos en el camp del descobriment de nous fàrmacs (*drug discovery*), ja que la seva mesura pot donar una idea sobre com es comportaran les substàncies en sistemes biològics com podria ser, per exemple, el cos humà.

La manera més habitual de mesurar la lipofilitat és a partir del logaritme decimal del seu coeficient de partició ($\log P$), un paràmetre que reflecteix la manera com la substància es distribueix entre dos solvents immiscibles que es troben en equilibri. Tot i que al llarg del temps s'han estudiat diverses combinacions de solvents, des dels estudis de Hansch i Fujita [124] s'ha establert que el coeficient més adequat és l'obtingut a partir d'aigua i 1-octanol com a solvents (habitualment conegut com a $\log P_{o/w}$) ja que l'octanol, en constar d'una cadena hidrocarbonada apolar llarga (C_8) i un extrem polar ($-OH$), és el solvent que millor funciona com a model dels constituents lipídics de les membranes biològiques. A més, l'octanol presenta altres avantatges respecte altres solvents orgànics com per exemple una gran capacitat per dissoldre compostos orgànics, la capacitat d'interaccionar amb molts grups polars diferents (ja que és tant acceptor com donador d'enllaços per pont d'hidrogen) o una pressió de vapor baixa que facilita poder dur a terme mesures reproduïbles. Tenint en compte que el sistema de partició octanol-aigua ja està establert des de fa molt temps degut essencialment a tots aquests punts a favor, existeix una gran acumulació de dades referides al sistema, ja siguin experimentals com estimades.

Tot i que aigua i octanol són dos solvents aparentment immiscibles, cal tenir en compte, però, que l'aigua és moderadament soluble en octanol [125,126]. Això per una banda representa un avantatge ja que no cal que els grups polars sofreixin un

procés de deshidratació per ser transferits de la fase aquosa a la fase orgànica, però per altra banda cal tenir en compte que si es vol determinar valors de $\log P_{o/w}$ de forma experimental, caldrà realitzar un procés previ de saturació d'aigua en octanol per tal que les mesures siguin fiables. La Figura 7 mostra com, efectivament, l'octanol i l'aigua tenen una interacció significativa.

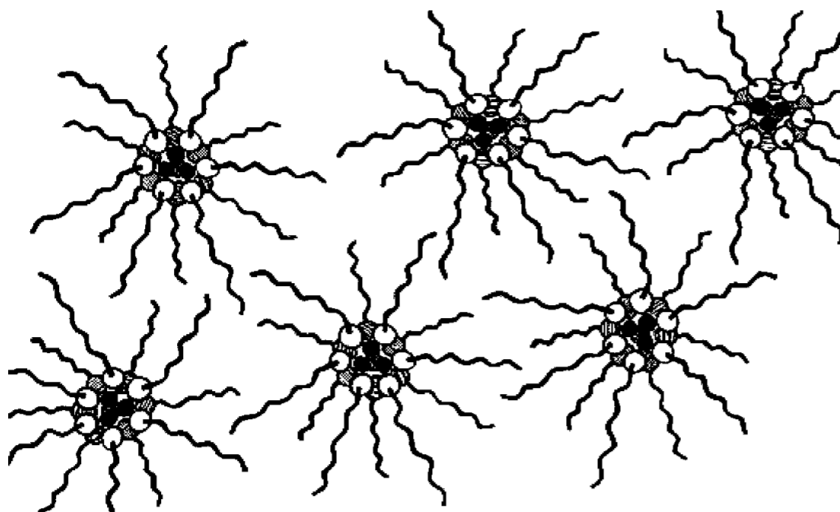


Figura 7. Estructura de l'octanol (o) saturat en aigua (●), basada en mesures de difracció de raigs X [126]

Per calcular el $\log P_{o/w}$ d'un compost cal relacionar les concentracions presents a cadascuna de les dues fases mitjançant la següent expressió:

$$\log P_{o/w} = \log \frac{c_o}{c_w} \quad (46)$$

on c_o correspon a la concentració de l'anàlit en la fase octanòlica mentre que c_w correspon a la concentració en la fase aquosa.

Tanmateix, el coeficient de partició és un paràmetre que només fa referència a l'espècie neutra del compost. Per tant, tenint en compte que la gran majoria de compostos d'interès farmacèutic contenen grups funcionals ionitzables, es fa necessària una expressió que tingui en compte com es reparteixen totes les possibles espècies d'un mateix compost entre les dues fases. Per aquest motiu es defineix el coeficient de distribució (D) com la mitjana ponderada de la distribució global de totes les espècies del compost d'acord amb els seus diferents coeficients de partició i en funció del grau d'ionització del compost [127]. O dit d'una altra manera, el coeficient

de distribució és una propietat que engloba els coeficients de partició de totes les espècies d'un compost, entre els que es poden trobar la partició de l'espècie neutra, la partició de l'espècie ionitzada, la partició dels parell iònics que es puguin formar, etc. Així doncs, posant l'exemple d'un àcid monopròtic (en el que coexisteixen la forma neutra i la forma ionitzada del compost), la distribució simplificada entre les dues fases tindria l'esquema que es mostra a la Figura 8.

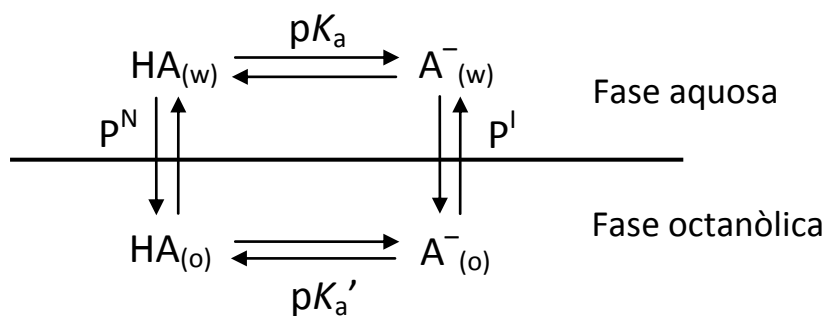


Figura 8. Esquema de la distribució d'un àcid monopròtic entre la fase aquosa i la fase octanòlica, on P^N és el coeficient de partició de l'espècie neutra i P^I és el coeficient de partició de l'espècie ionitzada

En aquest cas concret, tenint en compte que el pH del medi i el pK_a de la substància (tant el pK_a aquós com el pK'_a aparent que tindrà lloc a la fase octanòlica) condicionaran la concentració de cada espècie en la distribució, l'expressió matemàtica que permetrà la determinació de la lipofilitat és la següent:

$$D = \frac{P^N}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} + \frac{P^I}{1 + 10^{(pK'_a - pH)}} \quad (47)$$

on P^N i P^I són, respectivament, els coeficients de partició de l'espècie neutra i de l'espècie ionitzada del compost.

Tot i que l'estructura general de l'equació anterior és vàlida per a qualsevol equilibri d'espècies del compost a analitzar que puguin existir, en el cas concret dels equilibris àcid-base es sol assumir que les espècies ionitzades no es particionen de forma significativa cap a la fase orgànica. Per aquest motiu, tot i que no és totalment correcte, aquest aspecte de la distribució sol negligir-se i donar així lloc a una expressió força més senzilla:

$$D = \frac{P^N}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad (48)$$

Si es relaciona aquesta última equació amb les expressions que defineixen el coeficient de partició (equació (46)) i la constant d'acidesa (equació (35)), es pot arribar a una expressió en què el coeficient de distribució només depèn de les concentracions de les diferents espècies en les diferents fases de l'equilibri:

$$\log D = \log \frac{[HA]_o}{[HA]_w + [A^-]_w} \quad (49)$$

en la que els subíndexs fan referència a la fase en la que es troba aquesta concentració, *w* és la fase aquosa mentre que *o* representa la fase octanòlica.

Així doncs, tenint en compte que el grau d'ionització del compost juga un paper clau en el seu coeficient de distribució, paràmetres fisicoquímics com el pH de la fase aquosa i el pK_a de la substància d'interès tornen a ser de gran importància en la determinació de la partició. Per tant, tenint en compte que diferents valors de pH (el pK_a és constant per a cada compost i no es pot modificar) donaran lloc a diferents valors de lipofilitat, és força habitual tamponar la fase aquosa de la partició per veure com es distribueixen els compostos entre les dues fases a un determinat valor de pH. En aquest sentit, el pH 7.4 es considera com un valor de pH de gran importància en el camp farmacèutic i biològic ja que és el pH de la sang, per la qual cosa el valor de lipofilitat en aquest pH ($\log D_{7.4}$) resulta extremadament interessant degut a la seva rellevància fisiològica i similitud amb els processos de partició biològics reals. A més, el $\log D_{7.4}$ està considerat com un dels descriptors de lipofilitat més rellevants per a estudis d'absorció, distribució, metabolisme, excreció i toxicitat (ADMET) [126,128,129].

Degut al seu gran interès, són nombrosos els estudis destinats a desenvolupar mètodes i procediments que permetin la determinació de la lipofilitat de manera robusta, fiable i aplicables tant per determinar valors de $\log P_{o/w}$ com valors de $\log D$. Entre ells, destaquen els mètodes potenciomètrics [130–133] i els mètodes cromatogràfics, que a la vegada, es poden dividir en els mètodes que es basen en l'ús del factor de retenció extrapolat a aigua pura ($\log k_w$) [134,135], els que combinen la retenció cromatogràfica amb l'ús de descriptors derivats de l'estructura dels

compostos [98,136–140] i els que utilitzen l'índex d'hidrofobicitat cromatogràfica, conegut habitualment com a CHI [141,142]. Per altra banda, també existeixen mètodes de predicció que utilitzen programes de càlcul que estimen el valor de $\log P_{o/w}$ d'una substància a partir de la seva estructura [143–146], una manera d'obtenir una estimació de la lipofilitat força ràpida però que té com a gran inconvenient que cada programa respon a un algoritme diferent i, per tant, sovint porten a resultats diferents que poden concordar o no amb els valors experimentals [147].

Però per sobre de tots ells, el mètode clàssic per determinar valors de $\log P_{o/w}$ és el mètode d'equilibrament de fases, normalment conegut com a mètode de *shake-flask* [148]. Aquest procediment consisteix en mesclar en un mateix recipient una solució aquosa del compost d'interès amb una certa quantitat d'octanol (prèviament saturat amb aigua), agitar el recipient i posteriorment deixar que les dues fases se separin i s'equilibrin de tal manera que el compost es distribueixi lliurement entre elles. Una mesura posterior de la concentració del compost en ambdues fases permet la determinació del valor de $\log P_{o/w}$ o del $\log D$. Per realitzar la mesura de la concentració en cada fase, les tècniques més utilitzades són l'espectrometria i la cromatografia de líquids. El mètode de detecció cromatogràfica utilitzat pot anar des d'una senzilla detecció per UV-Vis fins a la detecció per espectrometria de masses, un tipus de quantificació que gràcies a la seva elevada sensibilitat resulta especialment útil per a mesurar solucions en les que la concentració del solut sigui molt baixa.

Per contra, el mètode de *shake-flask* també presenta alguns inconvenients, com per exemple la limitada solubilitat que poden tenir alguns compostos en la fase aquosa (especialment compostos voluminosos de caràcter orgànic), la possible formació de microemulsions o el fet de ser un procediment lent que requereix un temps llarg. A la literatura es poden trobar estudis on aquests i altres inconvenients del *shake-flask* s'analitzen en major o menor mesura [121,125,128,149–151]. De totes maneres, es considera que els avantatges compensen amb escreix els inconvenients que presenta, així que encara que és un mètode tediós i que requereix un treball experimental considerable, la seva simplicitat i la seva semblança amb els processos biològics de partició real han fet que el mètode de *shake-flask* sigui considerat com el mètode de referència per a la determinació de valors de lipofilitat, tant $\log P_{o/w}$ com $\log D$ [128].

Tot i que tradicionalment els valors de lipofilitat per *shake-flask* s'han obtingut mesurant les concentracions de solut en ambdues fases, la injecció d'octanol dins d'un sistema cromatogràfic sol ser problemàtica ja que, donada la seva elevada viscositat, és un solvent que tendeix a romandre dins del sistema i embrutar la columna cromatogràfica. Per aquest motiu, Valkó va proposar un procediment que requereix només la mesura de la concentració de la fase aquosa de la partició [151]; si es coneix perfectament la quantitat d'anàlit present a la solució i s'assumeix que no hi ha absorció de solut a les parets del recipient on es porta a terme el procés de partició, és possible obtenir la concentració de solut a la fase octanòlica per diferència. Així doncs, desenvolupant els termes de l'equació (46), es poden obtenir valors de $\log P_{o/w}$ o de $\log D_{7,4}$ a partir de la següent expressió:

$$\log D = \log \left(\left(\frac{A_{st}}{A_w} - 1 \right) \frac{V_w}{V_o} \right) \quad (50)$$

on A_{st} és l'àrea del pic cromatogràfic corresponent a la solució patró (necessari per tal de conèixer la concentració inicial d'anàlit), A_w és l'àrea del pic cromatogràfic corresponent a la fase aquosa de la partició i V_w i V_o són els volums d'aigua i octanol (respectivament) amb els que s'ha realitzat la partició.

No obstant, tot i ser el mètode de referència a l'hora de determinar la lipofilitat dels compostos, el *shake-flask* és un mètode que presenta algunes limitacions tant a nivell d'optimització del treball experimental i del temps invertit com a nivell d'aplicació. Avui en dia, a la indústria farmacèutica cada cop es sintetitzen més compostos candidats a fàrmac, de propietats més variades i en menys quantitat, per la qual cosa cal adaptar el tradicional mètode de *shake-flask*. Així doncs, les noves necessitats de la indústria fan necessària la millora d'aquest mètode, fent-lo apte per a la determinació de productes compresos en un interval ampli de lipofilitat i utilitzant poca quantitat de mostra. Un dels objectius d'aquest treball ha estat, doncs, l'establiment de procediments adequats a les necessitats emergents de la indústria farmacèutica.

PUBLICACIONES

A continuació es presenta el llistat de publicacions derivades de la recerca desenvolupada durant la realització de la tesi doctoral, així com una còpia de cadascuna d'elles:

- ARTICLE 1:** *Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: a step-by-step tutorial*
Axel Andrés, Ken Broeckhoven, Gert Desmet
Anal. Chim. Acta (2015), Ahead of print
DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.030
- ARTICLE 2:** *Chromatographic models to predict the elution of ionizable analytes by organic modifier gradient in reversed phase liquid chromatography*
Axel Andrés, Adolfo Téllez, Martí Rosés, Elisabeth Bosch
J. Chromatogr. A 1247 (2012), 71-80
- ARTICLE 3:** *Gradient retention prediction of acid-base analytes in reversed phase liquid chromatography: a simplified approach for acetonitrile-water mobile phases*
Axel Andrés, Martí Rosés, Elisabeth Bosch
J. Chromatogr. A 1370 (2014), 129-134
- ARTICLE 4:** *Prediction of the chromatographic retention of acid-base compounds in pH buffered methanol-water mobile phases in gradient mode by a simplified model*
Axel Andrés, Martí Rosés, Elisabeth Bosch
J. Chromatogr. A 1385 (2015), 42-48
- ARTICLE 5:** *Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts*
Axel Andrés, Martí Rosés, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch, Sonia Espinosa, Víctor Segarra, Josep M. Huerta
Eur. J. Pharm. Sci. 76 (2015), 181-191



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Tutorial

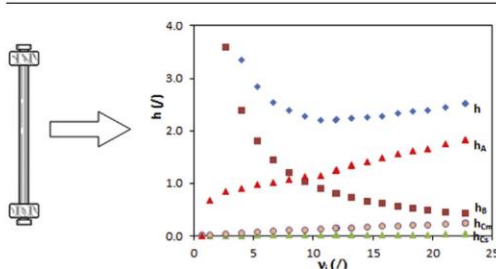
Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: A step-by-step tutorial

Axel Andrés ^{a,*}, Ken Broeckhoven ^b, Gert Desmet ^b^a Departament de Química Analítica i Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain^b Vrije Universiteit Brussel, Department of Chemical Engineering, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium

HIGHLIGHTS

- The van Deemter equation indicates the performance of an LC column.
- Band broadening is split into its different contributions and estimated separately.
- Kinetic performance of columns is also studied through kinetic plots.
- An Excel template that allows an easy LC column characterization is provided.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015
 Received in revised form
 8 August 2015
 Accepted 13 August 2015
 Available online xxx

Keywords:

Band broadening
 LC columns
 Kinetic plots
 Intra-particle diffusion
 van Deemter

ABSTRACT

Due to the developing insights in the theory of chromatography, column manufacturers of any kind (industrial, academic) nowadays have a broad array of experimental column testing tools at their disposal. The present tutorial aims at helping the novice in the field getting an overview of these tools and provides a fixed procedure to carry out the subsequent steps in the column quality analysis (guided via an Excel template file). After some brief introduction about the main equations, the reader is taken step by step through the theories underlying the measurement methods for the different column and performance parameters. In the final section, the reader is taken through the different items in the Excel template.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Theoretical background	00
1.1. Efficiency and plate height models	00
1.2. Permeability	00

* Corresponding author. Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain.
 E-mail address: axelandres@ub.edu (A. Andrés).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.030>

0003-2670/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: A. Andrés, et al., Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: A step-by-step tutorial, *Analytica Chimica Acta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.030>

2.	List of main performance and system parameters	00
3.	Plate height and column permeability measurement	00
4.	Methods to measure B-term and D_{eff}	00
4.1.	Peak parking	00
4.2.	Measurement of plate height at a very small flow rate	00
5.	Methods to measure the porosity	00
5.1.	Measuring ϵ via inverse size-exclusion chromatography	00
5.2.	Measuring ϵ via Donnan exclusion	00
5.3.	Measuring ϵ via total pore blocking	00
6.	Methods to estimate diffusion and mass transfer	00
6.1.	Band broadening contribution from the stationary phase mass transfer	00
6.2.	Band broadening contribution from the mobile phase mass transfer	00
7.	Particle size measurement and definition of average	00
8.	Plate height and kinetic plots	00
9.	Detailed performance analysis – excel template	00
10.	Conclusions	00
	Acknowledgments	00
	References	00

1. Theoretical background

High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most widespread used techniques in the scientific community thanks to its multiple applications [1–13]. HPLC users desire to perform separations of an ever higher quality in ever shorter times, which means that developers of chromatographic columns and instruments have to continuously work in order to improve the performance limits of the technique. Especially the column development has been quite active lately and nowadays analyses can be performed in very short times getting very good resolution and symmetric peaks with very little band broadening [14–31]. Thus, during the last years a lot of effort has been placed in improving HPLC performance. Whereas many of these improvements were made on the side of improving column robustness and the availability of better and more versatile selectivities, the present contribution focuses on the “mechanical” qualities of the columns, i.e., the column efficiency (represented by the number of theoretical plates N) and the column permeability. Both parameters jointly determine the overall chromatographic kinetic performance.

1.1. Efficiency and plate height models

The number of theoretical plates (N), and its derived measure, the plate height ($H = L/N$) are the two most important parameters giving a numerical value to the quality of a chromatographic peak. The lower the plate height, the narrower, and hence the better, the peak is shaped. Experimental ways to determine H and N are described in Section 3. The most basic way to theoretically predict the plate height one can expect for a given column with particle size d_p is via the well-known van Deemter equation:

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \cdot u \quad (1a)$$

$$h = a + \frac{b}{v} + (c_s + c_m) \cdot v \quad (1b)$$

where u is the linear velocity of the mobile phase, A stands for the eddy dispersion (multiplicity of flow paths), B represents the diffusion of the analyte, C is the resistance to mass transfer in the stationary phase (C_s) or in the mobile phase (C_m). Eq. (1b) represents the dimensionless form of Eq. (1a) due to the use of reduced

plate heights (h) and reduced velocities (v), with $h = H/d_p$ and $v = u \cdot d_p/D_m$, where D_m is the molecular diffusion coefficient of the analyte. Typical values for the different terms in the reduced van Deemter equation are $a = A/d_p = 0.5–1.0$, $b = B/D_m = 0.5–1.5$ times $(1+k')$ and $c = C \cdot D_m/d_p^2 = 0.05–0.1$ for a packed bed column when considering reduced t_0 -based linear velocities. For columns packed with core shell particles these values tend to be a bit smaller: $a = 0.4–0.8$, $b = 0.3–1.2$ times $(1+k')$ and $c = 0.025–0.075$. In these expressions, k' stands for the retention factor of the analyte.

Eq. (1b) can also be written in a more explicit way, using an expression generally referred to as the general plate height model, which was first introduced by Lapidus and Amundson [32] and later used by many renowned scientists in their work [33–38]. Many different expressions of this model have been used throughout the years but they all can be expressed in an equation like the following one [39,40]:

$$h = h_A + \frac{2\gamma_{eff}(1+k'')}{v_i} + 2 \frac{k''^2}{(1+k'')^2} \frac{v_i}{\alpha} \frac{1}{Sh_m} \frac{\epsilon}{1-\epsilon} + 2 \frac{k''}{(1+k'')^2} \frac{v_i}{\alpha} \frac{1}{Sh_{part}} \frac{D_m}{D_{pz}} \quad (2a)$$

wherein v_i is the reduced interstitial velocity, h_A represents the band broadening contributions coming from the bed heterogeneity, γ_{eff} is the effective longitudinal diffusion and Sh_m and Sh_{part} , respectively, are dimensionless numbers which represent the mobile zone and particle zone mass transfer coefficients (also known as Sherwood numbers). In addition, α is a shape factor (which takes the value of 6 for the spherical particles in common packed bed columns), ϵ is the external porosity of the column, D_{pz} is the diffusion coefficient in the porous zone and k'' is the zone retention factor, which is the retention factor related to the interstitial volume. Because Eq. (2) is written in a dimensionless form, the effect of d_p on the band broadening is hidden in the value of h and the reduced velocity.

In a simplified form, giving each of the 4 terms a symbolic name, Eq. (2a) can also be rewritten in a form similar to Eq. (1b) as:

$$h = h_A + h_B + h_{Cm} + h_{Cs} \quad (2b)$$

Although they look very different, one looking quite simple and the other looking fairly complex, Eqs. (1) and (2) are very similar

as they are grouped in four different terms. The first one is the A-term (also known as eddy-dispersion) and represents the band broadening related to the irregularities in the stream path that molecules may take when traveling inside a chromatographic column. As both analytes and mobile phase might travel following different paths (around or inside the pores for example), this potentially causes slightly different retention times for each molecule [41]. The second term is the so-called B-term. This term accounts for the longitudinal diffusion of the analyte inside the chromatographic columns or, putting it in other words, the tendency of the analytes to expand in a longitudinal way [42]. Finally, the C-term accounts for the mass transfer kinetics, but it is split in two because it relates to the stationary and the mobile phase in a different way; this term describes the band broadening caused by the time it takes for an analyte to go from the mobile phase to the stationary phase and back [43].

Measuring the band broadening over a wide range of flow rates and quantifying the peak quality using the plate height value H (usually HPLC software gives the plate number N for each chromatographic peak), and plotting these values as a function of either the t_0 -or the interstitial time based linear velocity (respectively u_0 or u_i , see Eqs. T-5 and T-4 in Table 1), a plot commonly known as the van Deemter plot is obtained. In these plots, the B-term dominates the left-hand side of the graphic, since at lower flow rates the analytes have more time to disperse by molecular diffusion, while the C-term is observed at the right-hand side because at higher flow rates the mass transfer times of the analyte are quite significant in relation to its retention time. A minimum in this plate height vs. linear velocity curve is observed where the column performance is the highest [44,45]. The user should operate the column at the corresponding flow rate to get the maximal efficiency out of that given column.

An example of a van Deemter plot, using the reduced parameters h and ν , is shown in Fig. 1. The great advantage these reduced parameters offer is that they are dimensionless, which allows the comparison of the performance between columns packed with particles of different sizes [45].

1.2. Permeability

The other key factor that determines the kinetic performance of chromatographic columns is their permeability. Following Darcy's law, the well-known equation that describes the pressure-drop of a purely laminar flow of a fluid through a porous medium, the velocity through a packed medium is linearly proportional to the ratio of the pressure drop (ΔP), the viscosity of the mobile phase (η) and the column length (L). The proportionality constant is generally referred to as the column's permeability (K_v , expressed in m^2), which can be calculated as:

$$K_v = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta P} \quad (3)$$

The permeability of the column depends strongly on the particle diameter ($K_v \sim d_p^2$), it is therefore customary to calculate a dimensionless counterpart, the so-called flow resistance (ϕ , see Eq. (T-26)). This number describes the resistance the packed bed exerts to the forward motion of the flow.

The main factor determining the flow resistance of a chromatographic column is its porosity. When handling this parameter, one should be aware that several types of porosity exist. Total porosity (ϵ_T) can be split in two different contributions (cf. the two terms in Eq. (4)), and can be defined as the space inside of the column occupied by mobile phase. The first, and usually

also the largest term in Eq. (4) is the external porosity (ϵ), which is the fraction of the column volume that is not occupied by particles, i.e. the interstitial space between the particles in the packed bed [46]. Typically, the value of ϵ does not change very much and in most random sphere packings varies around a value of approximately 0.38. The second term relates to the void space inside the particles and is determined by the internal porosity (ϵ_{part}):

$$\epsilon_T = (F \cdot t_0) / V = \epsilon + (1 - \epsilon) \cdot \epsilon_{part} \quad (4)$$

where F stands for the mobile phase flow rate, t_0 is the hold-up time of the HPLC system and V represents the geometrical volume of the column.

Finally, it should be taken into account that several different velocities can be defined in a chromatographic column. All of them can be calculated using the equations in Section 2:

- The superficial velocity (u_s) refers to the velocity of the mobile phase through an empty column (T-3).
- The interstitial velocity (u_i) is considered to be the velocity of the solvent. It relates to the external porosity of the column (T-4).
- The chromatographic velocity (u_0) is also defined as the velocity of an unretained species. It relates to the total porosity of the column (T-5). It can also be determined by dividing the length of the column by the measured t_0 . However, this determination can be tricky since t_0 -markers are not always completely unretained [47]. Furthermore, factors like the mobile phase compressibility or the electronic delay might influence the measurement significantly (typically leading to a slight upward or downward drift when plotting $F \cdot t_0$ against F instead of the expected constant value).

Using each of the different types of velocity in Eq. (3), a different permeability value and a flow resistance value are obtained. This sometimes leads to some confusion about the proper theoretical expression that needs to be used for ϕ and K_v . Fortunately, the different flow resistance definitions can be calculated from one another in the same way as linear velocities (see Eqs. T-23 to T-25). According to their definition, it can be expected that ϕ_s and ϕ_i are independent of the intra-particle porosity, while ϕ_0 describes how the internal porosity of the stationary phase particles contributes to the observed flow resistance. A more direct way to calculate flow resistance using porosity values can be achieved by developing the Kozeny–Carman equation until the following expression is reached:

$$\phi_0 = 180 \frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^3} \cdot \epsilon_T \quad (5)$$

where the value of 180 stems from calculations regarding the specific surface of the particles and the Kozeny–Carman coefficient (which typically has a value close to 5). Other flow resistances may be calculated by correcting the obtained value with the corresponding type of porosity parameter or combining Eq. (T-26) with any of the permeability equations (Eqs. T-23 to T-25).

2. List of main performance and system parameters

Throughout history, chromatographic characterization has been performed by means of a great amount of different separation quality parameters. Some of them, the most common ones, are listed in Table 1 together with the system parameters upon which they depend.

Table 1
List of needed parameters for chromatographic column characterization.

Parameter	Meaning	Equation
System parameters		
L	Column length (m)	
ΔP	Pressure drop (N/m ²)	
F	Flow rate (mL/min)	
d_{col}	Column diameter (mm)	
S	Column section (mm ²)	$S = \pi/4 \cdot (d_{col})^2$ (T-1)
V	Volume of the empty column (μL)	$V = S \cdot L$ (T-2)
u_s	Superficial velocity	$u_s = F/S$ (T-3)
u_i	Interstitial velocity	$u_i = u_s/\epsilon$ (T-4)
u_0	Velocity of an unretained compound (mm/s)	$u_0 = u_s/\epsilon_T = L/t_0$ (T-5)
d_p	Particle diameter (μm)	
d_{core}	Core diameter (core-shell particles) (μm)	
η	Mobile phase viscosity (kg/s·m)	
Porosity parameters		
ϵ_T	Total porosity (I)	$\epsilon_T = (F \cdot t_0)/V = \epsilon + (1-\epsilon) \cdot \epsilon_{part}$ (T-6)
ϵ	External porosity (I)	Measured, see Section 5 ($\epsilon \approx 0.38$ is good first guess)
ϵ_{part}	Void fraction of particle (I)	$\epsilon_{part} = \frac{\epsilon_T - \epsilon}{(1 - \epsilon)}$ (T-7)
ϵ_{pz}	Void fraction of porous zone (I)	$\epsilon_{pz} = \frac{\epsilon_{part}}{(1 - \rho^3)}$ (T-8)
ρ	Ratio of core to particle diameter (I)	$\rho = d_{core}/d_p$ (T-9)
Performance parameters		
t_0	Hold-up time (retention time of t_0 -marker) (min)	$t_0 = L/u_0$ (Measured) (T-10)
t_i	Retention time in interstitial space (min)	$t_i = t_0 \cdot \epsilon_T/\epsilon$ (T-11)
t_R	Total retention time (min)	$t_R = t_0(1+k')$ (Measured) (T-12)
k'	Phase retention factor (I)	$k' = (t_R - t_0)/t_0$ (T-13)
k''	Zone retention factor (I)	$k'' = (t_R - t_i)/t_i$ (T-14)
$w_{1/2}$ or $w_{4\sigma}$	Peak width at 50% or 13% of height (min)	Measured
N	Plate number (I)	$N = 16t_R^2/W_{4\sigma}^2$ (T-15)
H	Plate height (mm)	$H = L/N$ (T-16)
$R_{s,ij}$	Resolution (I)	$R_{s,ij} = \frac{t_{R_i} - t_{R_j}}{0.5(w_{4\sigma_i} + w_{4\sigma_j})}$ (T-17)
σ_t	Peak variance (min ²)	$\sigma_t = t_R^2/N$ (T-18)
N_{eff}	Effective plate number (I)	$N_{eff} = N \left(\frac{k'}{1+k'} \right)^2$ (T-19)
Δt	Time window (min)	$\Delta t = t_R - t_0$ or (T-20) $\Delta t = t_{R,last} - t_{R,first}$ (T-21)
n_p	Peak capacity (I)	$n_p = 1 + \Delta t/w_{4\sigma}$ (T-22)
Permeability parameters		
K_{v0}	u_0 -based permeability (m ²)	$K_{v0} = (\eta \cdot L^2)/(\Delta P \cdot t_0)$ (T-23)
K_{vi}	Interstitial or u_i -based permeability (m ²)	$K_{vi} = K_{v0} \cdot (\epsilon/\epsilon_T)$ (T-24)
K_{vs}	u_s -based permeability (m ²)	$K_{vs} = K_{vi} \cdot \epsilon$ (T-25)
ϕ	Flow resistance (I)	$\phi = d_p^2/K_v$ (T-26)
E_0	Separation impedance (I)	$E_0 = H^2/K_{v0}$ (T-27)
Diffusion parameters		
H_B	B-term band-broadening (mm)	Measured (peak parking)
D_m	Molecular diffusion coefficient (mm ² /s)	
γ_{eff}	Effective longitudinal diffusion	$\gamma_{eff} = \frac{H_B \cdot u_0}{2D_m} \frac{1}{(1+k')}$ (T-28)
D_{eff}	Effective diffusion coefficient (mm ² /s)	$D_{eff} = \gamma_{eff} \cdot D_m$ (T-29)
β_1	Polarizability constant	$\beta_1 = \frac{1 - \gamma_{eff} \cdot \epsilon_T(1+k') - 1}{1 - \epsilon \cdot 2 + \gamma_{eff} \cdot \epsilon_T(1+k')}$ (T-30)
α_{part}	Relative particle permeability	$\alpha_{part} = \frac{1 + 2\beta_1}{1 - \beta_1}$ (T-31)

Please cite this article in press as: A. Andrés, et al., Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: A step-by-step tutorial, Analytica Chimica Acta (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.030>

Table 1 (continued)

Parameter	Meaning	Equation
D_{part}	Intra-particle diffusion coefficient (mm ² /s)	$D_{part} = \frac{\alpha_{part}(1-\epsilon)}{\epsilon_T(1+k')} D_m$ (T-32)
D_{pz}	Porous zone diffusion coefficient (mm ² /s)	$D_{pz} = \frac{2+\rho^3}{2} D_{part}$ (T-33)
Stationary phase mass transfer parameters		
H_{Cs}	C _s -term band broadening (mm)	$H_{Cs} = \frac{2}{\alpha} \frac{1}{Sh_{part}} \frac{k'}{(1+k')^2} u_i \frac{d_p^2}{D_{pz}}$ (T-34)
Sh_{part}	Particle mass transfer shape factor (Sherwood number) (l)	$Sh_{part} = \frac{4}{3} \frac{1-\rho^3}{\frac{2}{15} - \frac{2}{3}\rho^3 + \frac{8}{9}\rho^5 - \frac{2}{3}\rho^6}$ (T-35)
α	Shape factor (l)	$\alpha = 6$ (packed bed spheres) $\alpha = 4$ (cylinders)
Reduced parameters		
v_i	Reduced interstitial velocity (l)	$v_i = (u_i \cdot d_p)/D_m$ (T-36)
v_0	Reduced t_0 -based velocity (l)	$v_0 = (u_0 \cdot d_p)/D_m$ (T-37)
h	Reduced plate height (l)	$h = H/d_p$ (T-38)

3. Plate height and column permeability measurement

As stated before, the quality of the chromatographic columns is often assessed through an estimation of its efficiency. In this sense, chromatographic peaks must be narrow in order to achieve separations within the shortest possible period of time. The plate number (N) is a mathematical concept which directly correlates to the efficiency of a chromatographic peak and, consequently, to the quality of the column. Its definition goes back to a theoretical representation of a chromatographic column, where this is represented as a series of N well-mixed extraction or distillation stages. N is a number usually given by the HPLC software but it also can be calculated through the well-known formula:

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} \quad (\text{isocratic separation}) \quad (6)$$

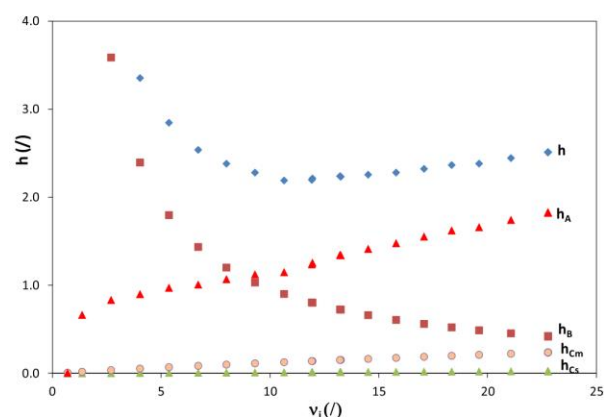


Fig. 1. Example of a van Deemter plot in dimensionless coordinates (h vs v_i) and breakdown into individual contributions (h_B , h_{Cm} , h_{Cs} , $h_A = h - h_B - h_{Cs} - h_{Cm}$) via the Excel template discussed in Section 9. Data obtained for butyrophenone on an ACE Excel column (4.6 mm fully porous particles) for a 49.3% acetonitrile mobile phase.

where t_R is the retention time of the analyte and σ_t^2 is the variance (in time units) of the peak. The peak variance is a parameter closely related to the width of the peak. Hence, formulas that allow the determination of N are usually expressed as a function of the retention time and the peak width w instead of the peak variance. However, since the peak width w is not constant over its height, different expressions relating N to w exist depending on the height at which w is being measured. Typically this is done either at half of the peak height (providing $w_{1/2}$), or at a height equal to 13% of the peak maximum (corresponding to a width of 4σ , providing $w_{4\sigma}$), as shown in Fig. 2.

These different widths also lead to different formulas for the number of plates, since the coefficients adjust mathematically to ideally Gaussian chromatographic peaks:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \frac{t_R^2}{w_{4\sigma}^2} \quad (7)$$

In a perfectly symmetric peak (with Gaussian distribution), all these formulas should give the same plate number but perfectly symmetric peaks are rarely found in HPLC due to the occurrence of

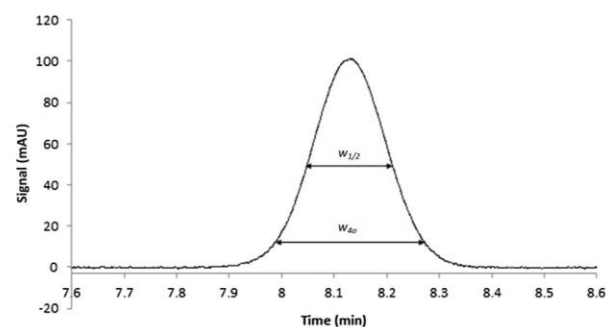


Fig. 2. Different peak widths of the same chromatographic peak depending on the height at which they are measured.

some additional band broadening phenomena such as the occurrence of preferential flow paths or the co-existence of two retention effects giving rise to tailing or fronting peaks. Therefore, width measurements made at different heights may lead to significantly different N values for the same chromatographic peak. In such cases, one should move to the determination of σ^2 via moment integration [48], a functionality provided in most instrument software. However, the accuracy of the integration is often compromised by small, inevitable disturbances at the baseline noise level.

Furthermore, the measured broadening does not only depend on the quality of the column but also depends on the quality of the HPLC instrument itself. Things such as long tubing or connections between the different modules of the instrument might significantly affect the dispersion of the analyte carried through the HPLC system and, consequently, might also affect how the peak is finally shaped in the chromatogram. Hence, although it is not the main cause of it, extra-column band broadening is a factor that has to be accounted for when studying the performance of a column in order to know the specific contribution of the column to the quality of the chromatographic peaks [49–54]. Extra-column band broadening is usually determined by performing chromatographic runs in the same conditions as the real measurements (flow rate, mobile phase composition, temperature, etc.) but by leaving out the column, directly joining the column inlet tubing to the outlet tubing using a union piece. Injection of any compound in these conditions gives a retention time and a peak that can be analyzed by the software, so that the contribution of the HPLC system band broadening and residence time can be subtracted from the initial peak quality parameter values, as in Eq. (8):

$$N_{cor} = \frac{(t_R - t_{syst})^2}{(\sigma_t^2 - \sigma_{t,syst}^2)} \quad (8)$$

where N_{cor} stands for the corrected plate number of the chromatographic peak while the subscript 'syst' refers to the retention time and variance of the HPLC system.

In a similar way, a correction must also be made for the pressure drop of the system, since modules like the injector give a significant pressure loss to the entire system. Thus, the pressure drop read-out of a chromatographic run has to be corrected by subtracting the system pressure drop measured at the same flow rate (i.e., by leaving out the column). The difference then corresponds to the pressure drop caused by the column (ΔP_{col}) only. This is also the value that should be used in the column permeability calculations.

However, the estimation of column performance using the number of plates can only be done in a straightforward way for isocratic separations. In gradient mode, retention time and peak variance cannot be correlated since the retention time is a result of the variable mobile phase composition experienced during the gradient run while the width of the obtained peak depends on the exact fraction of modifier felt by the peak at the moment of its elution. To circumvent this problem, the quality of gradient separations is usually assessed by means of the peak capacity parameter (n_p). The peak capacity of a chromatographic peak is often described as the number of peaks with that exact shape and size that can be fitted into a chromatographic window that can be related either to other peaks (especially the t_0 -marker or the first eluting peak and the last eluting peak) or to the total gradient time [55]. Although some more simplified expressions exist, n_p can generally be calculated using:

$$n_p = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{t_{R,i+1} - t_{R,i}}{4 \cdot \sigma_{t,i+1}} \quad (9)$$

wherein i refers to the order of the peak in the chromatogram.

It is also possible to calculate N for gradient elution, but this requires a second measurement: the same analyte should be eluted in isocratic mode at the same exact concentration of organic modifier as the one experienced at the moment at which the peak elutes off the column. The retention factor measured during this experiment (k'_{elut}) should then be used to replace t_R in Eqs. (6)–(8) by $t_0 \cdot (1 + k'_{elut})$. This supplementary experiment, however, requires more effort and could constitute a potential source of additional measurement errors, so it is not recommended if one is mostly interested in the intrinsic quality of a column.

4. Methods to measure B-term and D_{eff}

The most straightforward way to analyze the packing quality in a detailed way is by subtracting, in a stepwise way, the estimated contributions of the most important individual band broadening sources from the total plate height value (see also Section 9). The first step in this approach is the estimation of the B-term contribution, as this is the one that can be determined with the highest accuracy, and subtracting it from the total. As stated before, the B-term of a van Deemter curve is the band broadening term that accounts for the longitudinal diffusion of analytes during their chromatographic elution.

In order to measure this contribution of the longitudinal diffusion to the plate height (H_B), two main approaches can be followed: the peak parking method or the measurement of the plate height at a very low flow rate.

4.1. Peak parking

The peak parking method (also known as arrested elution method [56]) is the most common way to estimate the contribution of the B-term to band broadening. This method was invented by Knox and Giddings [44] on their famous 1962 taxi ride and, basically, consists in stopping the flow rate during the elution of an analyte for a known period of time. When arrested inside the chromatographic column, far from either the beginning or the end of the column, the analyte can do nothing but suffer the effects of diffusion so the longer it stays inside the column, the wider the subsequent chromatographic peak will be (see Fig. 3). Therefore, if the flow rate is stopped for different given times (t_{park}) and then the flow rate is restored, the additional peak variance due to longitudinal diffusion can be measured at the detector and, thus, the B-term band broadening can be determined.

According to theory, the peak spatial variance ($\Delta\sigma_x^2$) can be expected to vary linearly with the parking time through the following expression:

$$\Delta\sigma_x^2 = 2 \cdot D_{eff} \cdot t_{park} \quad (10)$$

The proportionality factor D_{eff} appearing in Eq. (10) is a measure of the effective longitudinal diffusion experienced by the analytes in a packed bed [57]. However, $\Delta\sigma_x^2$ cannot be measured directly, so several steps have to be followed when performing the peak parking experiment. When the measurements for different parking times are performed, the peak time-based variance has to be calculated using the following equation:

$$\sigma_t^2 = \frac{t_{tot}^2}{N} \quad (11)$$

where σ_t^2 is the peak variance, t_{tot} is the total retention time of the peak (elution time + parking time) and N is the apparent plate number, as given by instrument software. In the next step, the

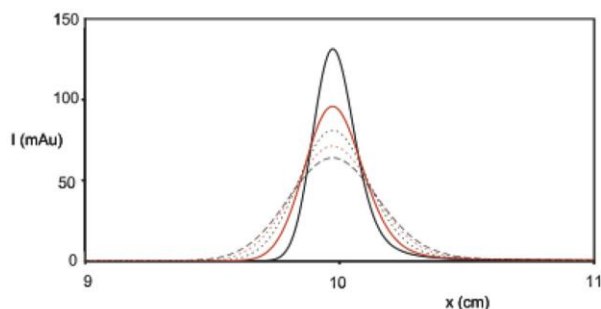


Fig. 3. Representation of the obtained peak shape for the peak parking experiment on an Acquity column for a 50/50 water/methanol mobile phase composition. The figure represents the signal intensity I as a function of the position in the column (recalculated from time plots). The peaks with parking time 0 s (full black line), 900 s (full red line), 1800 s (dotted black line), 2700 s (dotted red line) and 3600 s (dashed black line) are overlaid. Extracted with permission from Ref. [57]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

temporal peak variance is transformed into spatial peak variance using:

$$\sigma_x^2 = \sigma_t^2 \cdot u_R^2 \quad (12)$$

where u_R is the linear velocity of the retained compound, to be calculated as $u_R = L/t_R$, wherein t_R is the retention time of the compound (corrected for extra-column residence time) when the parking time is zero. By subtracting the obtained value for σ_x^2 without stopping the flow from that with a certain parking time, the value for $\Delta\sigma_x^2$ is obtained.

It has to be acknowledged that stopping and starting the flow rate in a sudden manner may cause additional band broadening that has not been accounted for when calculating $\Delta\sigma_x^2$, as there might be a difference between the variance measured for a given stop time and that without stopping. To resolve that issue, a reference measurement can be made with a very short parking time, e.g. 30 s, taking into account the finite rate of flow rate changes in the chromatographic system. All subsequent measurements then have the parking time t_{park} (e.g. 15, 30, 45, 60, 90 min) added to the short stop time. Doing so, a straight line can be

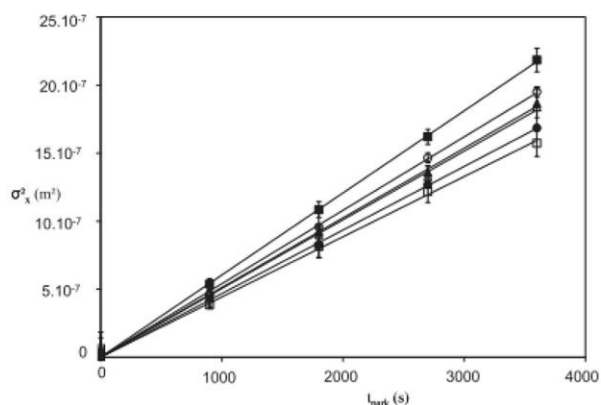


Fig. 4. Overview of the peak spatial variance σ_x^2 as a function of the parking time (t_{park}) for six different particle types: Acquity (full squares), Zorbax (full triangles), Eclipse (full circles), Halo (open squares), Kinetex (open triangles) and Poroshell (open circles). Extracted with permission from Ref. [57].

obtained when plotting the corrected spatial peak variance against the parking time (as illustrated in Fig. 4) and D_{eff} can be calculated from the slope using Eq. (10).

After the determination of D_{eff} , the actual contribution to band broadening of the B-term can be obtained by means of the following expression:

$$H_B = \frac{2 \cdot D_{eff}}{u_0} (1 + k') = \frac{2 \cdot D_{eff}}{u_i} (1 + k'') \quad (13)$$

In this equation, u_0 is the linear velocity of the mobile phase and k' is the retention factor of the analyte, both of them being well-known values. As indicated in Eq. (13), the B-term contribution to band broadening can also be related to the interstitial velocity (u_i) and the zone retention factor (k''), both parameters relate to the interstitial volume of the column (the volume not occupied by the stationary phase particles).

If a more thorough characterization is desired, it has to be noted that D_{eff} can be split into a contribution coming from the diffusion in the liquid outside the particles D_m , which is independent of the retention factor, and the diffusion coefficient in the meso-porous space of the particles (D_{part} for fully porous columns, D_{pz} for core-shell columns). The first contribution, D_m , is constant for every solute-solvent combination and is usually calculated through the Wilke-Chang equation [58]:

$$D_m = \frac{7.4 \cdot 10^{-8} T \sqrt{\Phi_{sv} M_{sv}}}{\eta_{sv} \cdot V_A^{0.6}} \quad (14)$$

where T is the absolute temperature, Φ_{sv} and M_{sv} are the association coefficient (2.6 for water; 1.9 for methanol; 1.5 for ethanol and the molecular weight of the solvent respectively), η_{sv} is the viscosity of the solvent and V_A is the molar volume of the analyte at normal boiling point [58].

It has to be noted that D_m calculations for other solvents e.g. tetrahydrofuran are not possible through the Wilke-Chang equation because of the lack of known association constants in those solvents. In order to obtain reliable D_m values in those conditions, other expressions like the Scheibel equation or the Hayduk-Laudie equation have to be used [59,60]. This is also the case for acetonitrile, although some researchers have reported a value of $\Phi_{ACN} = 1.37$ [61].

On the other hand, the diffusion in the porous zone depends on the retention factor and can be calculated through several equations from the table in Section 2 (T-28 to T-33). In fact, the calculation of D_{pz} is necessary in the estimation of the C-term contribution to band broadening (explained in Section 6).

4.2. Measurement of plate height at a very small flow rate

The other main technique to estimate the contribution of the diffusion to band broadening is determining the plate height of chromatographic peaks at an extremely low flow rate. Considering that the more time an analyte remains inside the column, the more it suffers the effect of the diffusion (something that can be observed in van Deemter curves since the vertical asymptote on the y-axis is a consequence of the B-term), injecting analytes at low flow rates can give an idea of the diffusion inside the column. Provided the pump can produce a small enough flow rate, measurements performed at different (small enough) values of F should lead to a plate height decreasing inversely proportional with u , i.e., obeying Eq. (13). When k' is known, the value of D_{eff} can then be directly be derived from the value of the proportionality constant observed between H and $1/u$ (cf. Eq. (13)).

5. Methods to measure the porosity

As explained in Section 1, the total porosity of an HPLC column can be split into two different contributions (cf. Eq. (4)). The external porosity ϵ refers to the fraction of the column volume not occupied by the particles, a parameter that mainly gives information about the density of the packed bed or, in other words, how well filled the column is with the stationary phase. The second contribution stems from the void space inside the particles, generally referred to as ϵ_{part} and gives information about the internal design of the particle itself, i.e., how much pore volume there is in a particle. When talking about the internal porosity, particle type always has to be taken into account because of the existence of fully porous and core-shell particles, since the value of ϵ_{part} is influenced by the presence of the core. Introducing ρ as the ratio between the diameter of the particle and the diameter of its solid core, this relation can be written as $\epsilon_{part} = \epsilon_{pz} \cdot (1 - \rho^3)$, wherein ϵ_{pz} is the porosity of the porous zone surrounding the core.

An accurate determination of the external porosity of chromatographic columns is one of the most important steps when characterizing the kinetic performance of a column since, according to Eq. (5), the flow resistance of a column depends in a strong way on the external porosity (the dependency can be as high as ϵ^{-5}). Very small differences in the porosity measurement can hence lead to significant differences in flow resistance, which makes the precise knowledge of the effective ϵ essential to understand the performance of a column [46]. Due to its great importance, several methods have been developed throughout the years to determine the value of ϵ in the most exact possible manner. These methods (listed below) are all based on measuring the residence time (t_i) of a component that is excluded from the particle's interior:

$$\epsilon = (F \cdot t_i) / V \quad (15)$$

where F is the mobile phase flow rate and V is the geometrical volume of the column. Comparing this external porosity value ϵ with the value obtained for the total porosity ϵ_T via Eq. (T-6) and using an unretained t_0 -marker such as uracil that can fully penetrate the particles to measure t_0 , the values of ϵ_{part} and ϵ_{pz} can subsequently be calculated using Eqs. (T-7) and (T-8).

5.1. Measuring ϵ via inverse size-exclusion chromatography

Inverse size-exclusion chromatography (ISEC) is one of the most used methods of determination of the external porosity of a column. First described by Halász and Martin [62], and later developed by Halász and collaborators [63–66], the ISEC method consists in injecting several known polymeric samples into a packed column. If it is assumed that all pores in the stationary phase have a certain volume that can be correlated to their size, the elution time of the polymers will depend on whether they can enter the different sized pores. If the injected polymer strand is large enough, it will not fit inside the stationary phase particle and, therefore, will elute faster from the column because it will only visit the interstitial space of the column. Hence, their elution time is a direct measure for the external porosity of the column. Representing the polymer size against the retention time leads to what is commonly known as an ISEC plot; some examples for ISEC plots can be found in the following references [46,67].

ISEC plots are usually divided in two parts (a steep part regarding the interstitial volume and a flatter line regarding the intra-particle volume), so the external porosity is normally determined by finding the intersection between these two lines [68–70]. However, this process is quite tricky because, since regressions usually have to be performed on a small amount of data points and

thus, depending on the number of experimental points that are used to find both parts of the plot the intersection point may vary significantly. Therefore, the regression analysis subsequent to the measurements needed to obtain the external porosity value is often troublesome and that can end up giving values with a lower accuracy than desired [46]. Obviously, the use of a large number of polymeric samples increases significantly the chances of obtaining a close approximation to the pore-size distribution. In this sense, the validity of the external porosity measurement using the ISEC method depends on the already mentioned number of experimental points but also on the assumption that the polymer samples used, although having different molecular masses, have the same structure, normally a polystyrene structure (also known as polystyrene strands).

The ISEC method presents some advantages over alternative methods. Experiments can be carried out on the column itself (and both the packed bed and the sample conserve their integrity) and no additional equipment other than the HPLC system is necessary, characteristics that make the procedure convenient and relatively inexpensive [71]. However, on the other hand, the ISEC method also presents some significant drawbacks. Experimentally, there has to be no adsorption from the polymers onto the stationary phase and, additionally, the polymer cannot agglomerate in the solvent used as the mobile phase (the established polystyrene strands avoid these two problems). The columns should also have a good efficiency since peak symmetry and instantaneous equilibrium between the two phases is necessary for the entire procedure [68]. In addition, these larger molecules may be affected by wall effects and may not be able to penetrate each corner of the interstitial volume, which would lead to an underestimation of the porosity [46,72].

5.2. Measuring ϵ via Donnan exclusion

Another method to determine the porosity is based on the Donnan salt exclusion effect, which states that when a non-buffered solution contains two or more ionic species one of the solutes is blocked from regions penetrable by the others [73]. Hence, according to the Donnan effect, ionic solutes cannot penetrate into the pore space inside the stationary phase when a small amount of electrolyte (sodium nitrate, for example) is injected into the column [74]. The elution time of the peak of the electrolyte will correspond to the interstitial void fraction of the column. Injecting a low amount of electrolyte is important because if its concentration is high enough the Donnan effect will not take place and the electrolyte will experience retention, which would make the method not suitable to determine the external porosity. In a similar way, if the mobile phase is buffered the Donnan effect will also get masked and the method will not be suited for porosity determination.

The Donnan exclusion presents some advantages over the ISEC methods, like a better overall precision (not based on slopes in graphics) and the use of more conventional mobile phase organic modifier (tetrahydrofuran is usually used in ISEC while acetonitrile or methanol can be used in Donnan exclusion) [75]. However, it also presents some disadvantages such as having to rely on very small chromatographic peaks because of the very low electrolyte concentration, or due to the fact that the pores of the stationary phase particles can be so large that a complete electrostatic repulsion is difficult to achieve [76,77].

5.3. Measuring ϵ via total pore blocking

Since its introduction in 2007 [46] as an alternative to the customarily employed ISEC method, the total pore blocking (TPB) has been one of the most used methods to determine the external

porosity of a chromatographic column [67,78–80]. The main characteristic of the TPB method is that it involves measuring the elution time of a non-retained small molecular weight marker (rather than the large molecules in ISEC) after having filled the stationary phase pores with a hydrophobic solvent that is completely immiscible with the mobile phase employed during the elution time. After several studies regarding that matter, it has been concluded that decane or dodecane are the most suited liquids to block the pores of silanized reversed-phase particles. The filling of the pores is a 3-step procedure that can be followed in Fig. 5.

In the first step, the column is rinsed with isopropanol in order to clean it from other residual solvents that might have remained inside and that might have a negative effect in the blocking procedure. The second step consists in filling the column with the hydrophobic solvent (decane); this step should be carried out with some caution since these kind of solvents tend to get stuck inside the HPLC system (connections and modules), which would be dangerous for the instrument itself. Finally, in the third step the interstitial decane is flushed out of the column using an aqueous buffer; the decane inside the particles would not be flushed out because of its poor miscibility with the aqueous buffer and its strong interaction with the stationary phase. All steps in the procedure have to be followed correctly, since unfinished fillings and solvent removals in the column might lead to significant inaccuracies in the external porosity determination.

Therefore, after the procedure, the originally porous support behaves as a completely non-porous support, impenetrable for any analyte. In these conditions, the elution time measurement of a small molecular weight tracer will allow the determination of the exact interstitial volume of the column following Eq. (15).

The great advantage of this method is the use of small molecular weight markers instead of the large polymers used in ISEC. These very small molecules now can be trustfully used to measure the void volume of the column because even the smallest corner of it can be accessed by the tracer. On the other hand, some relevant details have to be taken into account. One of them would be choosing a suitable tracer, which is one of the most important issues in this procedure. The tracer has to be polar in order to ensure that the measured retention times only relate to the extra-particle volume (there can be some retention in the particle surface, which has to be avoided) and it also has to be inorganic, since some organic tracers like uracil might get dissolved in the hydrophobic blocking agent which would make the porosity determination impossible. Potassium iodide has been shown to be the one that works best, although some stability issues have to be taken into account. The slow oxidation of the potassium iodide into elemental iodine due to the effect of carbon dioxide and oxygen, which turns the sample solution yellow, leads to poorly shaped and sometimes even split peaks. It is therefore required to frequently replace the sample by a new one to ensure reliable results. Other possible drawbacks of the TPB method would be decane leaking out of the pores, which should not happen at reasonable flow rates (under

0.5 mL/min for a 4.6 mm column), and the possible inaccuracy on the measured elution times stemming from slight flow rate or time registration errors, issues that however also affect the other methods described above.

6. Methods to estimate diffusion and mass transfer

6.1. Band broadening contribution from the stationary phase mass transfer

It goes without saying that the diffusion inside the particles is one of the key processes determining the band broadening in a chromatographic column. Its effect appears in the B-term (via the contribution of the diffusion inside the particles, quantified by D_{part} , to the over-all D_{eff} -value) as well as in the C_s -term, via the value for D_{pz} , which stands for the diffusion in the shell-layer of core-shell particles or in the entire particle when particles are fully porous, in which case $D_{part} = D_{pz}$. As shown in literature [81,82], and later followed by others [83] there is an elegant way to determine D_{part} and D_{pz} using the Effective Medium Theory (EMT). These expressions are much more accurate than the parallel-zone or residence-time weighted model (RTW) that has been traditionally used in liquid chromatography. The EMT is fully accepted in many fields of science and technology as a powerful approach to, for example, calculate effective optical transmission coefficients, elastic moduli, and heat transfer and diffusion coefficients of binary media [84,85]. To apply the EMT to the problem of diffusion in chromatography, the column needs to be represented as a binary medium consisting of two zones, the interstitial space and the particle space, the volume of which can be determined by performing a porosity study as discussed in Section 5.

The first step in achieving a deeper understanding of the relationship between particle morphology and the observed effective diffusion values (D_{eff}) should be the elimination of the contribution of the diffusion experienced by analytes when residing outside the particles, which essentially means separating D_{part} from the interstitial void diffusion (diffusion that basically depends on D_m , which has a particular value for each compound in a given mobile phase and temperature). The Maxwell approach to the EMT theory [86] is a model that allows this separation. Using the obtained B-term contribution data and the column porosity measurements, the polarizability β_1 constant can be found through the following equation [57,82]:

$$\beta_1 = \frac{1 - \gamma_{eff} \cdot \epsilon_T (1 + k') - 1}{1 - \epsilon_T + \gamma_{eff} \cdot \epsilon_T (1 + k')} \quad (16)$$

with γ_{eff} being D_{eff}/D_m . If desired, Eq. (53a) from Ref. [82] can be used to provide a higher order accuracy expression for β_1 .

For spherical particles, the polarizability constant can be related to the relative permeability of spherical particles (which is the case of packed beds) through the parameter α_{part} as follows:

$$\alpha_{part} = \frac{1 + 2\beta_1}{1 - \beta_1} \quad (17)$$

If then the Maxwell EMT model is followed, the diffusion inside the particle D_{part} can be obtained by means of the expression:

$$D_{part} = \frac{\alpha_{part}(1 - \epsilon)}{\epsilon_T(1 + k') - \epsilon} D_m \quad (18)$$

However, the development of different types of stationary phase particles (fully porous and core-shell) makes it necessary to take the analysis one step further. The EMT approach also allows the isolation of the effect of the solid core of porous-shell particles in a

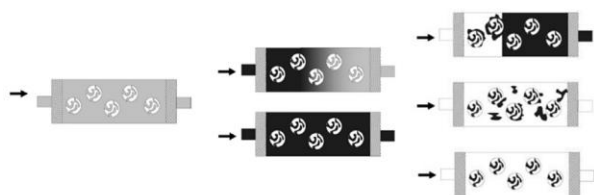


Fig. 5. Schematic representation of the three-step procedure for the total pore blocking method. Adapted with permission from Ref. [46].

mathematically exact way, since the expressions can be used for homogeneous particles and for inhomogeneous particles which contain a solid core in their center [82,87]. This finally allows the calculation of D_{pz} through:

$$D_{pz} = \frac{2 + \rho^3}{2} D_{part} \quad (19)$$

where D_{pz} is the actual diffusion coefficient in the meso-porous zone of the particles and ρ is the relationship between the core and the particle diameters. Note that D_{pz} is also the parameter that needs to be used in the expression for the stationary zone mass transfer rate (cf. Eq. (2a) and Eq. (20) below).

Obtaining the value of D_{pz} not only allows a more accurate determination of diffusion inside the stationary phase but it also provides a valid approach to estimate the contribution of the stationary phase mass transfer to the van Deemter equation and, therefore, to band broadening. The expression that relates the molecular diffusion coefficient in the porous zone to the band broadening contribution of the stationary phase mass transfer is the following:

$$H_C = \frac{2}{\alpha} \frac{1}{Sh_{part}} \frac{k''}{(1 + k'')^2} u_i \frac{d_p^2}{D_{pz}} \quad (20)$$

As explained before (cf. Eq. (2a)), α is a coefficient that takes the value of 6 for spherical particles, k'' is the zone retention factor, u_i is the interstitial velocity of the mobile phase and d_p is the particle size. Besides, Sh_{part} stands for the Sherwood number of the stationary phase particles and can be calculated through:

$$Sh_{part} = \frac{4}{3} \frac{1 - \rho^3}{\frac{2}{15} - \frac{2}{3}\rho^3 + \frac{6}{5}\rho^5 - \frac{2}{3}\rho^6} \quad (21)$$

where ρ is the already mentioned relationship between the core and the particle diameters [88]. In the specific case of a fully porous particle, the Sherwood particle number takes a value of 10. Eq. (20) is still valid if the studied stationary phase is a monolith, although several coefficients (like α or Sh_{part}) have a different value [40].

6.2. Band broadening contribution from the mobile phase mass transfer

Possibly, the mobile phase mass transfer can be estimated as well. This is typically done using the expression appearing in the third term of Eq. (2) [40]. However, some caution in this sense is required because this expression has been established under the assumption that the flow in the interstitial space has a pure plug flow profile, which makes the approximation far from correct given the parabolic nature of the true profile [89]. Besides, the value for the Sherwood number in the mobile phase (needed for the approximation to mobile phase mass transfer) is not very well known, since the correlation mostly used (Wilson and Geankoplis-correlation) has been established for very high reduced velocities, velocities that typically lie outside the range used in HPLC. More detailed information about the approach to the determination of the contribution of mobile phase mass transfer to band broadening can be found in the literature [40].

7. Particle size measurement and definition of average

Interpreting measured values of H and K_v can only be properly done in relation to the size of the particles used in the bed. Although it seems pretty straightforward to determine this size, it is not due to the inaccuracies related to each of the available size

measurement methods (see further on), as well as due to the difficulty in defining the average size when the particles have a significant size distribution. The particle size distribution (PSD) of a chromatographic column is a concept that evaluates the sizes of the different individual particles in the stationary phase and how they correlate to the average particle size. There are currently no good theories that allow to decide whether the relevant particle average that should be used to calculate the different terms in Eqs. (1) and (2) should be number-based or volume-based [90].

For the column permeability, fortunately, we can rely on the Kozeny–Carman theory. This states one should use the Sauter-mean diameter, which is the diameter that an equal amount of monodisperse particles should have in order to yield the same total specific surface area as the particle mixture [91,92]:

$$d_{p,SA} = \frac{\sum_{i=1}^n d_{p_i}^3}{\sum_{i=1}^n d_{p_i}^2} \quad (22)$$

As a consequence, the Sauter-mean diameter is the correct diameter one should use in the Kozeny–Carman equation, and not the diameter based on the number- or volume-based average:

$$K_{vis} = \frac{d_{p,SA}^2}{f_{KC}} \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2} \quad (23)$$

where the f_{KC} -factor should have an approximate value of 180. However, some studies have doubted the consistency of this value, since it can decrease fairly quickly in the hypothetical case that the smallest stationary phase particles in the position themselves into the pores from larger ones [91]. Besides, this value can also be lower than expected if the nature of the surface causes a deviation from the generally accepted “no-slip” condition for the velocity of the mobile phase near the particle surface [75]. In this sense, the literature offers some recent work about the “slip flow” topic that should be taken into consideration [93,94].

The actual measurement of the particle sizes is also difficult. Several techniques allow the evaluation of the particle size distribution of a chromatographic column. The electrical sensing zone (ESZ) method is based on a suspension of stationary phase particles passing through an aperture placed between two electrodes; the change in the impedance when solid particles pass by are converted to voltage pulses, the number of pulses gives the number of particles while the amplitude of the pulses is related to the size of the particles [95]. The static light scattering (SLS) postulates that each particle size has a unique scattering pattern in the intensity versus angle plot, so scattering a group of particles results in the sum of the individual effect from each particle [96]. The flow/hyperlayer field-flow fractionation (FFF) is a complex method that consists in taking advantage of the different velocities of particles when exposed to a combination of a crossflow force and a lift force [95,97,98]. However, the most used method to assess PSD is opening the column and performing scanning electron microscopy (SEM) measurements, a simple but effective method in which pictures are taken from the stationary phase after emptying the column and sizes for single particles are obtained by a combination of drawing lines that represent the diameter of the particles and analyzing their length with a specific software [92,99–102]. Although being a more tedious and work-demanding procedure, the SEM is preferred to other PSD determination techniques, mainly because its accuracy is higher than for example Coulter counting, a faster procedure but one that usually leads to an underestimation of the particle size [103]. Besides, in SEM measurements the user chooses which particles are more representative and how their diameter should be interpreted, an especially

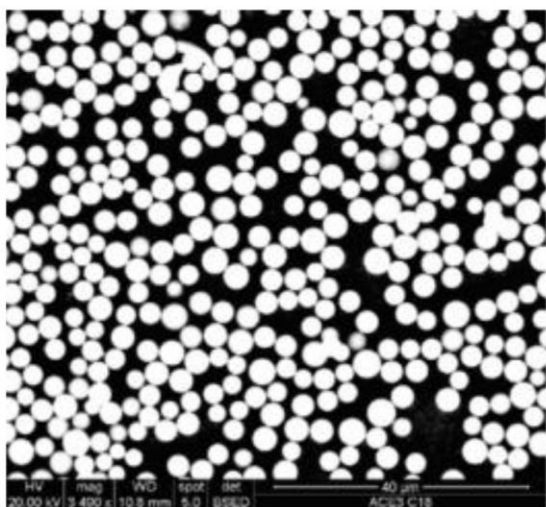


Fig. 6. SEM picture obtained for an ACE 3 packing. The microscope was operated at 20 kV with a magnification of 3500 \times and a backscattered electrons detector (BSED) to obtain enhanced contrast conditions. Extracted with permission from Ref. [102].

important factor taking into account that particles are not always perfectly spherical. Fig. 6 shows a SEM picture example, where all the white spheres are stationary phase particles.

8. Plate height and kinetic plots

The separation efficiency of chromatographic columns is usually represented by van Deemter curves, that is, as plots of the plate height against the linear velocity. While this kind of plots provides a clear and direct view of the effect of flow rate on performance, they do not provide information on the required analysis time or the optimal column length to achieve the desired separation efficiency. Since a short analysis times is, along with peak quality enhancement, one of the most sought after parameters in HPLC, efficiency optimization should preferably go hand in hand with an optimization of this analysis time [41,104]. Kinetic plots, a format used for the first time by Giddings [41], and made accessible to the experimentalist by the equations proposed in Refs. [105,106], directly represent the required time to obtain a certain plate number (or any other performance measure) and hence are the ideal tool for this optimization [105]. Fig. 7 compares both types of plots for columns of different lengths and packed with different particle sizes: on top a traditional van Deemter curve is shown, while on the bottom the same data set is represented in a kinetic plot.

Both plots provide information about column performance. The van Deemter curves show that plate height decreases and that optimum velocity or flow rate increases as the particle size decreases. However, while the van Deemter curves give information about the flow rate that can be used to obtain the optimal efficiency, it does not provide any information about the column backpressure or the required analysis time. In a kinetic plot, the achievable plate number can directly be read out with its corresponding analysis time expressed either as column void time (t_0) or retention time ($t_R = t_0 \cdot (1+k')$). In the example given in Fig. 7b, columns are represented for different particles sizes with their typically employed column lengths. The inflexion point of these curves (corresponding to the maximum plate count) corresponds to the optimal flow rate points in the van Deemter curves.

The relationship between the parameters in both plots is given

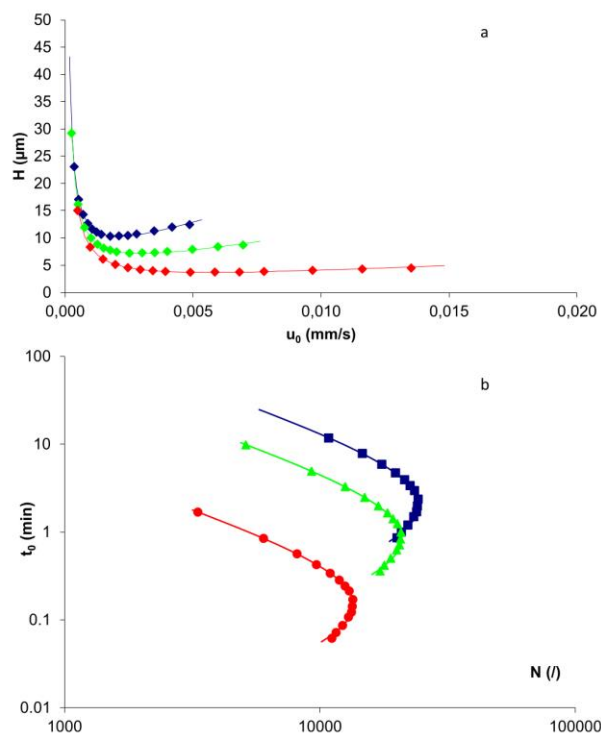


Fig. 7. Different graphical representation of the same data: a) Van Deemter curve; b) Kinetic plot. In both plots, the blue data corresponds to a 25 cm column with a 5 μm particle size, the green data corresponds to a 15 cm column with a 3.5 μm particle size and the red data corresponds to a 5 cm column with a 1.8 μm particle size; all of them are fully porous stationary phases. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by Ref. [105]:

$$N = \frac{\Delta P}{\eta} \left(\frac{K_{r0}}{u_0 H} \right) \quad (24)$$

$$t_0 = \frac{\Delta P}{\eta} \left(\frac{K_{r0}}{u_0^2} \right) \quad (25)$$

which are obtained by substituting L using Eq. (3) in the basic equations $N = L/H$ and $t_0 = L/u_0$. The plots in Fig. 7b are however dependent on the column length which is investigated and are referred to as fixed-length kinetic plots. In addition, there is also no information included on the required backpressure to operate these columns. To overcome this problem, the data represented in Fig. 7 can also be transformed into a variable-length kinetic plot, also known as KPL-plot (kinetic performance limit). In this plot, the column length corresponding to each flow rate data point is scaled such that the backpressure generated by that combination of length and flow rate corresponds to a given maximum set pressure. Under these conditions it was shown [107] that the kinetic optimum of a given support or operating condition is achieved, as a desired efficiency is reached in the shortest possible time or, equivalently, as a maximal efficiency is reached during an allotted analysis time. These KPL-plots can be constructed independently of the column length at which the data was acquired and are shown in Fig. 8 using the same data from Fig. 7, illustrating how each particle size has an optimal window of analysis times and efficiencies in which it

should be used.

To construct these plots, the experimental pressure drops in Eqs. (24) and (25) are replaced with the maximum pressure drop (selected by the user as the maximally affordable instrument or column pressure). Alternatively, these KPL retention times and plate numbers can be obtained by multiplying their experimental equivalents with a length elongation factor (λ factor), which is the relationship between the maximal pressure and the experimental one, using [106]:

$$\lambda = \frac{\Delta P_{\max}}{\Delta P_{\text{col}}} \quad (26)$$

$$t_{0,KPL} = \lambda \cdot t_{0,\text{exp}} \text{ (or } t_{R,KPL} = \lambda \cdot t_{R,\text{exp}}) \quad (27)$$

$$N_{KPL} = \lambda \cdot N_{\text{exp}} \quad (28)$$

It has to be taken into account that measurements with the same column at different flow rates will give different pressures drop values, so every measurement will have a different λ value that will have to be calculated individually. The advantage of the elongation factor is that it can also easily be applied to (gradient) peak capacity (n_p) data, taking into account the square root dependency of n_p with N :

$$n_{p,KPL} = 1 + \sqrt{\lambda} \cdot (n_{p,\text{exp}} - 1) \quad (29)$$

In order to correctly measure a fixed length kinetic plot and construct a variable-length plot under gradient conditions, the analytes must be subjected to the same mobile phase history [55,90,106,108–110]. The mobile phase history denotes the series of organic fraction values in the mobile phase experienced by the solutes at each given column position and is achieved by keeping the same ratio between both the gradient time and t_0 and between the delay time (the time elapsing between the injection and the moment when the gradient profile reaches the front of the column) and t_0 .

Whereas Figs. 7 and 8 illustrate how the kinetic plot is more suited than a van Deemter curve to find the optimal combination of column length, flow rate and particle size, this combination of permeability and performance data however no longer allows to determine which contributions to band broadening (e.g.

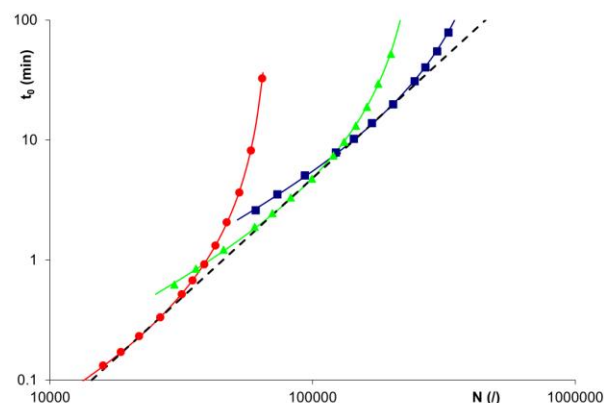


Fig. 8. Kinetic performance limit plot (KPL-plot) using the same data set from Fig. 7. The blue data corresponds to a 25 cm column with a 5 μm particle size, the green data corresponds to a 15 cm column with a 3.5 μm particle size and the red data corresponds to a 5 cm column with a 1.8 μm particle size; all of them being fully porous stationary phases. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

longitudinal diffusion, mass-transfer limitations or eddy dispersion) are most dominant for a given type of column. Therefore, the van Deemter curves remain an invaluable tool to investigate to what extent these different factors contribute to the overall plate height and allow a comparison between different columns.

9. Detailed performance analysis – excel template

Ultimately, one wants to know why a given column is providing certain efficiency, i.e., one would like to know which terms in the plate height equation could still be further reduced. To do this analysis step-by-step using the equations presented in the previous sections, an Excel template has been made available at [111]. In this template (Fig. 9), only the data for the yellow cells need to be provided (orange cells can be used as alternative input).

The first step in decomposing the observed column efficiency into its individual contributions is by isolating the longitudinal diffusion contribution (B-term). Under the widespread assumption that all contributions are additive (cf. Eqs. (1) and (2)), this corresponds to subtracting h_B from the total h -value. Starting from Eq. (1), it is clear that the value of h_B can be found in two main ways. One way to calculate $h_B (=H_B/d_p)$ is by estimating the value of H_B by data fitting Eq. (1) to a van Deemter plot containing a sufficient number of data points in the low F -range and then calculate $H_B=B/u_0$. Ultimately, one could also try to measure H at only one velocity (or just a few), but corresponding to such a low flow rate (typically 10 times lower than the optimal flow rate or less) that one can assume that the entire measured plate height is due to the B-term band broadening such that $H_B \cong H$. This approach is followed in sheet “Deff via experiments at low F ”. Another way to determine H_B is via Eq. (13) and the peak parking experiments described in Section 4. This approach is followed in sheet “Deff via peak parking”.

Using either of both sheets, a value for D_{eff} is automatically calculated (cell M12 in sheet “Deff via peak parking”, or cell B7 in sheet “Deff via experiments at low F ”). This value should then be filled out in cell S20 of the main sheet, which then automatically creates a plot of $h-h_B$ vs. v_i and $H-H_B$ vs. u_0 . The Excel-template also automatically calculates the estimated value of D_{pz} (diffusion rate in porous material in particles, in reversed-phase HPLC this value is typically 3–5 times smaller than diffusion rate outside the particles [57]). The D_{pz} -value is subsequently used to estimate the plate height contribution H_{CS} arising from the mass transfer resistance inside the particles (via Eqs. (20) and (21)). If the correct value for ρ (relative core radius, $\rho = 0$ for fully porous particles) is specified in cell S24, the value for D_{pz} is automatically corrected for the presence of the solid core inside the particles. This calculation also requires values for the diffusion coefficient (S25) of the investigated sample compound (which can be estimated using the Wilke–Chang equation, see Eq. (14), as indicated in the template), the total (S22) and external porosity (S21) (see Section 5) and the phase retention factor k' (S19). The Excel then automatically calculates and plots the values of $H-H_B-H_{CS}$, which correspond to the band broadening originating from flow effects occurring outside the particles.

The remaining value for H then corresponds to the sum of the A and C_m -terms, respectively the first and third term of Eq. (2a). The latter represents the theoretically expected contribution of the mass transfer at the through-pore level. The expression given in Eq. (2a) is the only theoretically available expression, but it should be used with caution, for it has been derived under the assumption of a pure plug flow (whereas the flow obviously has a parabolic flow profile), and the value for Sh_m is ill-known [40]. The best currently available approach is to use an expression for Sh_m obtained using numerical simulations of the mass transfer in a simplified

- orthogonal comprehensive two-dimensional liquid chromatography methods in food analysis, *LC/GC Eur.* 27 (2014) 570–577.
- [12] C.M. Willemsse, M.A. Stander, A.G.J. Tredoux, A. de Villiers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatographic analysis of anthocyanins, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 189–201.
- [13] S. De Smet, B. Miserez, M. Rambla Alegre, M. Talha Yapa, A. de Villiers, P. Sandra, et al., Optimization of a high-resolution radical scavenging assay coupled on-line to reversed-phase liquid chromatography for antioxidant detection in complex natural extracts, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 724–731.
- [14] A. de Villiers, F. Lynen, P. Sandra, Effect of analyte properties on the kinetic performance of liquid chromatographic separations, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3431–3442.
- [15] 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.
- [16] P.W. Carr, D.R. Stoll, X. Wang, Perspectives on recent advances in the speed of high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1890–1900.
- [17] L.W. Potts, P.W. Carr, Approximate and exact equations for peak capacity in isocratic high-pressure liquid chromatography, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7614–7615.
- [18] P.W. Carr, J.W. Dolan, U.D. Neue, L.R. Snyder, Contributions to reversed-phase column selectivity. I. Steric interaction, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1724–1742.
- [19] D.V. McCalley, Some practical comparisons of the efficiency and overloading behaviour of sub-2 μm porous and sub-3 μm shell particles in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2887–2897.
- [20] D.H. Marchand, P.W. Carr, D.V. McCalley, U.D. Neue, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Contributions to reversed-phase column selectivity. II. Cation exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7110–7129.
- [21] M.R. Filgueira, C.B. Castells, P.W. Carr, A simple, robust orthogonal background correction method for two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6747–6752.
- [22] D. Guilleme, M.W. Dong, Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review, *Am. Pharm. Rev.* 16 (36) (2013) 38–43.
- [23] F. Gritti, G. Guiochon, Perspectives on the evolution of the column efficiency in liquid chromatography, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3017–3035.
- [24] M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J.-L. Veuthey, D. Guilleme, Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2–18.
- [25] M.M. Fallas, N. Tanaka, S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, Influence of phase type and solute structure on changes in retention with pressure in reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 37–45.
- [26] P.G. Boswell, D.R. Stoll, P.W. Carr, M.L. Nagel, M.F. Vitha, G.A. Mabbott, An advanced, interactive, high-performance liquid chromatography simulator and instructor resources, *J. Chem. Educ.* 90 (2013) 198–202.
- [27] F. Gritti, Quantification of individual mass transfer phenomena in liquid chromatography for further improvement of column efficiency, *LC/GC North Am.* 32 (2014) 928–940.
- [28] S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, D. Guilleme, Current and future trends in UHPLC, *Trac. Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 2–13.
- [29] D. Abate-Pella, D.R. Stoll, P.W. Carr, P.G. Boswell, An open-source simulator for exploring HPLC theory, *LC/GC North Am.* 33 (2015) 200–207.
- [30] L.E. Blue, J.W. Jorgenson, 1.1 μm superficially porous particles for liquid chromatography: part II: column packing and chromatographic performance, *J. Chromatogr. A* 1380 (2015) 71–80.
- [31] P.W. Carr, J.W. Dolan, J.G. Dorsey, L.R. Snyder, J.J. Kirkland, Contributions to reversed-phase column selectivity: III. Column hydrogen-bond basicity, *J. Chromatogr. A* 1395 (2015) 57–64.
- [32] L. Lapidus, N.R. Amundson, Mathematics of adsorption in beds. VI. The effect of longitudinal diffusion in ion-exchange and chromatographic columns, *J. Phys. Chem.* 56 (1952) 984–988.
- [33] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
- [34] J.F.K. Huber, High efficiency, high speed liquid chromatography in columns, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 85–90.
- [35] E. Kucera, Contribution to the theory of chromatography, *J. Chromatogr. A* 19 (1965) 237–248.
- [36] C. Horváth, H.-J. Lin, Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 126 (1976) 401–420.
- [37] F. Gritti, G. Guiochon, General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5329–5347.
- [38] A. Felinger, Determination of rate constants for heterogeneous mass transfer kinetics in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 120–128.
- [39] G. Desmet, K. Broeckhoven, Equivalence of the different C_m - and C_s -term expressions used in liquid chromatography and a geometrical model uniting them, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8076–8088.
- [40] S. Deridder, G. Desmet, New insights in the velocity dependency of the external mass transfer coefficient in 2D and 3D porous media for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1227 (2012) 194–202.
- [41] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography. Part 1*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [42] J.H. Knox, H.P. Scott, B and C terms in the van Deemter equation for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 282 (1983) 297–313.
- [43] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 2–40.
- [44] J.H. Knox, Band Dispersion in Chromatography – a New View of A-term Dispersion, 831, 1999, pp. 3–15.
- [45] K.K. Unger, R. Skudas, M.M. Schulte, Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 393–415.
- [46] D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Total pore blocking as an alternative method for the on-column determination of the external porosity of packed and monolithic reversed-phase columns, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 131–141.
- [47] F. Gritti, G. Guiochon, Influence of the pressure on the properties of chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 117–126.
- [48] Y. Vanderheyden, K. Broeckhoven, G. Desmet, Comparison and optimization of different peak integration methods to determine the variance of unretained and extra-column peaks, *J. Chromatogr. A* 1364 (2014) 140–150.
- [49] S. Heinisch, G. Desmet, D. Clicq, J.-L. Rocca, Kinetic plot equations for evaluating the real performance of the combined use of high temperature and ultra-high pressure in liquid chromatography. Application to commercial instruments and 2.1 and 1 mm I.D. columns, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 124–136.
- [50] D.V. McCalley, Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient fused-core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4561–4567.
- [51] D. Spaggiari, S. Fekete, P.J. Eugster, J.-L. Veuthey, L. Geiser, S. Rudaz, et al., Contribution of various types of liquid chromatography-mass spectrometry instruments to band broadening in fast analysis, *J. Chromatogr. A* 1310 (2013) 45–55.
- [52] K. Broeckhoven, G. Desmet, The future of UHPLC: towards higher pressure and/or smaller particles? *Trac. Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 65–75.
- [53] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guilleme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105–119.
- [54] S. Buckenmaier, C.A. Miller, T. van de Goor, M.M. Dittmann, Instrument contributions to resolution and sensitivity in ultra high performance liquid chromatography using small bore columns: comparison of diode array and triple quadrupole mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1377 (2015) 64–74.
- [55] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 153–161.
- [56] J.C. Heaton, D.V. McCalley, Comparison of the kinetic performance and reactivity of sub-2 μm core-shell, hybrid and conventional bare silica phases in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 106–116.
- [57] A. Liekens, J. Denayer, G. Desmet, Experimental investigation of the difference in B-term dominated band broadening between fully porous and porous-shell particles for liquid chromatography using the effective medium theory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4406–4416.
- [58] C.R. Wilke, P. Chang, Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 1 (1955) 264–270.
- [59] R.C. Reid, J.M. Prausnitz, T.K. Sherwood, *The Properties of Gases and Liquids*, McGraw-Hill, New York, 1977.
- [60] K. Miyabe, G. Guiochon, Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* (2003) 155–173.
- [61] K. Miyabe, Estimation of molecular diffusivity in aqueous solution of acetonitrile by the Wilke-Chang equation, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2674–2679.
- [62] I. Halász, K. Martin, Pore size of solid bodies, *Angew. Chem.* 90 (1978) 954–961.
- [63] R. Nikolov, W. Werner, I. Halász, Pore size distribution off “in situ” coated silica gels determined by exclusion chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 207–216.
- [64] W. Werner, I. Halász, Pore structure of chemically modified silica gels determined by exclusion chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 277–283.
- [65] R. Groh, I. Halász, Measurement of band broadening in size exclusion chromatography, *Anal. Chem.* 1325 (1981) 1325–1335.
- [66] T. Crispin, I. Halász, Determination of the pore size distribution, by exclusion chromatography, of ion-exchange polymers which swell in water, *J. Chromatogr. A* 239 (1982) 351–362.
- [67] F. Gritti, I. Leonardi, J. Abia, G. Guiochon, Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography. Relationships between particle characteristics and column performance, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3819–3843.
- [68] H. Guan, G. Guiochon, Reproducibility, accuracy, and correction of isotherm data measured by chromatography, *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 39–54.
- [69] H. Guan, G. Guiochon, Study of physico-chemical properties of some packing materials. I. Measurements of the external porosity of packed columns by inverse size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 27–40.
- [70] G. Stegeman, J.C. Kraak, H. Poppe, Hydrodynamic and size-exclusion chromatography of polymers on porous particles, *J. Chromatogr. A* 550 (1991) 721–739.
- [71] Y. Yao, A.M. Lenhoff, Determination of pore size distributions of porous

- chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 273–282.
- [72] J. Porath, Some recently developed fractionation procedures and their application to peptide and protein hormones, *Pure Appl. Chem.* 6 (1963) 233–244.
- [73] M.J.M. Wells, C.R. Clark, Liquid chromatographic elution characteristics of some bonded solutes used to measure column void volume on phases, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1341–1345.
- [74] K. Miyabe, G. Guiochon, Extrathermodynamic relationships in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5754–5765.
- [75] F. Gritti, G. Guiochon, Experimental evidence of the influence of the surface chemistry of the packing material on the column pressure drop in reverse-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1136 (2006) 192–201.
- [76] A. Liekens, D. Cabooter, J. Denayer, G. Desmet, A study of the parameters affecting the accuracy of the total pore blocking method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6754–6761.
- [77] S. Jung, S. Ehlert, M. Pattky, U. Tallarek, Determination of the interparticle void volume in packed beds via intraparticle Donnan exclusion, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 696–704.
- [78] F. Gritti, G. Guiochon, Impact of Retention on Trans-column Velocity Biases in Packed Columns, 56, 2010, pp. 1495–1509.
- [79] F. Gritti, G. Guiochon, New insights on mass transfer kinetics in chromatography, *AIChE J.* 57 (2011) 333–345.
- [80] F. Gritti, G. Guiochon, Relationship between trans-column eddy diffusion and retention in liquid chromatography: theory and experimental evidence, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6350–6365.
- [81] G. Desmet, K. Broeckhoven, J. De Smet, S. Deridder, G.V. Baron, P. Gzil, Errors involved in the existing B-term expressions for the longitudinal diffusion in fully porous chromatographic media Part I: computational data in ordered pillar arrays and effective medium theory, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 171–188.
- [82] G. Desmet, S. Deridder, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part I: theory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 32–45.
- [83] F. Gritti, G. Guiochon, Repeatability of the efficiency of columns packed with sub-3 μ m core-shell particles: Part I. 2.6 μ m Kinetex-C(18) particles in 4.6mm and 2.1mm \times 100mm column formats, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 31–44.
- [84] S. Torquato, *Random Heterogeneous Materials*, Springer Science & Business Media, New York, 2002.
- [85] H.T. Davis, *The Effective Medium Theory of diffusion in composite media*, *J. Am. Ceram. Soc.* 60 (1977) 499–501.
- [86] C. Maxwell, *Treatise on Electricity and Magnetism*, vol. 1, Oxford University Press, London, 1873.
- [87] S. Deridder, G. Desmet, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 46–56.
- [88] C. Horváth, S. Lipsky, Column design in high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 109–116.
- [89] G. Desmet, A finite parallel zone model to interpret and extend Giddings' coupling theory for the eddy-dispersion in porous chromatographic media, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 124–137.
- [90] U.D. Neue, *HPLC-columns – Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
- [91] J.M. Coulson, J.F. Richardson, *Chemical Engineering Volume 2 – Particle Technology and Separation Processes*, Pergamon Press, Oxford, UK, 1999.
- [92] D. Cabooter, J. Billen, H. Terry, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Detailed characterisation of the flow resistance of commercial sub-2 micrometer reversed-phase columns, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 108–117.
- [93] Z. Wu, B.J. Rogers, B. Wei, M.J. Wirth, Insights from theory and experiments on slip flow in chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1871–1876.
- [94] B.A. Rogers, Z. Wu, B. Wei, X. Zhang, X. Cao, O. Alabi, et al., Submicrometer particles and slip flow in liquid chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2520–2526.
- [95] Y. Xu, Particle size analyses of porous silica and hybrid silica chromatographic support particles. Comparison of flow/hyperlayer field-flow fractionation with scanning electron microscopy, electrical sensing zone, and static light scattering, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 40–56.
- [96] M. Kerker, *The Scattering of Light*, Academic Press, New York, 1969.
- [97] S.K. Ratanathanawongs, J.C. Giddings, High-speed size characterization of chromatographic silica by flow/hyperlayer field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A* 467 (1989) 341–356.
- [98] S.K. Ratanathanawongs, J.C. Giddings, Rapid size characterization of chromatographic silicas by flow field-flow fractionation, *Chromatographia* 48 (1994) 545–554.
- [99] R.W. Stout, J.J. DeStefano, L.R. Snyder, Larger-diameter small-particle columns for fast high-performance liquid chromatographic separations with conventional equipment, *J. Chromatogr. A* 261 (1983) 189–212.
- [100] R.W. Stout, J.J. DeStefano, L.R. Snyder, High-performance liquid chromatographic column efficiency as a function of particle composition and geometry and capacity factor, *J. Chromatogr. A* 282 (1983) 263–286.
- [101] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter, Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 369–375.
- [102] D. Cabooter, A. Fanigliulo, G. Bellazzi, B. Allieri, A. Rottigni, G. Desmet, Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7074–7081.
- [103] T. Allen, *Particle Size Measurement*, Chapman and Hall, London, 1968.
- [104] J.H. Knox, M. Saleem, Comparison of plate efficiencies in gas and liquid chromatography using various supports, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 745.
- [105] G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Geometry-independent plate height representation methods for the direct comparison of the kinetic performance of LC supports with a different size or morphology, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4058–4070.
- [106] K. Broeckhoven, D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, The kinetic plot method applied to gradient chromatography: theoretical framework and experimental validation, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2787–2795.
- [107] K. Broeckhoven, D. Cabooter, S. Eeltink, G. Desmet, Kinetic plot based comparison of the efficiency and peak capacity of high-performance liquid chromatography columns: theoretical background and selected examples, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 20–30.
- [108] L.R. Snyder, D.L. Saunders, Optimized solvent programming for separations of complex samples by liquid-solid adsorption chromatography in columns, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 195–208.
- [109] F. Gritti, G. Guiochon, The bandwidth in gradient elution chromatography with a retained organic modifier, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 67–82.
- [110] D. Cabooter, F. Lestremou, A. de Villiers, K. Broeckhoven, F. Lynen, P. Sandra, et al., Investigation of the validity of the kinetic plot method to predict the performance of coupled column systems operated at very high pressures under different thermal conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3895–3903.
- [111] Link to “detailed column performance analyzer_v1.0.xls” at <http://vubchemicalengineering.be/?ban=chromatography>.



Axel Andrés is a PhD student from the Department of Analytical Chemistry at the Universitat de Barcelona. His research is based on modeling the prediction of HPLC retention and on the comprehension of several physico-chemical properties related to it. In that sense, he is the first author of several peer-reviewed articles in journals of significant impact factor. The PhD stay in the Chemical Engineering Department from the Vrije Universiteit Brussel allowed his deeper understanding of the HPLC column characterization process, which has led to this step-by-step tutorial.



Ken Broeckhoven is an assistant professor in the department of Chemical Engineering at the Vrije Universiteit Brussel, Belgium. His research focuses on the development of novel ultra-high pressure liquid chromatography instrumentation, investigation of the fundamental aspects of supercritical fluid chromatography, investigation of the parameters affecting column performance and the modeling of flow effects in chromatographic systems. He is the author of 41 peer reviewed papers and 1 patent application. He is also a member of the scientific committee of Chemsys and of the organizing committee of the HTC conference series. He received several awards at international conferences for his contributions.



Gert Desmet heads the department of chemical engineering at the Vrije Universiteit Brussel, Belgium. His research mainly focuses on the miniaturization and automation of separation methods, as well as on the investigation and the modeling of flow effects in chromatographic systems. He is the first or senior author of over 250 peer-reviewed papers and 11 patent applications. He currently is the chair of the Chemistry Panel of the Belgian National Science Fund (FWO), and Associate Editor of “Analytical Chemistry”, a journal of the American Chemical Society. He is also a member of the editorial board of *Journal of Chromatography A* and *LC-GC* magazine.

Please cite this article in press as: A. Andrés, et al., Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: A step-by-step tutorial, *Analytica Chimica Acta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.030>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Chromatographic models to predict the elution of ionizable analytes by organic modifier gradient in reversed phase liquid chromatography

Axel Andrés, Adolfo Téllez, Martí Rosés, Elisabeth Bosch*

Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, C/Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2012

Received in revised form 21 May 2012

Accepted 22 May 2012

Available online 28 May 2012

Keywords:

Retention models

Ionizable analytes

Gradient elution

RP-HPLC

ABSTRACT

The retention of an ionizable analyte under RP-HPLC organic modifier gradient elution is strongly affected by its ionization degree which, in turn, depends on its pK_a and on the pH of the mobile phase. The values of both parameters change depending on the mobile phase composition and thus retention becomes a parameter quite difficult to predict, particularly when working in gradient mode. In this work, an equation describing the retention of ionizable analytes has been combined with three different models of different complexity, developed for gradient elution of neutral compounds (1, 2, or 3 fitting parameters), in order to predict retention of compounds with acid–base properties with particular buffers. All models have been tested under 16 different gradient patterns (4 linear gradients, 4 concave gradients, 4 convex gradients and 4 combinations between them) for the prediction of the retention time of 12 acid–base compounds (pK_a values from 4 to 9) in 3 different buffered mobile phases (pH 5, pH 7 and pH 9) with acetonitrile as organic modifier. The agreement between the experimental and calculated retention times is good for all models. The best results are obtained through the model that depends on three parameters and the accuracy of the two-parameter model is slightly lower but very acceptable too. On the other hand, the predictions performed with the one-parameter model are the less accurate, but good enough to become a valid model taking into account that it requires very little experimental work.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. HPLC and elution modes

High-performance liquid chromatography (HPLC) is nowadays one of the most used analytical techniques because of its multiple utilities and applications. Composition and pH of the mobile phase, as well as the working temperature, are the main factors involved in chromatographic elution [1,2] and, then, the control of their effect on retention results in a big advantage in method development. Particularly, gradient elution mode should be carefully considered since it implies changes in composition and pH of the mobile phase during the elution of the analyte.

Literature shows several models that allow good results when predicting the behavior of neutral compounds in gradient mode [3–9]. However, modeling the behavior of analytes with acid–base properties becomes quite more complex since their ionization depends on the pH of the mobile phase and on their pK_a value. In turn, those two properties strongly depend on the composition of the mobile phase [10], and controlling them throughout the chromatographic run is necessary in order to get a good prediction of the behavior of this kind of compounds [11]. Recent approaches to

predict retention of acids and bases in gradient elution mode are those of Wiczling and Kaliszan [12,13].

The retention of the ionized species of a monoprotic compound is usually very low compared to the retention of its neutral species so, when working at a pH value close to the pK_a of the analyte, small changes in the mobile phase pH can lead to very different retention times. Since gradient patterns in the mobile phase composition modify the mobile phase pH and the pK_a of the analyte (therefore, the ionization degree of these analytes), different gradient patterns may lead to very different retention times, so complete separation of a group of similar compounds may be achieved if the right gradient pattern is applied. The main goal of this paper is to establish a reliable chromatographic model that predicts the retention time of a compound regardless of the gradient pattern applied to it.

2. Theory

2.1. Gradient elution of neutral compounds

In previous work [8], performed on the basis of the work from Nikitas and Pappa-Louisi [14], the following equations have been used to describe elution of a neutral compound:

$$\int_0^{t_R} \frac{dt_c}{t_0(1+k_\psi)} = 1 \quad (1)$$

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

$$t_R = \delta t \sum_{i=1}^n \frac{1 + k_\varphi}{k_\varphi} \quad (2)$$

where dt_c is the infinitesimal period of time in which the analyte is under the influence of one step of mobile phase concentration (with composition φ), t_0 is the hold-up time of the chromatographic system, k_φ is the retention factor of the solute for a given mobile phase composition, t_R is the retention time and n is the least integer that validates the condition of analyte elution:

$$\sum_{i=1}^n \frac{\delta t}{t_0 k_\varphi} \geq 1 \quad (3)$$

In this model the dwell time of the system is considered as a previous isocratic step at φ equal to the initial composition of the gradient profile [8].

As it can be seen in these equations, the retention factor (k) is always related to the fraction of organic modifier in the mobile phase (φ), so achieving a reliable relationship between k and φ is fundamental to obtain accurate predictions. One of these models tested employs three fitting parameters and was used to perform predictions of retention times in RP-HPLC gradient elution [7,8,14].

$$\log k_\varphi = a - \frac{c\varphi}{1 + b\varphi} \quad (4)$$

The three parameters contained in Eq. (4), a , b and c , are constants of the chromatographic system (fixed column, organic modifier and solute). This model has been successfully employed to predict the retention time of neutral solutes in gradient mode, first by testing it on some related compounds under three different gradient patterns being methanol, acetonitrile and 2-propanol the organic modifiers [14], and later by testing it on a wide range of compounds under a large variety of different gradient patterns using methanol or acetonitrile as the organic modifiers of the mobile phase [8]. Before using the model to perform predictions in gradient mode, a previous isocratic calibration is necessary in order to determine the three parameters of Eq. (4).

Several simplifications have been proposed in order to reduce the amount of previous experimental work to be done [1,8]. One of them is the two-parameter expression of the polarity model [15,16]:

$$\log k_\varphi = q + pP_m^N \quad (5)$$

This polarity model relates the retention factor (k_φ) to the polarity of the mobile phase (P_m^N) through two fitting parameters (q and p). At the same time P_m^N is related to the volume fraction of organic modifier in the mobile phase (φ) by means of the following empirical equation when acetonitrile is the organic modifier:

$$P_m^N = 1 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (6)$$

Eq. (5) can be simplified even more by assuming a linear relation between q and p , which was observed for a wide range of neutral compounds [8,15]. This relation can be described through the following expression:

$$q = (\log k)_0 - pP_s^N \quad (7)$$

Substitution of Eq. (7) into Eq. (5) and rearrangement of terms leads to Eq. (8):

$$\log k_\varphi = (\log k)_0 + p_0(P_m^N - P_s^N) \quad (8)$$

This expression [15,17] contains three independent parameters. Nevertheless, two of these parameters remain constant for a certain chromatographic system (fixed column and organic modifier), which means that Eq. (8) can be considered as a model with only one parameter, p_0 , which is mainly explained by the polarity of the solute. In this model, the polarity parameter is expressed by p_0 to

make a differentiation from the expression in the two-parameter model, p (Eq. (5)). The two parameters that remain constant are $(\log k)_0$, which represents the retention of the analyte in a hypothetical case where the polarity of the mobile phase and the polarity of the stationary phase were exactly the same, and P_s^N , which stands for the polarity of the stationary phase. These parameters only depend on the chromatographic system and in any case depend on the injected solute. This model has been successfully employed before to predict the retention factor of neutral solutes in RP-HPLC, both in isocratic mode and gradient mode [8,18–25].

The determination of P_s^N and $(\log k)_0$ implies the measurements of the retention time of 12 calibration substances in isocratic mode at different compositions of mobile phase [19,24]. Employing previously characterized columns or, in other words, columns that have these two parameters already determined, allows the prediction of retention times by only knowing the value of the parameter p of the analyte, provided that P_m^N can be calculated through Eq. (6). Once the values of $(\log k)_0$ and P_s^N have been determined, values of p for any compound can be calculated from just one retention measurement. This parameter basically depends on the polarity of the solute; polar analytes have lower p values while apolar analytes show higher p values, although it also depends, in a lesser degree, on the organic modifier and on the stationary phase. The p polarity parameter is also related to other important physical parameters, like the logarithm of the octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) [26,27], and other molecular descriptors such as the LFER solute descriptors proposed by Abraham [18,20].

2.2. Retention of ionizable compounds

The retention factor of an ionized analyte (k) is taken as the average of the retention factors of its protonated and dissociated forms (k_{HA} and k_A , respectively, which are the retention factors obtained when the analyte is entirely in any of these forms), weighted by the molar fraction of the corresponding form in the mixture [28–32]. The well-known equation that relates the mobile phase pH, the pK'_a value of the analyte and the retention factors of both forms of the analyte with the experimental retention factor is then the following:

$$k_\varphi = \frac{k_{HA} + k_A \cdot 10^{pH - pK'_a}}{1 + 10^{pH - pK'_a}} \quad (9)$$

where K'_a is obtained through the concentrations of their protonated (HA) and dissociated forms (A), and the activity of H^+ in the mobile phase, a_H .

Analogous expressions can be obtained replacing the retention factors with other type of retention parameters, such as retention time, adjusted retention time, retention volume or adjusted retention volume [31–33]. When different arrangements are employed with the same column, retention factors should be replaced with adjusted retention times (the difference between the retention time of the analyte and the hold-up time of the system) in order to take into account only the time at which the analytes are retained inside the column and not the extracolumn hold-up times. That leads to the following expression:

$$t'_R = \frac{t'_R(HA) + t'_R(A) \cdot 10^{pH - pK'_a}}{1 + 10^{pH - pK'_a}} \quad (10)$$

Eq. (10) defines a sigmoidal plot when representing the retention factor of an ionizable analyte against the pH value of the mobile phase. In this plot, the inflection point indicates the pK'_a value of the analyte, while the horizontal tendencies agree with the retention factor of the analyte in its neutral and ionized form. Thus, this equation can be employed to predict the retention of the analytes in RP-HPLC, provided that the mobile phase pH is properly known.

In order to describe the ionization of different analytes, a model that can be used with acid, basic and amphiprotic compounds was proposed [34]. Since the retention of the ionized form of the solute is very low compared to the retention of its neutral form, it is assumed as a fraction of the retention of the neutral form, f . This parameter can be calculated through Eq. (11):

$$f = \left(\frac{k_A}{k_{HA}} \right)^i \quad (11)$$

where the subscripts in the retention factor (k) indicate that it is referred to the deprotonated (A) or protonated (HA) form of the compounds, while i represents a parameter used by Kaliszán and Wiczling [35] which takes the value of 1 for monoprotic acids and -1 for monoprotic bases.

Introduction of parameter f into Eq. (9) leads to Eq. (12), where k_N is the retention factor of the neutral form of the compound (HA for a neutral acid but A for a neutral base):

$$\log k_\varphi = \log k_N + \log[1 - D(1 - f)] \quad (12)$$

where D is the degree of ionization of the compound and is represented by Eq. (13):

$$D = \frac{1}{1 + 10^{i(\text{p}K_a - \text{pH})}} \quad (13)$$

Combination of Eq. (12) with Eqs. (4), (5) and (8) leads to expressions that allow the prediction of the retention of ionizable analytes under gradient elution.

$$\log k_\varphi = a - \frac{c\varphi}{1 + b\varphi} + \log[1 - D(1 - f)] \quad (14)$$

$$\log k_\varphi = q + pP_m^N + \log[1 - D(1 - f)] \quad (15)$$

$$\log k_\varphi = (\log k)_0 + p_0(P_m^N - P_s^N) + \log[1 - D(1 - f)] \quad (16)$$

To perform proper predictions, the ionization degree (D) must be calculated at all points of the gradient. Since D is a function of both the mobile phase pH and the analyte $\text{p}K_a$ value, the variation of the value of these parameters with the mobile phase composition has to be modeled through the gradient elution. Although linear equations relating those two parameters to φ have been already established [36,37], they only cover a mobile phase composition range from 20% to 60% of acetonitrile. Should a larger φ range be covered, empirical second grade equations can also be fitted to experimental ${}^s_w\text{pH}$ and ${}^s_w\text{p}K_a$ values obtained at different organic fractions, equations such as the following:

$${}^s_w\text{pH} = x_0\varphi^2 + x_1\varphi + x_2 \quad (17)$$

$${}^s_w\text{p}K_a = y_0\varphi^2 + y_1\varphi + y_2 \quad (18)$$

where ${}^s_w\text{pH}$ refers to the pH measured in a particular mobile phase in which the acetonitrile fraction is φ and the potentiometric system has been calibrated with aqueous buffers. In the same way, ${}^s_w\text{p}K_a$ refers to the acidity constant in this mobile phase being the proton activity referred to the infinite dilution of the proton in pure water.

It should be noticed that a total of six additional parameters (three regarding the determination of the pH, the other three regarding the determination of the $\text{p}K_a$) have to be calculated in order to perform proper predictions. However, it also should be noted that these parameters are part of a mathematical approach to find the values of the pH and $\text{p}K_a$, they do not strictly belong to the chromatographic models.

3. Experimental

3.1. Instrumentation

For chromatographic measurements, two different Shimadzu HPLC arrangements were employed. Arrangement 1 consisted of two LC-10ADvp pumps, a SIL-20AHT auto-injector, a SPD-M10Avp diode array detector, a CTO-10ASvp oven and a SCL-10Avp controller. Arrangement 2 consisted of two pumps (models LC-10ATvp and LC-10ADvp), a SIL-10ADvp auto-injector, a SPD-10Avp UV-vis detector, and a SCL-10Avp controller and a water bath in order to keep the temperature constant at 25 ± 0.1 °C. Mobile phase pH has been measured with a Crison 5014 combined electrode, connected to a pH meter GLP 22 potentiometer from Crison (Alella, Spain), with an accuracy of ± 0.002 in pH units. For all chromatographic measurements, an XTerra MS C_{18} column (4.6 mm \times 150 mm) from Waters (Milford, MA, USA) was used.

3.2. Chemicals

Acetonitrile was 99.9% for HPLC, gradient grade, and was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), Prolabo (West Chester, PA, USA) and Panreac (Barcelona, Spain). Double deionized water was obtained with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA), with a resistivity of 18.2 M Ω cm. For the pH buffering solutions, the following chemicals have been used: phosphoric acid and potassium hydrogenphosphate from Merck, citric acid and sodium acetate from Carlo Erba (Milano, Italy), formic acid and triethylamine from Baker (Deventer, Netherlands), tris(hydroxymethyl)aminomethane and ammonium hydrogencarbonate from Fluka (Steinheim, Germany) and pyrrolidine from Sigma (St. Louis, MO, USA). These compounds were of analytical reagent grade or better. These chemicals were then mixed with hydrochloric acid (p.a., Merck) or sodium hydroxide (p.a., Merck) solutions in order to obtain the exact desired ${}^w\text{pH}$. All buffers had a concentration of 10 mM. The analytes chosen for this work (2,4-dinitrophenol, benzoic acid, 2,5-dinitrophenol, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,5-trichlorophenol, vanillin, pyridine, 4-tert-butylpyridine, 2,4-lutidine, 2,4,6-trimethylpyridine, lidocaine, N,N-dimethylbenzylamine; shown in Tables 1 and 2) and the ones used in the column characterization were obtained from Baker, Aldrich (Steinheim, Germany), Merck, Carlo Erba, Fluka or Sigma (reagent grade or better). KBr (p.a., Baker), methanol (99.9% for HPLC, Merck) and acetone (99.5%, Panreac) have also been used throughout this work.

3.3. Sample preparation

Samples were dissolved in acetonitrile at a concentration of 100 ppm and filtered through a 0.45 μm nylon filter. A set of 12 compounds was selected, 6 acids and 6 bases, all of them with only one ionizable proton, i.e. only one $\text{p}K_a$. Those substances were chosen in order to cover the whole $\text{p}K_a$ range (limited by the working pH range of the column, from 2 to 11).

3.4. Procedure

Mobile phases used were mixtures of acetonitrile and aqueous buffer. Since the chromatographic system mixed the two phases automatically, the pH measurements were performed before the buffer was mixed with the organic modifier; the potentiometric system used in pH measurements was also calibrated with aqueous buffers. The total flow rate employed was always 1 mL/min. Injection volume was 10 μL for every solute, and measurements were taken in triplicate. Detection was performed with a UV-vis detector, set at 254 nm.

Table 1
pK_a values and retention factors determined experimentally in mobile phases with different organic fractions.

Compound	20%						40%						60%						80%					
	pK _a	t _R '(A)	t _R '(HA)	R ²	s	F	pK _a	t _R '(A)	t _R '(HA)	R ²	s	F	pK _a	t _R '(A)	t _R '(HA)	R ²	s	F	pK _a	t _R '(A)	t _R '(HA)	R ²	s	F
2,4-Dinitrophenol	4.19 (±0.13)	2.189 (±0.390)	17.446 (±0.896)	0.978	1.001	159	4.56 (±0.17)	0.516 (±0.100)	3.518 (±0.212)	0.965	0.260	96	6.04 (±0.27)	0.205 (±0.054)	1.136 (±0.081)	0.936	0.122	51	7.90 (±0.26)	0.017 (±0.061)	0.408 (±0.037)	0.856	0.069	21
Benzoic acid	4.72 (±0.04)	0.480 (±0.057)	7.497 (±0.107)	0.998	0.141	2027	5.58 (±0.10)	0.170 (±0.031)	1.659 (±0.048)	0.991	0.073	373	6.22 (±0.17)	0.127 (±0.028)	0.808 (±0.039)	0.969	0.062	109	7.78 (±0.20)	0.018 (±0.055)	0.492 (±0.036)	0.914	0.066	37
2,5-Dinitrophenol	5.47 (±0.11)	2.222 (±0.434)	18.995 (±0.627)	0.987	1.007	261	5.91 (±0.11)	0.423 (±0.089)	3.937 (±0.126)	0.988	0.204	277	6.41 (±0.11)	0.215 (±0.031)	1.285 (±0.041)	0.985	0.067	231	7.81 (±0.22)	0.023 (±0.066)	0.539 (±0.042)	0.896	0.078	30
2,4,6-Tribromophenol	6.37 (±0.05)	16.914 (±3.612)	298.463 (±4.075)	0.998	7.533	1415	6.85 (±0.04)	0.945 (±0.235)	20.647 (±0.235)	0.998	0.434	1981	7.29 (±0.04)	0.176 (±0.063)	4.045 (±0.054)	0.997	0.100	1263	8.07 (±0.16)	0.018 (±0.133)	1.473 (±0.071)	0.948	0.137	64
2,4,5-Trichlorophenol	7.57 (±0.05)	6.338 (±3.897)	191.520 (±2.928)	0.996	6.274	797	7.91 (±0.04)	0.601 (±0.232)	13.305 (±0.157)	0.997	0.330	1174	8.34 (±0.06)	0.068 (±0.098)	2.776 (±0.047)	0.992	0.102	419	8.98 (±0.19)	0.029 (±0.153)	1.072 (±0.025)	0.969	0.061	108
Vanillin	8.01 (±0.04)	0.223 (±0.051)	3.717 (±0.034)	0.998	0.074	1843	8.63 (±0.05)	0.015 (±0.030)	1.182 (±0.013)	0.996	0.031	908	9.04 (±0.18)	0.004 (±0.083)	0.667 (±0.019)	0.963	0.047	91	9.21 (±0.50)	0.025 (±0.213)	0.483 (±0.019)	0.879	0.048	25
Pyridine	4.69 (±0.07)	2.017 (±0.028)	0.206 (±0.043)	0.996	0.056	847	4.02 (±0.25)	0.973 (±0.029)	0.114 (±0.087)	0.950	0.077	66	3.91 (±0.14)	0.716 (±0.012)	0.089 (±0.051)	0.974	0.035	133	3.31 (±0.76)	0.605 (±0.015)	0.064 (±0.459)	0.782	0.043	13
4-Tert-butylpyridine	5.55 (±0.04)	50.282 (±0.489)	1.018 (±0.695)	0.998	1.127	1813	4.95 (±0.04)	5.957 (±0.045)	0.349 (±0.087)	0.998	0.114	1929	4.67 (±0.08)	2.095 (±0.020)	0.208 (±0.050)	0.996	0.053	825	5.38 (±0.08)	1.205 (±0.011)	0.243 (±0.021)	0.996	0.027	936
2,4-Lutidine	6.38 (±0.06)	8.435 (±0.128)	0.407 (±0.144)	0.996	0.266	926	5.83 (±0.13)	2.108 (±0.055)	0.258 (±0.079)	0.982	0.128	195	5.29 (±0.12)	1.135 (±0.024)	0.107 (±0.046)	0.984	0.061	215	4.73 (±0.11)	0.860 (±0.008)	0.142 (±0.027)	0.994	0.023	587
2,4,6-Trimethylpyridine	7.16 (±0.04)	14.717 (±0.192)	0.502 (±0.164)	0.998	0.334	1782	6.62 (±0.10)	2.815 (±0.066)	0.290 (±0.074)	0.990	0.133	351	6.22 (±0.11)	1.367 (±0.028)	0.328 (±0.039)	0.986	0.061	254	5.30 (±0.26)	0.939 (±0.027)	0.109 (±0.057)	0.966	0.070	100
Lidocaine	7.85 (±0.06)	142.642 (±3.611)	2.423 (±2.508)	0.994	5.490	564	7.21 (±0.08)	10.616 (±0.270)	0.447 (±0.237)	0.992	0.459	454	7.01 (±0.11)	2.595 (±0.076)	0.435 (±0.076)	0.985	0.134	228	5.87 (±0.11)	1.136 (±0.024)	0.123 (±0.042)	0.985	0.058	230
N,N-Dimethylbenzylamine	8.98 (±0.05)	27.121 (±0.718)	0.895 (±0.269)	0.996	0.671	903	8.48 (±0.07)	4.980 (±0.148)	0.493 (±0.073)	0.993	0.166	488	7.98 (±0.12)	2.085 (±0.115)	0.338 (±0.070)	0.967	0.142	104	7.77 (±0.21)	1.276 (±0.134)	0.200 (±0.088)	0.885	0.160	27

Table 2
Parameter values for each tested model and compound determined from isocratic retention.

Compound	3-Parameter model (Eq. (4))					
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>R</i> ²	<i>s</i>	<i>F</i>
2,4-Dinitrophenol	2.048 (±0.117)	0.852 (±0.232)	5.313 (±0.799)	0.9996	0.025	1151
Benzoic acid	2.637 (±0.273)	4.683 (±0.859)	18.023 (±4.181)	0.9998	0.014	2150
2,5-Dinitrophenol	2.182 (±0.025)	1.181 (±0.054)	6.192 (±0.191)	1.0000	0.005	32229
2,4,6-Tribromophenol	4.788 (±0.149)	2.656 (±0.231)	18.448 (±1.640)	0.9999	0.014	7457
2,4,5-Trichlorophenol	4.768 (±0.160)	3.039 (±0.256)	20.764 (±1.891)	0.9999	0.013	8205
Vanillin	2.061 (±0.083)	5.460 (±0.350)	16.622 (±1.411)	1.0000	0.003	19855
Pyridine	1.927 (±0.008)	11.081 (±0.056)	27.663 (±0.221)	1.0000	0.0001	6834775
4-Tert-butylpyridine	4.934 (±0.381)	6.427 (±0.875)	38.044 (±7.202)	0.9999	0.012	5073
2,4-Lutidine	4.377 (±1.168)	12.079 (±4.406)	60.606 (±35.488)	0.9996	0.014	1479
2,4,6-Trimetilpyridine	4.767 (±0.364)	10.323 (±1.142)	56.654 (±9.761)	1.0000	0.006	13061
Lidocaine	5.014 (±0.166)	4.021 (±0.289)	26.672 (±2.302)	1.0000	0.010	12731
N,N-Dimethylbenzylamine	3.560 (±0.152)	5.017 (±0.422)	22.277 (±2.424)	0.9999	0.007	10740

Compound	2-Parameter (Eq. (5))				
	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>R</i> ²	<i>s</i>	<i>F</i>
2,4-Dinitrophenol	3.462 (±0.115)	−1.151 (±0.051)	0.9978	0.040	901
Benzoic acid	2.540 (±0.197)	−0.964 (±0.088)	0.9881	0.069	166
2,5-Dinitrophenol	3.312 (±0.039)	−1.025 (±0.017)	0.9997	0.014	7159
2,4,6-Tribromophenol	4.983 (±0.210)	−0.996 (±0.093)	0.9965	0.073	564
2,4,5-Trichlorophenol	4.867 (±0.248)	−1.120 (±0.110)	0.9948	0.087	385
Vanillin	1.918 (±0.166)	−0.845 (±0.074)	0.9851	0.058	133
Pyridine	1.131 (±0.136)	−0.578 (±0.060)	0.9719	0.047	69
4-Tert-butylpyridine	3.513 (±0.338)	−0.816 (±0.150)	0.9819	0.118	108
2,4-Lutidine	2.157 (±0.270)	−0.671 (±0.120)	0.9695	0.094	64
2,4,6-Trimetilpyridine	2.589 (±0.305)	−0.726 (±0.136)	0.9730	0.107	72
Lidocaine	4.539 (±0.312)	−1.043 (±0.139)	0.9906	0.109	212
N,N-Dimethylbenzylamine	2.873 (±0.236)	−0.635 (±0.105)	0.9867	0.082	148

Compound	1-Parameter (Eq. (8))
	<i>p</i> ₀
2,4-Dinitrophenol	2.30 (±0.67)
Benzoic acid	1.97 (±0.24)
2,5-Dinitrophenol	2.54 (±0.42)
2,4,6-Tribromophenol	4.36 (±0.26)
2,4,5-Trichlorophenol	3.87 (±0.42)
Vanillin	1.69 (±0.12)
Pyridine	1.69 (±0.37)
4-Tert-butylpyridine	3.43 (±0.28)
2,4-Lutidine	2.48 (±0.37)
2,4,6-Trimetilpyridine	2.75 (±0.32)
Lidocaine	3.78 (±0.32)
N,N-Dimethylbenzylamine	3.31 (±0.39)

The hold-up time of the system was determined with a solution of KBr as unretained solute, at a concentration of 100 μg mL^{−1}. Its detection was performed at 190 nm [38]. Two different hold-up times were determined: 1.25 minutes for arrangement 1 and 0.83 minutes for arrangement 2. The dwell time of the system was determined with methanol and acetone [39], arrangement 2 gave a dwell time of 2.73 minutes (the dwell time of arrangement 1 was not needed since all gradient measurements were performed with arrangement 2).

Studied mobile phase compositions in isocratic mode were 20%, 40%, 60% and 80% in acetonitrile volume percentage. In gradient mode, four different types of gradient have been studied: linear, concave, convex and combinations between them, all with different durations. The profiles of the studied gradients are presented in Fig. 1. For all these gradient profiles, three different initial aqueous buffer pH values (^wpH 5, ^wpH 7 and ^wpH 9) were tested.

4. Results and discussion

4.1. Isocratic calibration

In order to setup the prediction models some isocratic data are required; these isocratic data were obtained through arrangement

1. The first step in calibration is the column characterization procedure since the one-parameter model required the determination of the two parameters of the chromatographic system, ($\log k$)₀ and P_s^N [22,24]. This procedure consisted in injecting a set of reference compounds (1,2-dihydroxybenzene, benzamide, 3-methylphenol, propiophenone, methyl benzoate, 4-nitrotoluene, butyphenone, naphthalene, propylbenzene, heptanophenone, butylbenzene,

Table 3
Values for the *f* parameter of each compound at a 20% of organic modifier.

Compound	<i>f</i>
2,4-Dinitrophenol	0.125
Benzoic acid	0.064
2,5-Dinitrophenol	0.117
2,4,6-Tribromophenol	0.057
2,4,5-Trichlorophenol	0.033
Vanillin	0.060
Pyridine	0.102
4-Tert-butylpyridine	0.020
2,4-Lutidine	0.048
2,4,6-Trimetilpyridine	0.034
Lidocaine	0.017
N,N-Dimethylbenzylamine	0.033

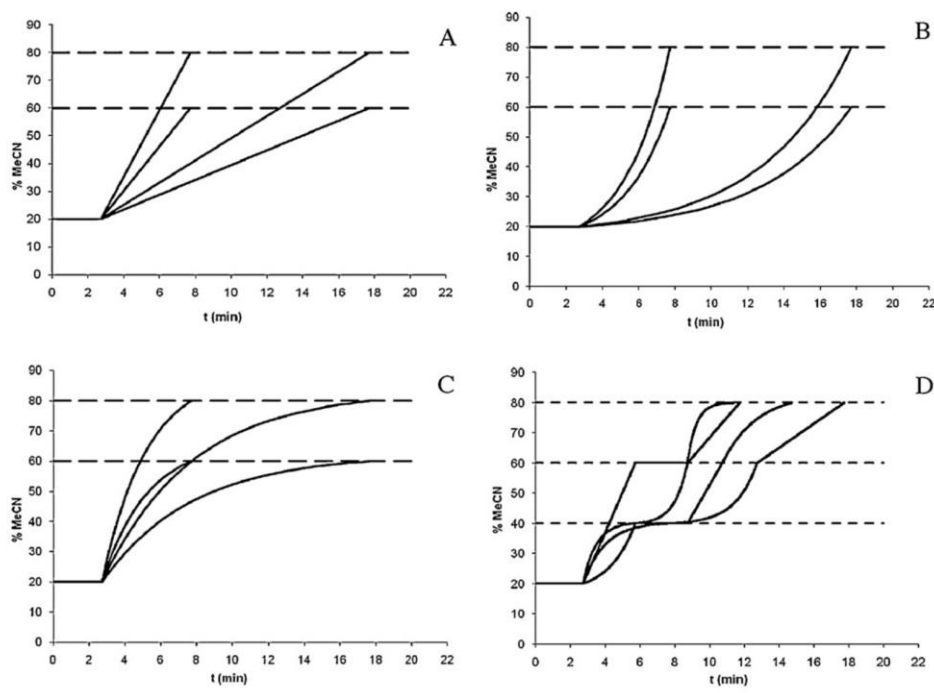


Fig. 1. Gradients employed: (A) linear, (B) concave, (C) convex, and (D) combination.

chrysene) at four different isocratic mobile phase compositions (20, 40, 60 and 80% of acetonitrile). After injection, the retention values were plotted according to Eq. (5), and the p and q values obtained for each compound through this linear regression were later plotted according to Eq. (7) to find initial estimations of $(\log k)_0$ and P_s^N . After an iteration process implemented to refine the initial estimations, the following final results were obtained: $(\log k)_0 = -0.752$; $P_s^N = 0.0066$.

Once the column characterization was completed, the 12 studied compounds (referred in Table 1) were analyzed at 4 isocratic mobile phase compositions (20, 40, 60, and 80% in acetonitrile) and 10 different mobile phase w pH values between 2 and 11 (the pH working range of the column). The adjusted retention times of the analytes were fitted to Eq. (10) for every acetonitrile fraction; the s_w pH values were measured at the end of the chromatographic arrangement. Afterwards, the s_w pK_a values and the adjusted retention times of both the neutral and ionized forms of all compounds were obtained from the fittings. Some representative plots are given in Fig. 2, while the s_w pK_a values and the adjusted retention times obtained for the limiting forms are shown in Table 1, along with some relevant statistical parameters (R^2 stands for the correlation coefficient, s stands for the standard deviation of the fitting and F stands for the Fisher distribution parameter). The adjusted retention times (t'_R) of the neutral form of the compound were turned into retention factors of the neutral species (k_N) using the hold-up time of arrangement 1. The characteristic parameters for the three-parameter, two-parameter and one-parameter chromatographic models were then calculated for each compound by means of Eqs. (4), (5) and (8), respectively. The results regarding the determination of the chromatographic parameters of the different compounds for all models are shown in Table 2. The s_w pH measurements at the end of the chromatographic arrangement and the s_w pK_a values determined from chromatographic data (Table 1) also permitted the determination of the ionization degree (D) through Eq. (13).

After determination of both retention factors (for the protonated and deprotonated forms of the analyte), the values of the f parameter could be calculated through Eq. (11). Slight different values for each compound were obtained at different fractions of organic modifier in the mobile phase but, since the retention of the ionic form is always much lower than the one of the neutral form, a unique f value for each compound was used for simplicity. This f value was the one obtained at 20% of organic modifier in the mobile phase. The decision was based on that, as a general pattern, the data (see Fig. 2) was more accurate at lower fractions of acetonitrile than at higher ones, because at higher percentages of organic modifier the retention of the analytes is very low, so the relative error could be high in case of slight inaccuracies in the measurement of either the retention of the analytes or the system hold-up time. Values for the f parameter are shown in Table 3.

Finally, the s_w pH and s_w pK_a experimental values were fitted to Eqs. (17) and (18) to know the values of these parameters at all times during gradient elution. All these equations along with some relevant fitting statistical parameters are shown in Tables 4 and 5.

4.2. Transference to gradient elution

Experimental measurements were performed by injecting all analytes under all gradient patterns tested and adjusted retention times were obtained; arrangement 2 was employed for these measurements. The adjusted retention time of each compound under every gradient pattern was then predicted by substitution of the parameters shown in Table 2 into Eqs. (14), (15) and (16) (for the three-, the two- and the one-parameter models, respectively). Both adjusted retention times were compared; hold-up time of arrangement 1 was used for the predictions (because it was the one used in the calculation of the characteristic parameters for each model), hold-up time of arrangement 2 was used for experimental results (because all gradient measurements were performed with this chromatographic system). The plots that show the calculated adjusted retention times as a function of the experimental ones are

Table 4

Fittings of the second grade equations for the evolution of pH values through concentration of acetonitrile.

w/pH buffer	x_0	x_1	x_2	R^2	s	F
5	0.869	1.613	5.084	0.9984	0.026	1278
7	0.381	1.312	7.001	0.9996	0.009	5193
9	-0.873	-0.417	8.879	0.9989	0.011	1917

Table 5Fittings of second grade equations for the evolution of pK_a values through concentration of acetonitrile.

Compound	y_0	y_1	y_2	R^2	s	F
2,4-Dinitrophenol	9.352	-3.047	4.393	0.9969	0.162	161
Benzoic acid	4.361	0.545	4.495	0.9876	0.248	40
2,5-Dinitrophenol	6.022	-2.262	5.726	0.9890	0.184	45
2,4,6-Tribromophenol	1.982	0.868	6.142	0.9957	0.081	117
2,4,5-Trichlorophenol	1.984	0.397	7.422	0.9994	0.026	794
Vanillin	-2.849	4.866	7.146	0.9999	0.006	13261
Pyridine	0.455	-2.585	5.137	0.9446	0.231	9
4-Tert-butylpyridine	8.176	-8.571	6.967	0.9549	0.147	11
2,4-Lutidine	-0.040	-2.709	6.926	1.0000	0.002	178406
2,4,6-Trimethylpyridine	-2.358	-0.626	7.347	0.9889	0.143	44
Lidocaine	-3.106	0.043	7.897	0.9538	0.306	10
N,N-Dimethylbenzylamine	1.816	-3.873	9.696	0.9953	0.064	106

given in Fig. 3. In these plots, the expected straight line with a slope of 1 and an intercept of 0 is also represented. The proximity of the individual points to this line proves the quality of the model.

All three models give good results, although the one-parameter model does not predict retention times as accurately as the two-parameter and the three-parameter models. That happens especially when predicting retention times of poorly retained compounds (retention times under 5 min). This can be easily checked by looking at Fig. 4, which shows the residual values for the prediction of the retention with all models in the three different mobile phase pH values. As it can be seen, at low retention times the difference between the experimental values and calculated values may

rise up to almost two minutes in the one-parameter model, which would not be a good prediction. The reason why this may happen is because the one-parameter model has been obtained through several simplifications so, although it saves lots of experimental work, it may carry a slight loss of accuracy and the results may not be as good as the ones obtained from the other two models. This 2-min difference continues to be the general tendency when the retention times increase (with a few exceptions) but, since the relative error gets lower, the results may be considered as acceptable for most substances. In fact, while in low retention times the error can rise up to 70% of the experimental value in the worst case, the model gives an average error of 21.87%, which is considered as acceptable.

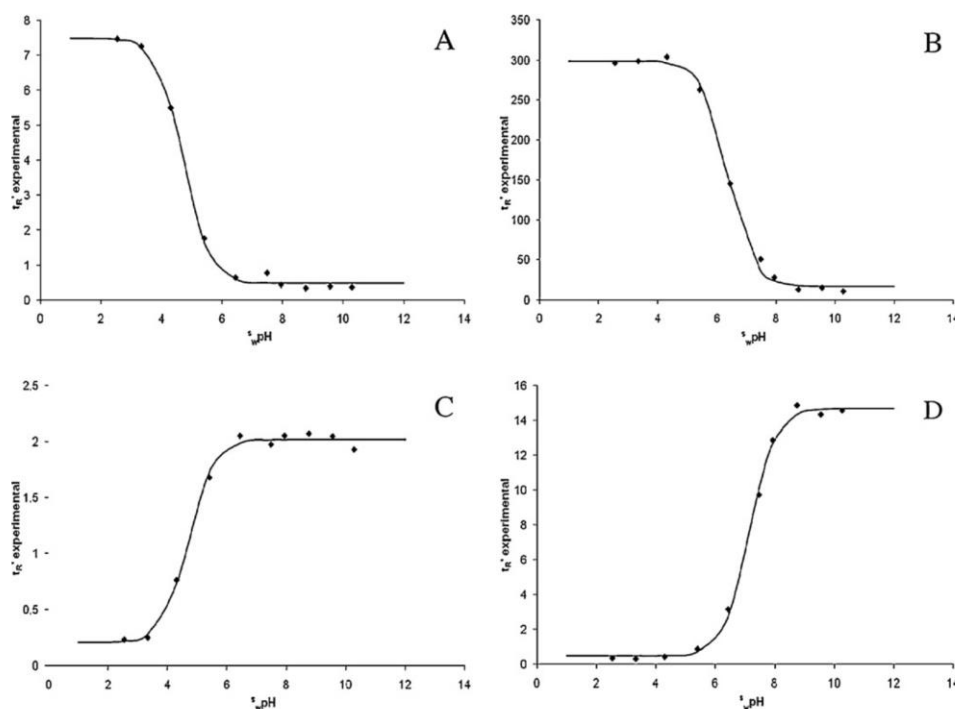


Fig. 2. Fitting of the experimental retention with mobile phases with 20% in acetonitrile to Eq. (10) for: (A) benzoic acid, (B) 2,4,6-tribromophenol, (C) pyridine, and (D) 2,4,6-trimethylpyridine.

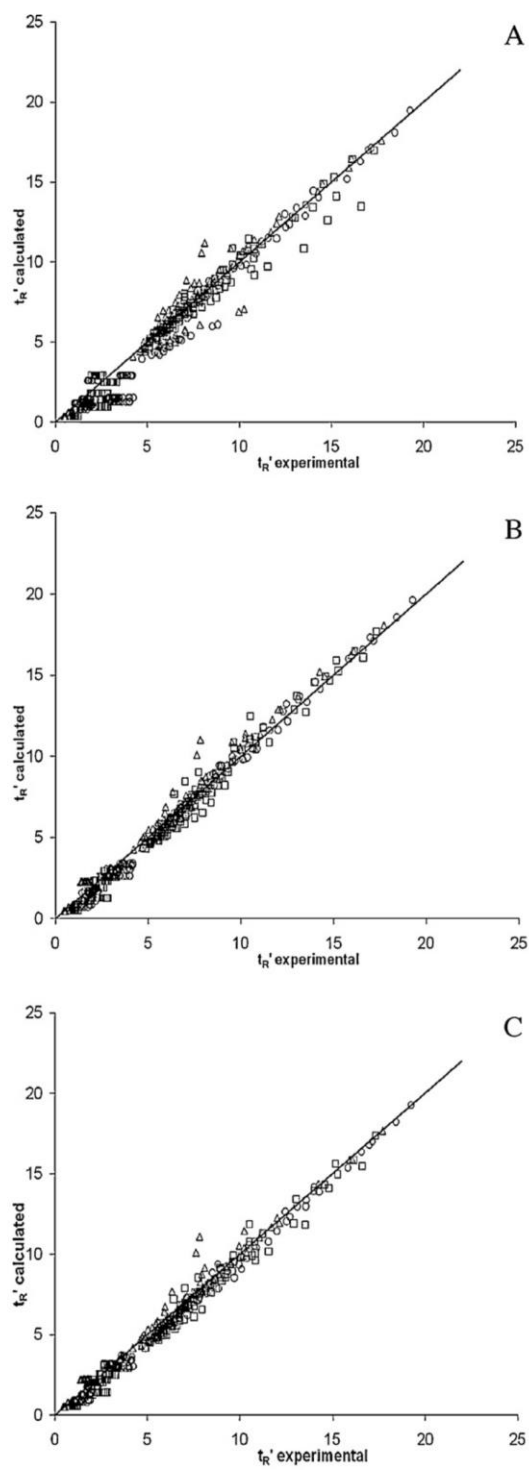


Fig. 3. Comparison of the three different prediction models: (A) 1-parameter model, (B) 2-parameter model, and (C) 3-parameter model; \circ pH 5, \square pH 7, and \triangle pH 9.

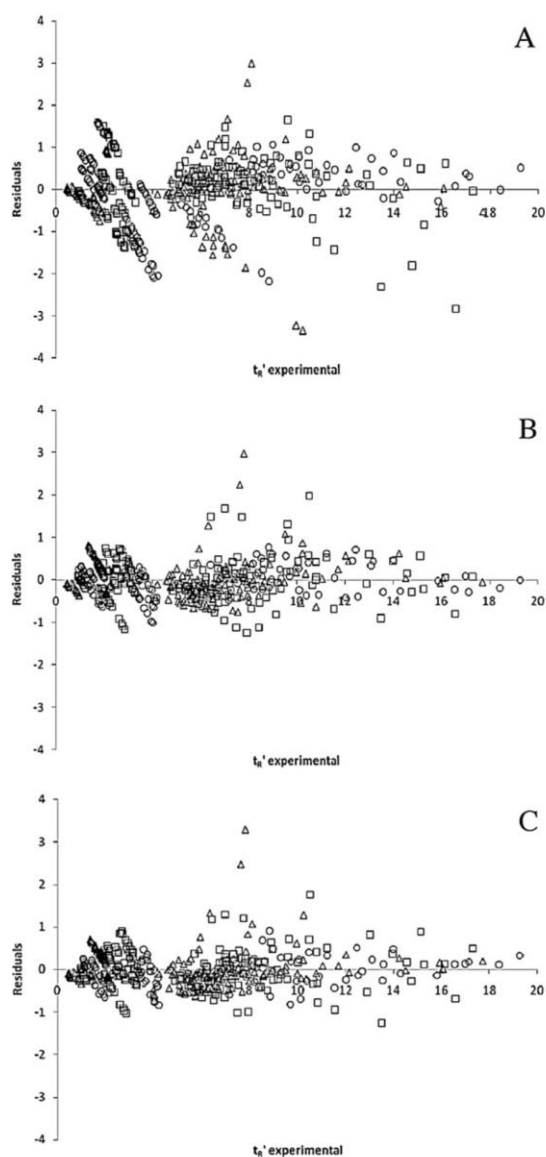


Fig. 4. Residual values for three different prediction models: (A) 1-parameter model, (B) 2-parameter model, (C) 3-parameter model; \circ pH 5, \square pH 7, \triangle pH 9.

The two-parameter and the three-parameter models give much better results, pretty similar between them as Fig. 4 shows. This affirmation is confirmed by the average errors of the two models: 14.83% and 12.91%, respectively. Nevertheless, looking at the residual values graphics for both two- and three-parameter models (Fig. 4) all predictions are in the ± 2 min range except two points obtained at pH 9. These two points belong to predictions for very similar gradient profiles; both correspond to the prediction of the retention of 2,4,6-tribromophenol under a 15-min, concave gradient pattern (the only difference between them is that one gradient pattern goes from 20% to 80% of acetonitrile while the other one only goes up to 60% of organic modifier; the point with higher deviation represents this last gradient). As Fig. 1B shows, these two gradient profiles keep the fraction of organic modifier very close to 20% for the first few minutes, so it can be assumed that these gradient elutions are very similar to an isocratic elution at a 20% of organic modifier. The curve representing retention vs. ϕ_w pH

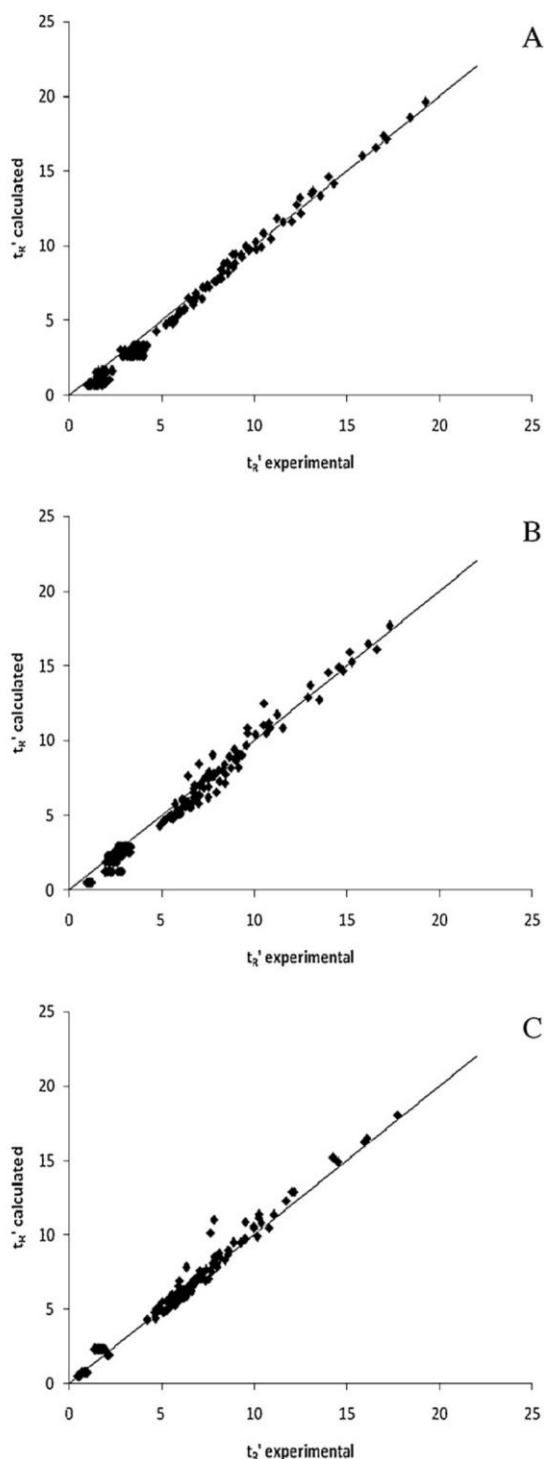


Fig. 5. Comparison of the 2-parameter model prediction for the three different pH values: (A) pH 5, (B) pH 7, and (C) pH 9.

for this compound at a 20% of acetonitrile (Fig. 2B) shows a difference of approximately 3 minutes between the fitting line and the actual retention time at $\frac{S}{W}$ pH 9 ($\frac{S}{W}$ pH = 8.76). The predictions of these two specific outliers give approximately the same absolute error than the fitting line and no significant difference is observed

in any other measurement involving this compound. Despite these outliers, both models seem to work in a very precise way.

To sum up, it can be concluded that the most accurate model is the one that depends on three parameters, but the fact that more parameters in the model imply more experimental work to do has to be taken into account. A balance between accuracy and required work must be found and, since the two-parameter model gives a very good relationship between accurate results and experimental work to be done, it seems to be the most useful among the three models tested. The one-parameter model is also useful when routine measurements have to be made, since predictions can be performed with just one injection of a compound.

Since the two-parameter model was chosen as the most useful for predictions, its results were grouped by the pH of the mobile phase to show the pH influence in fitting. The graphics are shown in Fig. 5, and they indicate that predicting retention times with this model is more reliable when working at an acidic pH value. The analyses at pH 5 give very good results; most of the points remain close to the theoretical line along the whole retention time range. Fig. 5 also shows good results at pH 7 and pH 9, but the dispersion seems to be slightly higher than the results at pH 5. The graphic indicates that there are slight differences between the retention times at pH 7 and that results are also pretty accurate at pH 9 except for the two points of the 2,4,6-tribromophenol previously discussed.

5. Conclusions

Several models have been tested to predict the retention time of 12 different ionizable compounds in acetonitrile-pH buffer gradient elution RP-HPLC under 16 different gradient patterns. A three-parameter expression, which had been already used before for neutral compounds, has been modified by means of the addition of a term that takes into account how the ionization of the analyte changes with the pH and composition of the mobile phase. After this addition, the model has been tested under a large amount of gradient patterns to predict the retention time of some ionizable compounds. The results obtained are very accurate, with no major deviations observed.

Two simplifications of this three-parameter equation, based on the *p* polarity parameter have also been tested. One of them, the two-parameter model, gives very good results under all conditions studied. The second simplification, a one-parameter equation, shows good results but with larger deviations for some cases. However, the use of this one-parameter equation requires very little experimental work to characterize the solutes when working with a previously characterized chromatographic system.

On the basis of the results obtained, it seems advisable to use the two-parameter model for predicting retention times as a general rule. If very accurate results are required, the use of the three-parameter expression is recommended. On the other hand, employing the one-parameter equation is strongly advisable when working with previously characterized systems; in fact, a single injection of the studied compound at just one mobile phase composition is enough to predict its retention under any gradient pattern, whereas the use of the other chromatographic models implies at least three injections. This reason makes the one-parameter model the most adequate one from a practical point of view if the implementation of a routine analysis plan is desired because the model gives more than acceptable predictions.

The two-parameter model, thought to be the most useful among the three models tested, proves to be valid for the entire pH range. Predictions seem to be more accurate when the analyses are performed at an acidic pH value (pH 5), but the predictions obtained when working at neutral and basic pH values (pH 7 and pH 9, respectively) also show good agreement with the experimental results.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union (project CTQ2010-19217/BQU) is acknowledged.

References

- [1] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1737.
- [2] P. Agrafiotou, C. Ràfols, C. Castells, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 4995.
- [3] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. De Galan, J. Chromatogr. 149 (1978) 519.
- [4] P. Wiczling, M.J. Markuszewski, M. Kaliszan, R. Kaliszan, Anal. Chem. 77 (2005) 449.
- [5] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 279.
- [6] P. Jandera, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 195.
- [7] U.D. Neue, H. Kuss, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3794.
- [8] A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chem. 81 (2009) 9135.
- [9] M. Rosés, X. Subirats, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1756.
- [10] G.W. Tindall, J.W. Dolan, LCGC North Am. 20 (2002) 1028.
- [11] C.F. Poole, The Essence of Chromatography, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2003.
- [12] P. Wiczling, R. Kaliszan, Anal. Chem. 80 (2008) 7855.
- [13] P. Wiczling, R. Kaliszan, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3375.
- [14] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, Anal. Chem. 77 (2005) 5670.
- [15] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 299 (1994) 219.
- [16] J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 85.
- [17] M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chim. Acta 274 (1993) 147.
- [18] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43 (2003) 1240.
- [19] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19.
- [20] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, Anal. Chim. Acta 515 (2004) 209.
- [21] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 170.
- [22] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5214.
- [23] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 163.
- [24] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 96.
- [25] J.M. Herrero-Martínez, P. Izquierdo, J. Sales, M. Rosés, E. Bosch, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3170.
- [26] J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3026.
- [27] J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6356.
- [28] C. Horváth, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Anal. Chem. 49 (1977) 2295.
- [29] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. 592 (1992) 157.
- [30] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, J. Chromatogr. A 656 (1993) 577.
- [31] M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 982 (2002) 1.
- [32] M. Rosés, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 283.
- [33] J.E. Hardcastle, I. Jano, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 717 (1998) 39.
- [34] D. Bolliet, C.F. Poole, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 368 (1998) 129.
- [35] P. Wiczling, R. Kaliszan, Anal. Chem. 82 (2010) 3692.
- [36] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 964 (2002) 55.
- [37] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5445.
- [38] F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Talanta 53 (2000) 667.
- [39] L. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, John Wiley and Sons, New York, 1997, p. 392.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Gradient retention prediction of acid–base analytes in reversed phase liquid chromatography: A simplified approach for acetonitrile–water mobile phases



Axel Andrés, Martí Rosés, Elisabeth Bosch*

Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2014
 Received in revised form 8 October 2014
 Accepted 12 October 2014
 Available online 25 October 2014

Keywords:

Retention models
 Ionizable analytes
 Gradient elution
 pK_a calculation
 RP-HPLC

ABSTRACT

In previous work, a two-parameter model to predict chromatographic retention of ionizable analytes in gradient mode was proposed. However, the procedure required some previous experimental work to get a suitable description of the pK_a change with the mobile phase composition. In the present study this previous experimental work has been simplified. The analyte pK_a values have been calculated through equations whose coefficients vary depending on their functional group. Forced by this new approach, other simplifications regarding the retention of the totally neutral and totally ionized species also had to be performed. After the simplifications were applied, new prediction values were obtained and compared with the previously acquired experimental data. The simplified model gave pretty good predictions while saving a significant amount of time and resources.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

High-performance liquid chromatography (HPLC) has become one of the most used analytical techniques nowadays because of its multiple utilities and applications. The most important factors involved in chromatographic elution are, for a particular column, composition and pH of the mobile phase and working temperature. One of the main modes in HPLC right now is gradient elution, an elution mode that changes the composition of the mobile phase during the chromatographic run and that, in turn, changes the pH of the mobile phase and the pK_a of the analyte since these two parameters depend on the mobile phase composition. Therefore, modeling retention of acids or bases becomes very complex and, to get a suitable equation to foresee retention, the previous modulation of the already mentioned parameters is needed [1,2]. Thus, controlling their effect on retention results in a big advantage in method development.

The literature shows efficient models that can predict gradient retention of compounds without acid–base properties, which retention depends only on the composition of the mobile phase [3–12]. Although it has been assessed to a much lesser degree, retention of ionizable analytes has also been studied [13,14].

Previous work in our research laboratory has established reliable chromatographic models to predict the retention time of monoprotic compounds regardless of the gradient pattern applied to it. Thus, three different prediction equations were tested with a set of 12 monoprotic compounds of different nature and successfully established as models to estimate the retention of monoprotic compounds in RP-HPLC gradient elution [15].

The aim of this work is to test some simplifications in order to predict retention of acid–base compounds in a simpler way, obtaining acceptable predictions from less experimental input data.

2. Theory

The previously tested models [15], based on the works from Nikitas and Pappa-Louisi [8,16,17] and Bosch, Rosés and collaborators [18–21], relate the retention of the analyte to the change of organic fraction of the mobile phase by means of a different number of adjustable parameters (one, two and three, respectively). All three models worked quite well when predicting the retention of compounds with acid–base properties under gradient elution, although the two-parameter model was recommended over the other two based on the relationship between accuracy in the predictions and experimental work to be done. This model follows Eq. (1):

$$\log k_{\varphi} = q + pP_m^N + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1)$$

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.
 E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

where $\log k_{\varphi}$ stands for the retention of the analyte, q and p are two fitting analyte dependent parameters [18] and P_m^N is the polarity of the mobile phase, which is related to the volume fraction of organic modifier in the mobile phase (φ). When acetonitrile is used as the organic modifier, the relationship between P_m^N and the mobile phase composition is determined through Eq. (2) [18]:

$$P_m^N = 1 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (2)$$

In Eq. (1), D is the ionization degree of the analyte (expressed as in Eq. (3)) and f is the relationship between the retention factors of the ionized and neutral form of the analyte [22] (expressed as in Eq. (4)).

$$D = \frac{1}{1 + 10^{i(\text{pH} - \text{pK}_a)}} \quad (3)$$

$$f = \left(\frac{k_A}{k_{HA}} \right)^i \quad (4)$$

In Eqs. (3) and (4), i is a parameter used by Kaliszan and collaborators that takes the value of +1 for monoprotic neutral acids and -1 for monoprotic neutral bases [14].

As stated previously, one of the key points in the development of Eq. (1) was the control of the variation of the analyte pK_a during gradient elution. Previously, in order to estimate this variation, isocratic pK_a values were determined separately through retention measurements at different pH values which were fitted to Eq. (5) [23–29]:

$$t'_R = \frac{t'_{R(HA)} + t'_{R(A)} \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (5)$$

where t'_R stands for the adjusted retention time. Charges of analyte species have been omitted for simplicity. In this equation, the pH and pK_a can be expressed in the universal scale (${}^s\text{pH}$, ${}^s\text{pK}_a$) or in the particular scale of the specific solvent used as the mobile phase organic modifier (${}^w\text{pH}$, ${}^w\text{pK}_a$) since the $\text{pH} - \text{pK}_a$ difference is the same for both scales [30]. The retention measurements were repeated at various mobile phase compositions and, finally, the isocratic pK_a values were adjusted to a second grade equation in order to obtain an expression that relates the evolution of the pK_a with the changes of mobile phase composition. Similarly, quadratic empirical equations were established for pH variation in the three tested buffered mobile phases along chromatographic runs [15].

Although this is an accurate way to model the pK_a variation, this experimental modeling requires a large amount of experimental work. Instead, a new approach based on the seminal work done by Chantooni and Kolthoff [31] and later developed in our laboratory [29,32,33] has been taken into consideration. In it, ${}^s\text{pK}_a$ values are estimated through an equation that takes into account the organic fraction of the mobile phase and shows different coefficients depending on the functional group of the analyte. Thus, the basis of this approach is that pK_a values of compounds showing a specific functional group (carboxylic acid, amine, etc.) change equally when the solvent composition changes (in this case, the organic modifier fraction in acetonitrile–water mixtures). Hence, changes in the mobile phase composition result in changes in ${}^s\text{pK}_a$ values according to Eqs. (6)–(8):

$${}^s\text{pK}_a = a_s {}^w\text{pK}_a + b_s \quad (6)$$

In Eq. (6), ${}^s\text{pK}_a$ is the pK_a value at any mobile phase composition, ${}^w\text{pK}_a$ is the pK_a value in pure water, a_s is a parameter related to the differences between specific solvation interactions (which, in turn, depend on the solvent and on the family of the compound) and b_s is related to the differences in basicities, dielectric constants and specific solvation interactions of the solute (hydrogen bonding,

for instance) between acetonitrile and water [32]. These last two parameters can be calculated through Eqs. (7) and (8):

$$a_s = \frac{1 + a_{s1}\varphi_{\text{MeCN}} + a_{s2}\varphi_{\text{MeCN}}^2}{1 + a_{s3}\varphi_{\text{MeCN}} + a_{s4}\varphi_{\text{MeCN}}^2} \quad (7)$$

$$b_s = \frac{b_{s1}\varphi_{\text{MeCN}} + b_{s2}\varphi_{\text{MeCN}}^2}{1 + b_{s3}\varphi_{\text{MeCN}} + b_{s4}\varphi_{\text{MeCN}}^2} \quad (8)$$

where φ_{MeCN} is the volume fraction of acetonitrile in the mobile phase and a_{s1} , a_{s2} , a_{s3} , a_{s4} , b_{s1} , b_{s2} , b_{s3} and b_{s4} are fitting parameters constant for all compounds with the same functional group [29,32]. Parameters were determined for aromatic carboxylic acids (differentiating between *ortho*-substituted aromatic carboxylic acids and the others), aliphatic carboxylic acids, phenols, amines and pyridines. This approach was only applied until up to 60% of acetonitrile for all functional groups except for pyridines, with which has been shown to work up to 100% thanks to the work by Pawlak [34]. More extended explanations about the development of Eq. (6) can be found in the literature [35–37].

However, working with ${}^s\text{pK}_a$ values is quite difficult because each value should have to be related to the pH scale of a specific water–acetonitrile mixture. Instead, the ${}^w\text{pK}_a$ values have been used. Conversion between ${}^s\text{pK}_a$ values into ${}^w\text{pK}_a$ values can be achieved through Eq. (9) [30,38–40]:

$${}^s\text{pK}_a = {}^w\text{pK}_a + \delta \quad (9)$$

In this expression, δ is a parameter related to the primary medium effect and to the difference between the liquid junction potentials of the electrode system in the mobile phase and water. Values for δ have been previously published for acetonitrile–water mixtures [30,33,40]. Then, ${}^w\text{pK}_a$ values could be obtained at any organic fraction of mobile phase just knowing the ${}^s\text{pK}_a$, a value that can be easily found [41–43].

In the present approach, the experimental retention values of pure ionized and neutral species obtained at extreme pH values (pH 2 and pH 11) [15] were used to calculate the f parameter by means of Eq. (4). Moreover, since the last term of Eq. (1) accounts for the ionization of the analyte and becomes zero for the neutral species, retention at extreme pH values at various mobile phase compositions also allowed the determination of the p and q parameters. In summary, among the high number of parameters involved in the present model (eight for pK_a and three for pH modeling, one for exchange between pK_a scales, two descriptors of the neutral species and also the ratio of retention factors of the pure species of the analyte) only three of them require previous experimental work. They are f , calculated by means of Eq. (4), and p and q obtained for neutral species by fitting retention vs. the mobile phase polarity according to Eq. (1).

3. Experimental

Retention data used for this study were previously measured [15]. Six different gradient patterns (two linear, two concave and two convex) were considered, all of them went from 20% to 60% of acetonitrile fraction in the mobile phase (Fig. 1). The gradient profiles were tested using three different initial mobile phase pH values: ${}^w\text{pH}$ 5 (acetate buffer), ${}^w\text{pH}$ 7 (phosphate buffer) and ${}^w\text{pH}$ 9 (ammonium buffer). Then, 18 independent measurements have been taken for each compound, which makes a total of 216 predictions studied.

Extreme pH values for the retention determination of the pure neutral and ionized species of the analytes were obtained using phosphoric acid (${}^w\text{pH}$ 2) and pyrrolidine (${}^w\text{pH}$ 11) aqueous buffers. From them, parameter f is calculated by Eq. (4). pK_a values should be computed by means of Eqs. (6)–(9). To solve the fundamental

equation for gradient elution, a continuous gradient formed in the mixer as a stepwise gradient formed by infinitesimal small time steps is considered [15,16,21].

4. Results and discussion

Two different retention prediction approaches are compared in this work. The former approach [15] is a methodology in which experimental isocratic retention values at various mobile phase compositions and several mobile phase pH values are measured to determine the parameters of Eq. (5): the $s_w pK_a$ value and the adjusted retention times ($t'_{R(HA)}$ and $t'_{R(A)}$) of each analyte. The $s_w pK_a$ values for each compound at several mobile phase compositions were fit into a second grade equation in order to model the evolution of the $s_w pK_a$ value along the gradient elution runs. The retentions of the neutral species of the analyte were used to calculate p and q , (Eq. (1)); the retention of the neutral and ionized species acquired at a 20% of acetonitrile were used to obtain the f parameter for each compound by means of Eq. (4).

The new approach proposed in this work is simpler. In it, $s_w pK_a$ values were calculated at any mobile phase composition through Eqs. (6)–(9). Single retention data obtained at 20% of acetonitrile and at a very acidic and a very basic pH (pH 2 and 11) were used in order to obtain the f parameter value (Eq. (4)). p and q parameters were calculated from retention data of the pure neutral form of the compound at three different mobile phase compositions (Eq. (1)). Thus, three potential sources of error should be considered when implementing this new approach: the modeling of the evolution of the pK_a values with the mobile phase composition, the determination of the f parameter and the determination of the analyte dependant parameters for the predicting model (p and q). Hence, an accurate evaluation of these variability sources has been performed.

A good, reliable modeling of the evolution of the pK_a values throughout the elution process becomes compulsory because slight pK_a variations could translate into significant errors in the predicted retention times. Since in the new approach the pK_a values are calculated instead of experimentally determined, a slight loss of accuracy in the estimation of the pK_a variation is expected. Fig. 2a and b shows the pK_a evolution from both experimental and calculated values for the studied acids and bases, respectively.

The correlation between the pK_a modeling using both approaches is right. However, Fig. 2a and b show several discrepancies in the evolution of the pK_a for some compounds. Fig. 2a shows that 2,4,5-trichlorophenol has a significant difference between the pK_a values at the beginning of the gradient, approximately one half of a pK_a unit. Hence, when the gradient elution runs in a pH

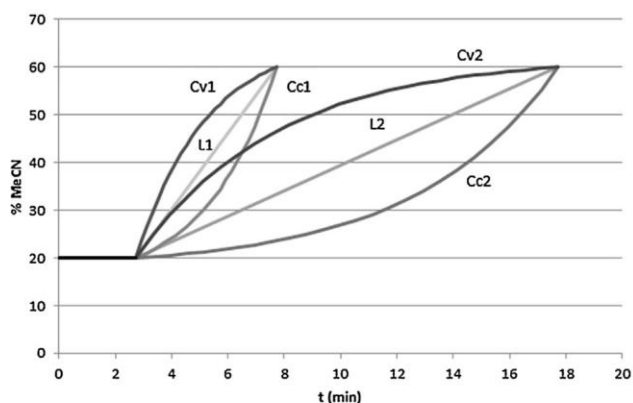


Fig. 1. Gradient profiles used in this work.

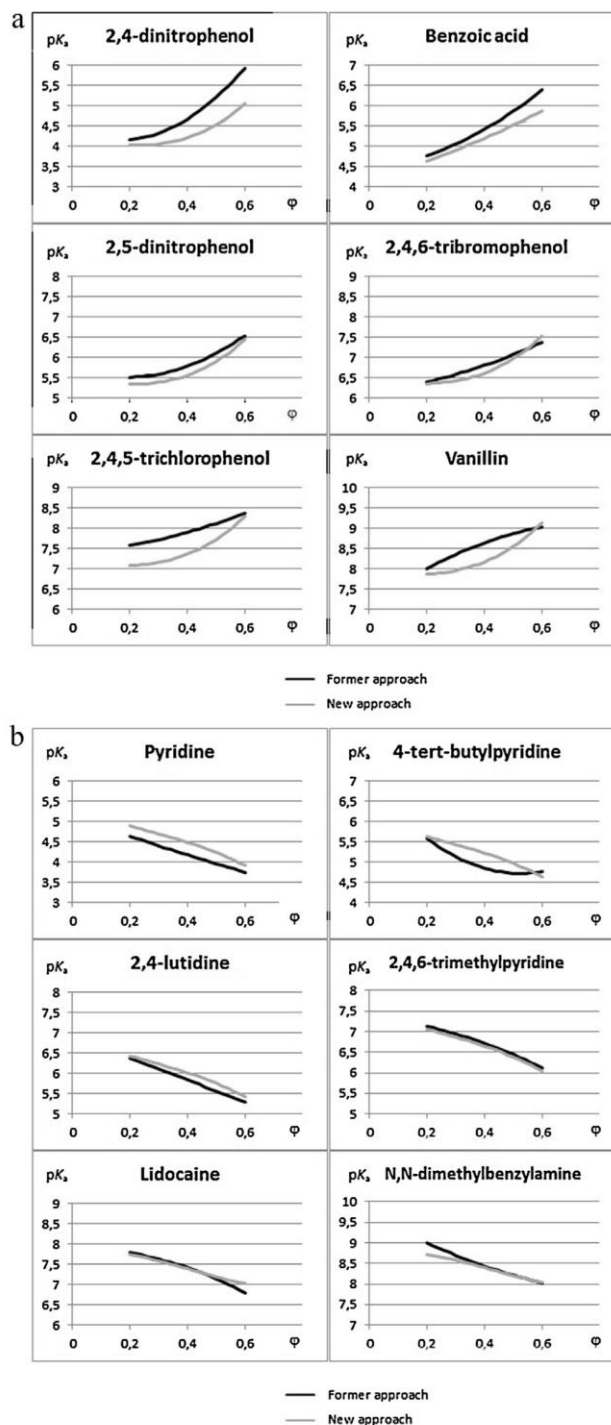


Fig. 2. (a) pK_a evolution with the mobile phase composition of the studied acids using the two different approaches for pK_a modelation. (b) pK_a evolution with the mobile phase composition of the studied bases using the two different approaches for pK_a modelation.

value close to the pK_a of the compound, a deviated prediction can be expected. If the shape of the gradient patterns is taken into account, concave gradient elutions (Fig. 1), which mostly remain in the mobile phase fractions where the difference between pK_a modeling approaches is more significant (from 0.2 to 0.4), could

Table 1

Values for the f parameter calculated through the two studied approaches, along with their ${}^w pK_a$ value.

Compound	${}^w pK_a$	Former approach	New approach
2,4-Dinitrophenol	4.09	0.125	0.079
Benzoic acid	4.20	0.064	0.050
2,5-Dinitrophenol	5.22	0.117	0.086
2,4,6-Tribromophenol	6.10	0.057	0.035
2,4,5-Trichlorophenol	6.72	0.033	0.032
Vanillin	7.40	0.060	0.040
Pyridine	5.25	0.102	0.120
4-tert-Butylpyridine	5.99	0.020	0.015
2,4-Lutidine	6.79	0.048	0.038
2,4,6-Trimethylpyridine	7.43	0.034	0.026
Lidocaine	7.95	0.017	0.003
N,N-Dimethylbenzylamine	8.91	0.033	0.018

originate a bigger difference between experimental and predicted retention than elutions from other gradient profiles. Fig. 2a also shows that 2,4-dinitrophenol has notable discrepancies between both modeling approaches, but the differences are noticeable at the end of the gradient and, since this analyte elutes before the gradient reaches these high organic fractions, the predictions should not be affected by these differences. On the other hand, Fig. 2b shows that pK_a modeling is very accurate in bases; both approaches give similar results at the starting point of the gradient elution except for N,N-dimethylbenzylamine and, apart from that, only 4-tert-butylpyridine shows a significant difference at around 0.4 of organic fraction, something that should not translate into relevant prediction errors. Therefore, with the only potential exception of N,N-dimethylbenzylamine, from a pK_a modeling point of view, no significant retention differences should be expected according to the estimation way for pK_a evolution among the basic compounds.

In the new approach, the f parameter determination is calculated from just one experimental retention value for each form of the compound instead of a fitting value determined through several isocratic measurements at different pH values, as the former approach would. Table 1 shows the calculated f parameter values as well as the ${}^w pK_a$ value of each compound as complementary information:

Both approaches give consistent values of the f parameter although the stated small differences can have a significant effect on the final predictions. Particularly, small inaccuracies in retention measurements at the ionized side of the retention/pH plots, when retention values are close to the hold-up time, might result in significant differences in f values. That is the case of 2,4-dinitrophenol. Besides, it has a ${}^w pK_a$ value of 4.09, which means that its ionization degree is very high whatever the mobile phase pH value is among those tested. Hence, the f parameter takes a considerable relevance in all tested gradients (Eq. (1)) so this substantial difference in f values can translate into a significant discrepancy in predicted retention times. The other relevant difference among f values is the one for lidocaine. Although the difference does not seem to be that much important, there is a difference of almost 2 min between the fitting retention value and the experimental input data (2.4 and 0.5 min, respectively) which leads to an f parameter approximately five times smaller than the one obtained using the former method. Such difference may also turn into significant differences between the predicted retention for both approaches when the analyte is completely ionized.

In the new approach, p and q parameters (Eq. (1)) have been calculated through single retention values at different mobile phase compositions instead of fitting values. Then, similar inaccuracies than the ones in the determination of the f parameter can be expected. It should be noticed that significantly inaccurate values of p and q could explain systematic errors for isolated compounds

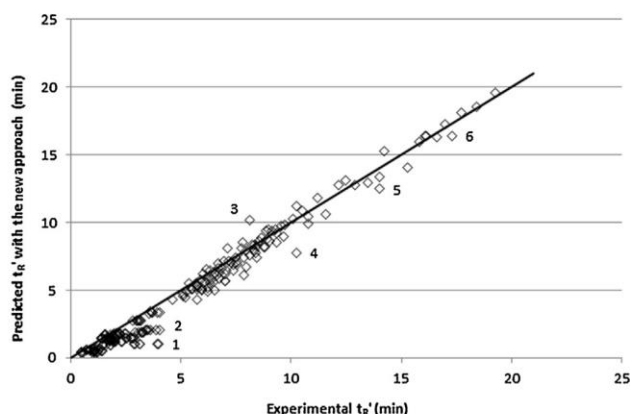


Fig. 3. Predicted retention data using Eq. (1) and the new approach vs. experimental retention data. Points correspond to: (1) B5, pH 5, several gradients, (2) A1, pH 5, several gradients, (3) B6, pH 9, Cc4 gradient (concave, 15 min), (4) A5, pH 9, Cc4 gradient (concave, 15 min), (5) A5, pH 7, L4 gradient (linear, 15 min), (6) A5, pH 7, Cc4 gradient (concave, 15 min).

in all gradients and mobile phase pH values tested, since these characteristic parameters define the retention of each compound.

To test this new approach, the predictions performed were plotted against the experimental adjusted retention times [15]; the distance to a theoretical line in which both retention times are equal enables to establish the accuracy of the predictions.

Fig. 3 shows that overall accuracy is very good and, except for some isolated points, the predictions remain quite close to the theoretical line for the entire plot. However, one special issue has to be assessed, and that would be the prediction of retention data between 0 and 4 min, which seems to be not as accurate as desired. This is exemplified in data point groups 1 and 2, which correspond to lidocaine and 2,4-dinitrophenol, respectively. As stated previously, the f parameter plays an important role in understanding why retention of totally ionized compounds, the most common form of compounds in this range of retention time, is not regularly well predicted. Thus, according to Eq. (1), the f parameter gains importance as the ionization degree increases so, taking into account that neutral compounds are quite well predicted, the accuracy of the f parameter value strongly determines the goodness of retention predictions when the compound is significantly ionized. In this specific case, points for lidocaine belong to pH 5 runs (group 1) and points for 2,4-dinitrophenol (group 2) belong to all mobile phase pH runs, all of them are cases where the analyte has a very high ionization degree. There are several points in each group because gradient profile does not matter here; in both cases the compound is predicted to elute before the dwell time of the system, which means that according to the prediction the retention of the analyte is not affected by the gradient pattern.

Point 3 in Fig. 3 belongs to N,N-dimethylbenzylamine, and can be explained through the variation between both approaches to the pK_a modeling. The slight but significant difference between both pK_a modelings at the starting point of the gradient pattern (Fig. 2b) results in an about 2 min prediction error when the Cc2 gradient is applied at pH 9, that is, a gradient profile that remains close to 20% of organic fraction for a long time and a mobile phase pH value close to the ${}^w pK_a$ of the analyte (8.91). However, for other pH values and gradient runs, the discrepancy in pK_a evolutions is irrelevant.

Fig. 3 also shows the retention of 2,4,5-trichlorophenol in points 5 and 6, which also can be explained through the variation in the pK_a modeling methodology. Predicted retention is lower than experimental retention in all gradients tested at pH 7, an expected circumstance since the compound has a ${}^w pK_a$ value of 6.72 which

is quite close to the mobile phase pH value, but L2 (point 5) and Cc2 (point 6) are the gradient patterns where the distance to the theoretical line is bigger. The difference between pK_a modelings that affected a good part of the chromatographic run explains the inaccuracy in the prediction of this compound under these conditions. On the other hand, the Cv2 gradient of 2,4,5-trichlorophenol under these conditions does not show a significant difference in retention since the convex profile of the gradient moves away quite quickly from the organic fraction zone where pK_a modelations differ the most.

Predictions have not been found systematically inaccurate for any specific compound, so it seems safe to say that the determination of the analyte dependent parameters p and q is good enough to perform predictions through Eq. (1). There are some other points that are not quite close to the line along the entire plot. These points usually come from totally ionized compounds where the predicting model does not work as good as when it is applied to compounds in their neutral form. Point 4 in Fig. 3 may be one of these cases.

Nevertheless, although not negligible, all these differences are not significant enough to affect the overall accuracy of the predicting model, which is very high taking into account the implemented simplifications. The distances to the theoretical line are very small in most cases moderate in the worst ones, so the model works quite nicely for the entire retention range above 4 min. It should be noticed that gradient time is very significant in retention and no unexpected retention is obtained for the shorter gradient profiles (L1, Cc1 and Cv1). Thus, it has been proved that the present simplified approach to the former prediction model [15] shows satisfactory results for acidic and basic compounds which pK_a lies in the 4–9 range.

5. Conclusions

Previous work showed the successful establishment of an experimental model that predicted the retention of acid–base analytes in RP-HPLC gradient elution using acetonitrile as the organic modifier. However, it required a significant amount of experimental work when modeling the evolution of the pK_a values throughout the gradient elution process. Then, a new approach based on the functional group of each analyte was proposed and tested in order to know if quicker predictions could be given without losing accuracy. The experimental data from previous work has been used.

The predictions using the simpler approach give very good results; predictions are quite accurate and have been performed without spending a significant amount of time on experimental work. Two factors have been carefully studied: the influence of the f parameter and the differences in the pK_a modeling. Even though the value of the f parameter obtained at 20% of organic modifier in the mobile phase is the best way to determine the parameter, it has been observed that there is an unavoidable experimental error in its determination for some compounds that caused slightly inaccurate predictions when the analyte is ionized. Evolution of the pK_a value during the elution process has been accurate for most compounds and, for those showing differences, the prediction of the retention has not affected the goodness of the model in a significant way.

Thus, it can be concluded that the recommended two-parameter model works quite well for neutral and partially ionized compounds when the new approach is used. On the other hand, the model loses accuracy when trying to predict retention of completely ionized compounds.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo

Regional of the European Union (project CTQ2010-19217/BQU) is acknowledged.

References

- [1] G.W. Tindall, J.W. Dolan, Mobile-phase buffers: Part I. The interpretation of pH in partially aqueous mobile phases, *LCCG North Am.* 20 (2002) 1028–1032.
- [2] C.F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2003.
- [3] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. De Galan, Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 519–537.
- [4] P. Jandera, J. Churacek, *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985.
- [5] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, New approach to linear gradient elution used for optimization in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 279–287.
- [6] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [7] F. Grietti, G. Guiochon, The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 79–91.
- [8] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *Retent. Mech. Chromatogr. Electrophor.* 1216 (2009) 1737–1755.
- [9] U.D. Neue, H.-J. Kuss, Improved reversed-phase gradient retention modeling, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3794–3803.
- [10] J. Ståhlberg, The thermodynamic limit of linear gradient chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3172–3179.
- [11] P. Agrafiotou, C. Ràfols, C. Castells, E. Bosch, M. Rosés, Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4995–5009.
- [12] 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.
- [13] P. Wiczling, R. Kaliszan, Influence of pH on retention in linear organic modifier gradient RP HPLC, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7855–7861.
- [14] P. Wiczling, R. Kaliszan, pH gradient as a tool for the separation of ionizable analytes in reversed-phase high-performance chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3692–3698.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, Optimization technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 283–289.
- [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] M. Rosés, E. Bosch, Linear solvation energy relationships in reversed-phase liquid chromatography: prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147–162.
- [20] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, Polarity parameters of the symmetry C_{18} and chromolith performance RP-18 monolithic chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 96–103.
- [21] 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.
- [22] D. Bolliet, C.F. Poole, M. Rosés, Conjoint prediction of the retention of neutral and ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 129–140.
- [23] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2295–2305.
- [24] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 157–182.
- [25] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, Modeling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 577–590.
- [26] J.E. Hardcastle, I. Jano, Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 39–56.
- [27] M. Rosés, E. Bosch, Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 1–30.
- [28] M. Rosés, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 283–298.
- [29] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography: XVI. Estimation of retention with acetonitrile/water mobile phases from aqueous buffer pH and analyte pK_a , *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 170–177.

- [30] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC: 5. pH scales and the retention of acids and bases with acetonitrile–water mobile phases, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5193–5200.
- [31] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, Resolution of acid strength in tert-butyl alcohol and isopropyl alcohol of substituted benzoic acids, phenols, and aliphatic carboxylic acids, *Anal. Chem.* 51 (1979) 133–140.
- [32] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography: 14. Acid-base pK_a values in acetonitrile–water mobile phases, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 55–66.
- [33] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 33–42.
- [34] Z. Pawlak, Solvent effects on acid-base behaviour acidity constants of eight protonated substituted pyridines in (acetonitrile + water), *J. Chem. Thermodyn.* 19 (1987) 443–447.
- [35] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Dissociation constants of neutral and charged acids in methyl alcohol: the acid strength resolution, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 309–324.
- [36] M. Rosés, F. Rived, E. Bosch, Dissociation constants of phenols in methanol–water mixtures, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 45–56.
- [37] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Acidity in methanol–water, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 315–333.
- [38] R.G. Bates, *Determination of pH: Theory and Practice*, Wiley, New York, 1964.
- [39] L. Sucha, S. Kotly, *Solution Equilibria in Analytical Chemistry*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1972.
- [40] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Delta conversion parameter between pH scales (s_pH and w_pH) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3180–3187.
- [41] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andrussov, *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Butterworths, London, 1961.
- [42] D.D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworths, London, 1965.
- [43] BioLoom online database: <http://www.davidhoekman.com/bio-loom/bin/details>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Prediction of the chromatographic retention of acid–base compounds in pH buffered methanol–water mobile phases in gradient mode by a simplified model



Axel Andrés, Martí Rosés, Elisabeth Bosch*

Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2014
 Received in revised form 16 January 2015
 Accepted 20 January 2015
 Available online 25 January 2015

Keywords:

Retention model
 Ionizable analytes
 Gradient elution
 RP-HPLC

ABSTRACT

Retention of ionizable analytes under gradient elution depends on the pH of the mobile phase, the pK_a of the analyte and their evolution along the programmed gradient. In previous work, a model depending on two fitting parameters was recommended because of its very favorable relationship between accuracy and required experimental work. It was developed using acetonitrile as the organic modifier and involves pK_a modeling by means of equations that take into account the acidic functional group of the compound (carboxylic acid, protonated amine, etc.). In this work, the two-parameter predicting model is tested and validated using methanol as the organic modifier of the mobile phase and several compounds of higher pharmaceutical relevance and structural complexity as testing analytes. The results have been quite good overall, showing that the predicting model is applicable to a wide variety of acid–base compounds using mobile phases prepared with acetonitrile or methanol.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

High-performance liquid chromatography is nowadays one of the most used separation techniques in analytical method development. Predicting retention models are powerful tools to foresee the separation conditions of compounds and to optimize the experimental work. However, there are many factors involved in gradient chromatographic elution (organic modifier, buffering agent, pH and composition of the mobile phase, elution mode and gradient profile and pK_a of the analyte among others) and taking all of them into account to predict chromatographic retention is not an easy task. Thus, the gradient retention prediction of compounds with acid–base properties becomes a significant analytical challenge.

Many studies assessing this topic have been published. Some of them explain the behavior of neutral compounds in gradient mode and show several ways to predict their retention [1–11], others describe the isocratic retention of compounds with acid–base properties emphasizing the significance of the ionization degree of the analyte when predicting its retention [12–15], and there are some other studies that combine both the elution in gradient mode and the elution of ionizable compounds [16–19]. Combination of these two features is quite complex because the mobile phase

composition changes throughout the elution process and can lead to a strong effect on the pH of the mobile phase and the pK_a of the analyte. Therefore, the ionization degree of the analyte changes in the course of its elution [20] and the extent of this variation depend on how close are the analyte pK_a and the mobile phase pH and, also, on how different is their variation during elution. Thus, modeling both the pH of the mobile phase and the pK_a of the analyte along the chromatographic run is mandatory to obtain good predictions [21]. In that sense, previously developed equations to model the pK_a evolution with the acetonitrile content of the mobile phase were used to build a useful prediction model of gradient retention [19,22].

2. Theory

The chromatographic model studied in this work is based on the publications from Nikitas and Pappa-Louisi [3–5,23] and Bosch and coworkers [8,19,22,24,25]. Three predicting models depending on one, two and three fitting parameters, respectively, allowing the successful retention prediction of neutral compounds in gradient elution were developed [8]. These models were later upgraded for the prediction of compounds with acid–base properties. Among them, the two-parameter one was recommended and used for all further predictions [19]. It is shown in Eq. (1):

$$\log k_{\varphi} = q + pP_m^N + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1)$$

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.
 E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

where $\log k_{\varphi}$ refers to the retention of the analyte, P_m^N is the polarity of the mobile phase (related to the volume fraction of organic modifier and determined differently for the different organic modifiers), and q and p are the two fitting parameters for the predicting model. Besides, D is the ionization degree of the analyte (related to the analyte pK_a and to the mobile phase pH) and f is the ratio between the retention factors of the pure ionized and pure neutral forms of the compound, as shown in Eqs. (2) and (3):

$$D = \frac{1}{1 + 10^{i(pK_a - \text{pH})}} \quad (2)$$

$$f = \left(\frac{k_A}{k_{HA}} \right)^i \quad (3)$$

In these equations, parameter i takes the value of +1 for acids and –1 for bases [17]. Charges of the analyte species have been omitted for simplicity.

Since the purpose of this model is predicting retention of acid–base compounds in gradient elution, a working mode that changes the composition of the mobile phase during the elution, controlling the changes in the pK_a of the different analytes is needed to obtain an accurate estimation of the ionization degree evolution during the chromatographic run. In that sense, a first experimental approach was tested using the well-known equation that considers the retention of ionized analytes as the average of the retention of their neutral and ionized species weighted by the molar fraction of each species in the mobile phase [19,26–29]. However, this approach turned out to be very time-consuming since many isocratic measurements at various pH values and different organic fractions had to be performed to obtain suitable pK_a values for every compound. In order to perform quicker predictions, experimental isocratic measurements were replaced by a pK_a estimation approach based on the work done by Chantooni and Kolthoff [30] and, afterwards, by Rived et al. [31–33]. This approach leads to Eq. (4):

$${}^s_w pK_a = a_s {}^w_w pK_a + b_s + \delta \quad (4)$$

where ${}^s_w pK_a$ and ${}^w_w pK_a$ refer to the analyte acidic constant, expressed in the absolute scale, in the mobile phase and in pure water, respectively, and a_s and b_s are parameters depending on the acid–base functional group of the analyte (with coefficients established for aromatic carboxylic acids, aliphatic carboxylic acids, phenols, amines and pyridines) [33]. Parameter δ stands for the primary medium effect modified according to the difference between the liquid junction potentials of the electrode system in the mobile phase and in pure water. It allows the transference to the ${}^s_w pK_a$ from ${}^s_p pK_a$ scale, which is the scale relative to the measuring solvent. The use of ${}^s_w pK_a$ and ${}^s_w \text{pH}$ scales involves an evident advantage when chromatographic gradient mode is used since each one of them is referred to a unique standard state along the whole chromatographic run, the infinite dilution of solute in pure water [34–38].

In addition, experimental retention values of pure ionized and pure neutral species obtained at extreme pH values (pH 2 and pH 11) were used to calculate the parameter f [Eq. (3)]. Retention values of the neutral form of the analyte at the suitable extreme pH and various mobile phase compositions were used for the determination of p and q parameters [Eq. (1)].

This approach was successfully tested using acetonitrile as the organic modifier [22]. In order to check whether the predicting model can be used in the present instance, coefficients for Eq. (4) proposed for methanol/water mixtures must be used. These coefficients were derived for a wide solvent composition range and allow a reliable ${}^s_w pK_a$ modeling up to 80% of methanol, the highest organic fraction for all tested gradient patterns [33,38]. Besides, Eq. (5) enables the determination of P_m^N [Eq. (1)] when methanol is used

as the organic modifier of the mobile phase [24] and φ stands for its volume fraction:

$$P_m^N = 1 - \frac{1.33\varphi}{1 + 0.47\varphi} \quad (5)$$

In summary, only two fitting parameters, p and q , are involved in the prediction model and they should be determined by fitting $\log k_{\varphi}$ vs. P_m^N , for the pure neutral species according to Eq. (1). Moreover, parameter f is derived from retention factors of the pure species of the analyte by means of Eq. (3). In this work, pH is modeled for the three used buffers according a quadratic equation. Other parameters (eight for pK_a evaluation plus δ values) are given in literature.

3. Experimental

3.1. Instrumentation

Chromatographic measurements have been performed on a Shimadzu HPLC system that consisted of two LC-20AD pumps, an SIL-20AUCHT auto-injector, an SPD-M10AVvp diode array detector and a CTO-10ASvp oven set at 25 °C. Mobile phase pH has been measured with a Crison 5014 combined electrode, connected to a pH meter GLP 22 potentiometer from Crison (Alella, Spain), with an accuracy of ± 0.002 in pH units. The chromatographic column used in this work is a Gemini 5 μm C₁₈ 110 Å column (4.6 \times 150 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). A Gemini C₁₈ (4 \times 3 mm) precolumn was used in order to extend the useful life of the column.

3.2. Chemicals

Gradient grade methanol was used in this work and was obtained from Prolabo (West Chester, PA, USA), Panreac (Barcelona, Spain) and Baker (Deventer, Netherlands). Double deionized water was obtained with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA), with a resistivity of 18.2 M Ω cm. The following chemicals have been used in the preparation of the different aqueous buffers: phosphoric acid and potassium hydrogen phosphate from Merck (Darmstadt, Germany), sodium acetate from Carlo Erba (Milano, Italy), ammonium chloride from Merck and pyrrolidine from Sigma (St. Louis, MO, USA), all compounds had analytical reagent grade or better. These chemicals were mixed with hydrochloric acid (p.a., Merck) or sodium hydroxide (p.a., Merck) solutions in order to obtain the exact desired ${}^w_w \text{pH}$. The concentration of all buffers was 10 mM. The chosen compounds, 10 acids and 10 bases, were obtained from Baker, Aldrich (Steinheim, Germany), Merck, Carlo Erba, Fluka or Sigma (reagent grade or better). They are listed in Table 1 along with their ${}^w_w pK_a$ values and Fig. 1 presents the pharmaceutical drugs which show more complex structures. Potassium bromide (p.a., Baker), and acetone (99.5%, Panreac) have also been used in this work.

3.3. Sample preparation

Samples were dissolved in pure methanol and brought to a concentration of 100 ppm, then were filtered through a 0.45 μm nylon filter.

3.4. Procedure

The hold-up time of the chromatographic system, including the precolumn, was determined by means of a solution of KBr as unretained solute at a concentration of 100 ppm and detected at 190 nm [39]. The dwell time of the system was determined with methanol and acetone as described [40]. Ten different gradient profiles have

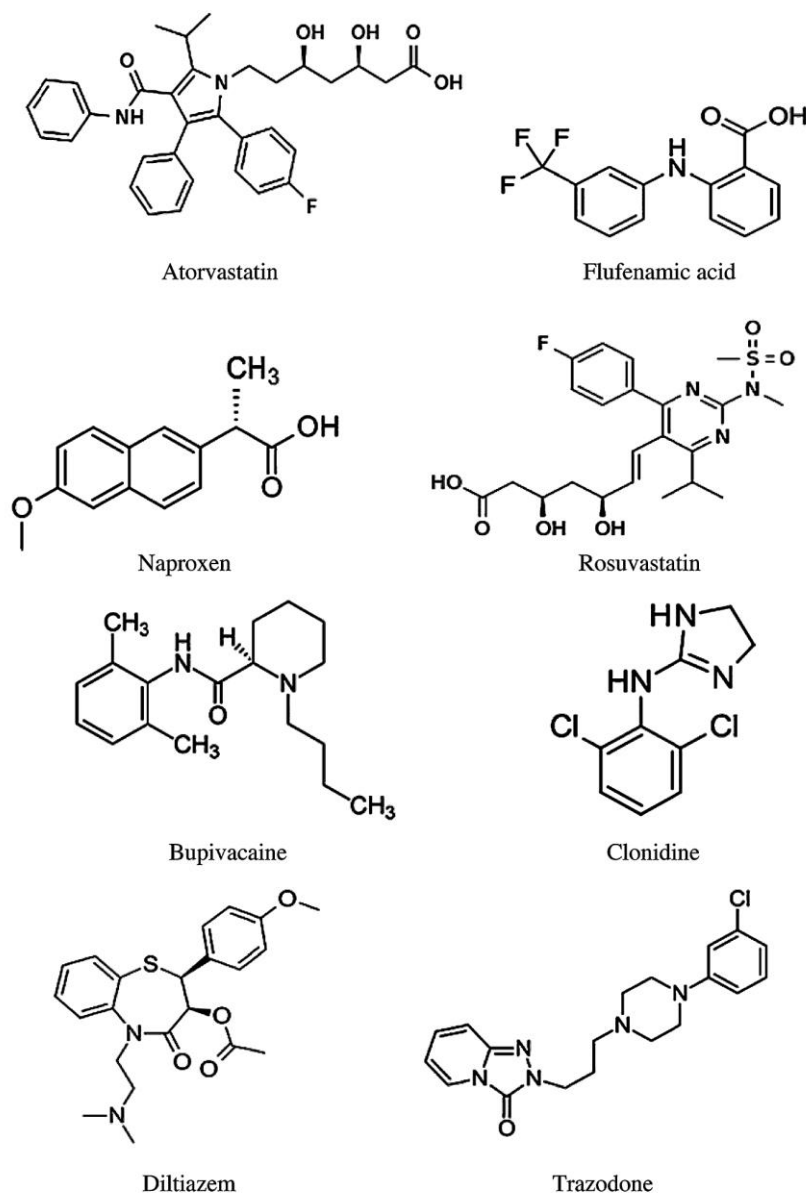


Fig. 1. Studied drugs.

been tested in this work: 2 linear, 2 concave, 2 convex and 4 combinations between them, all of them go from 20 to 80% of methanol (Fig. 2).

For all these gradient patterns, three different initial aqueous buffers (w_p pH 5, acetate buffer; w_p pH 7, phosphate buffer and w_p pH 9, ammonium buffer) were tested. The pH measurements were performed before the buffer was mixed with the organic modifier. In order to know how the w_p pH changed with the mobile phase composition, samples of mobile phase at different organic fractions were collected at the end of the chromatographic system, measured and fit to a second grade equation for each aqueous buffer. Coefficients and statistics for the derived equations are given in Table 2. Retention measurements for each compound at each pH and gradient profile were taken by duplicate.

Parameter f is calculated by Eq. (3) from retention measurements of the pure neutral and ionized species of the analytes in extreme pH values (w_p pH = 2 and w_p pH = 11, buffered by phosphoric

acid and pyrrolidine, respectively) at $\phi = 0.4$. w_p pK_a values were computed according to equations and coefficients given in literature [33,38]. To solve the fundamental equation for gradient elution, a continuous gradient created in the mixer as a stepwise gradient formed by infinitesimal small time steps is considered [4,8,19].

4. Results and discussion

To test the predicting model, a total of about 600 measurements were carried out and the experimental retention times were compared to the predictions performed through Eq. (1). Results are plotted in Fig. 3.

The correlations between the predicted and experimental retention times are quite good, with no major deviations observed along the entire plots. In fact, results depicted in Fig. 3 show that the proposed model predicts retention quite well with the errors statistically distributed, despite positive deviations ($t_{pred.} - t_{exp.}$) tend

Table 1
Studied compounds along with their w_pK_a value.

Compound	w_pK_a
2,4-Dinitrophenol	4.09
Benzoic acid	4.20
2,5-Dinitrophenol	5.22
2,4,6-Tribromophenol	6.10
2,4,5-Trichlorophenol	6.72
Vanillin	7.40
Pyridine	5.25
4- <i>tert</i> -Butylpyridine	5.99
2,4-Lutidine	6.79
2,4,6-Trimethylpyridine	7.43
Lidocaine	7.95
<i>N,N</i> -dimethylbenzylamine	8.91
Atorvastatin	4.04
Flufenamic acid	4.16
Naproxen	4.28
Rosuvastatin	4.44
Bupivacaine	8.10
Clonidine	8.05
Diltiazem	7.79
Trazodone	6.73

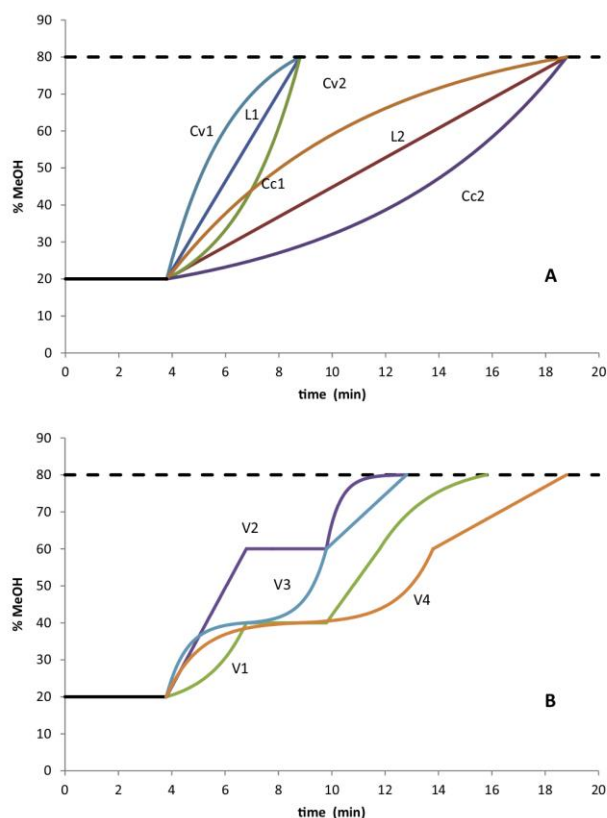


Fig. 2. Gradient patterns used in this work: (A) linear, concave and convex gradients, (B) varied gradients.

to be slightly higher than the negative ones. In any case, retention times of about 95% of measurements deviate less than 2 min from the experimental values and most of them, 85%, less than 1 min.

Nevertheless, some points show a slight inaccuracy. According to previous work [22], there are four different potential sources of error when using this predicting model: (a) the neutral analyte predicting model itself, i.e., the accuracy of the analyte dependent parameters, q and p [Eq. (1)]; (b) the modeling of the pH evolution with the mobile phase composition (Table 2); (c) the modeling of

the pK_a change with the mobile phase composition [Eq. (4)]; (d) the evaluation of the parameter f , i.e., the ratio between the retentions of the ionized and neutral analyte species [Eq. (3)]. It can be argued that p and q values are not necessarily the same for the neutral and ionized species of the analyte and their eventual differences might involve another source of error. However, the used model assumes that parameter q is affected by the analyte ionization according to f value (actually $\log f$) but p value is constant whatever the ionization degree of the analyzed compound. Thus, besides the already mentioned ones, no new sources of error have to be taken into account.

In this study, there is no evidence that calculations of q and p can be the reason of any inaccuracy since no significant deviations from the behavior foreseen by Eq. (1) ($\log k_f$ vs. P_m^N for the neutral species) for any compound have been found.

The modeling of the pH and pK_a evolution does not appear to affect seriously the accuracy of the predicting model because predictions for partially ionized compounds are mostly very accurate. In fact, Table 2 shows a very good fitting of pH experimental values with those calculated by the quadratic equations that model the pH evolution with the mobile phase composition for the three tested buffers. Moreover, the goodness of the pK_a modeling was expected since the used equations were widely tested in methanol/water binary mixtures and their robustness strongly confirmed [31–33]. However, the analysis of the results according to the mobile phase pH reveals that when basic or acidic mobile phases are used (pH 9 and 5) the results are excellent for any compound but for neutral mobile phases (pH 7) they are slightly worse, Fig. 3. It should be noticed that at basic pH all the acidic compounds are completely ionized whereas some bases remain in their neutral form but some others, *N,N*-dimethylbenzylamine and most of the tested basic drugs, change its ionization degree along the chromatographic run (see pK_a values shown in Table 1). Since acidity constants of protonated bases decrease with the methanol content in the same way than the buffer agent, ammonium, the difference between mobile phase pH and analyte pK_a remains almost constant along the whole run and, then, the D value too [Eq. (2)]. Thus, the applied gradient has only a slight effect on the analyte ionization degree, the second right hand term in Eq. (2) becomes almost constant and the actual retention mainly depends on the change of mobile phase polarity, P_m^N , associated to the gradient run. Similar reasons explain the retention results obtained at pH 5, where the acidic analytes are partially ionized and its dissociation degree of acids mimic the one of the buffer, acetic acid, and this fact results in small prediction errors for acids, as expected. The results also show that parameter D accounts very well for the variation of ionization changes experienced by *N,N*-dimethylbenzylamine, basic drugs with w_pK_a about 8, pyridine and 4-*tert*-butylpyridine along all the tested chromatographic runs, verifying in this way the goodness of the model. Predictions obtained at pH 7 are slightly worse. In this instance, both acidic and basic compounds change their ionization degree along the run, whereas the pK_a for acidic compounds imitates that of the buffering phosphoric acid [15], the opposite behavior is expected for protonated bases. Then, slight inaccuracies in the analyte pK_a modeling can result in small deviations to the equality line (Fig. 3). A more complete explanation about the effect of D evolution on the gradient retention of acidic and basic compounds was given in Ref. [18].

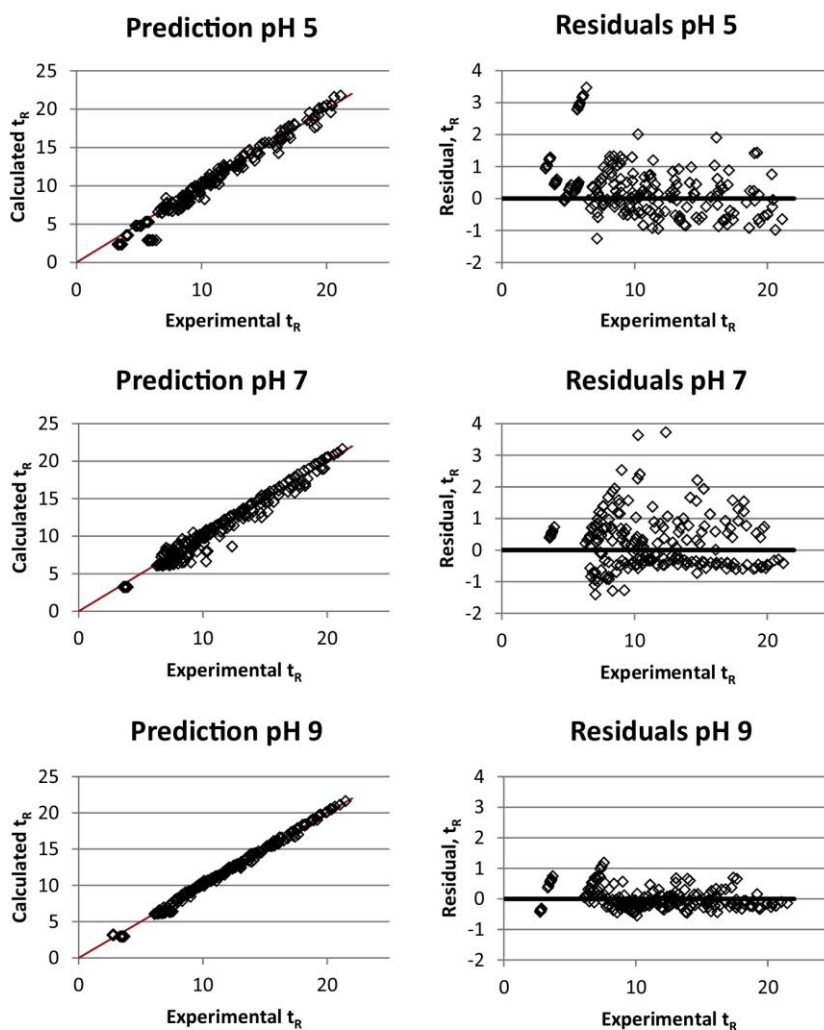
Thus, the determination of the parameter f seems to be the most significant source of inaccuracy regarding this prediction model. Previous work performed in acetonitrile containing mobile phases showed that the best way to determine the parameter f was through retention measurements at 20% of acetonitrile since

Table 2Fitting coefficients and statistics for the evolution of pH from 20 to 80% volume fraction of methanol, φ , in the mobile phase. (φ pH = $x_0\varphi^2 + x_1\varphi + x_2$).

φ pH buffer	x_0	x_1	x_2	R^2	s	F
5 (HAcO/AcO ⁻)	0.875	1.625	4.940	0.9984	0.045	313.7
7 (H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻)	2.437	0.582	7.212	0.9995	0.029	1101.8
9 (NH ₄ ⁺ /NH ₃)	-0.281	-0.361	9.018	0.9776	0.044	21.8

at low organic fractions, retention times are high enough and potential errors become small. Since the retention times at 20% of methanol exceeded the reasonable time threshold for chromatographic retention and because of the presence of methanol in the mobile phase origins longer retention times than acetonitrile, the parameter f was determined from measurements at a 40% of methanol, an organic fraction where retention values were long enough to get suitable f values. The most relevant inaccuracies in the predictions are shown in Fig. 3 as points 2 and 3 and the points group labeled by 1. They correspond to different compounds and different pH values but have in common that the ionization degree of the analyte for the measurements was very high along the entire gradient run in all three cases. As shown by Eq. (1), when D has a high value, the parameter f becomes very relevant in its prediction ability. Then, slightly erroneous f values result in somewhat inaccurate predictions for those

compounds. Data points 2 and 3 correspond to the elution at pH 7 of 2,4-dinitrophenol and 2,5-dinitrophenol, using a 15-min concave gradient. A difference between the estimated f value and its actual value becomes more important when the gradient profile stays close to 20% for most part of the chromatographic run, as concave gradients do, so it is expected that slight inaccurate values of the parameter f have a larger effect in this type of gradient profiles. Other gradient patterns also show some differences between predicted and experimental values but they are not as significant as these ones. Finally, data point group 1 belongs to clonidine at pH 5, a pH where the analyte is in its cationic species; it appears as a point group because no specific gradient has to be applied, because the chromatographic model predicts a retention time lower than the dwell time of the system. Then, the gradient pattern does not have any effect on the prediction of the retention.

**Fig. 3.** Predicted retention times plotted against experimental retention times and associated errors (in minutes).

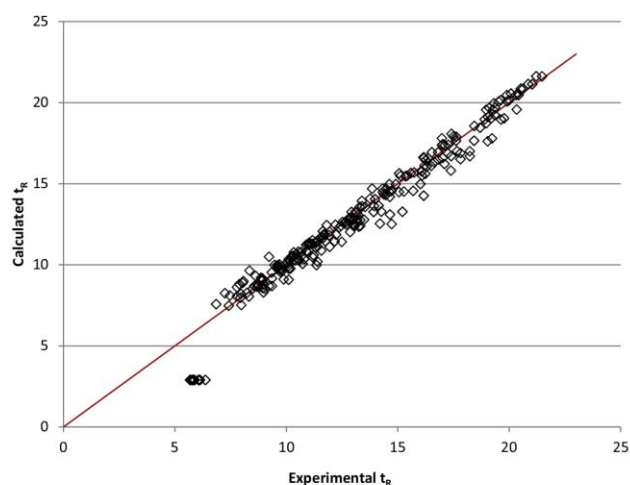


Fig. 4. Predicted retention times plotted against experimental retention times for some pharmaceutical drugs (in minutes).

In order to validate the proposed model for compounds of higher structural complexity and pharmaceutical interest (Fig. 1), Fig. 4 compares the predicted to the experimental retention isolating the corresponding data points from Fig. 3. It shows a fairly good evaluation of the accuracy of predictions.

The correlation between the two data sets is very good and, apart from the points belonging to clonidine already explained (data points group 1 in Fig. 3), there are no significant outliers. Besides, the way that points distribute along the equality line seems very similar to the distribution observed in Fig. 3, which means that the predicting model reacts in a similar way when applied to simple or more structurally complex compounds. Thus, it seems reasonable to point out that the predicting method works with a great accuracy regardless of the analyzed compound, something that proves the robustness of the chromatographic model.

5. Conclusions

A chromatographic model able to predict retention of acid–base analytes in RP–HPLC gradient elution was already tested and established. This model included an approach based on equations to evaluate the changes in the pK_a values of analytes throughout their gradient elution process in order to avoid the experimental work this step required. The predicting model showed a good overall accuracy. However, these studies were carried out using acetonitrile in the mobile phase. Then, in this work, the model has been tested using methanol as the organic modifier in order to extend its applicability.

The overall accuracy of the predicting model is quite good, among the 600 predictions of 20 solutes just a few points are significantly far from the equality line. The equations that model the pK_a evolution have displayed a very good behavior for all tested compounds in all gradient conditions and no significant errors can be attributed to a poor modeling of the pK_a values. Several compounds with higher structural complexity have been included in the studied set of substances in order to verify if the model is suitable for the common drugs. It has been demonstrated that the predicting model equally works for simple and complex analytes.

Acknowledgment

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo

Regional of the European Union (project CTQ2010-19217/BQU) is acknowledged.

References

- [1] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. De Galan, Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 519–537.
- [2] P. Jandera, J. Churacek, *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [3] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, New approach to linear gradient elution used for optimization in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 279–287.
- [4] 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.
- [5] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *Retent. Mech. Chromatogr. Electrophor.* 1216 (2009) 1737–1755.
- [6] U.D. Neue, H.-J. Kuss, Improved reversed-phase gradient retention modeling, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3794–3803.
- [7] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [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] 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.
- [10] 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.
- [11] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phase high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1930–1936.
- [12] D. Bolliet, C.F. Poole, M. Rosés, Conjoint prediction of the retention of neutral and ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 129–140.
- [13] M. Rosés, D. Bolliet, C.F. Poole, Comparison of solute descriptors for predicting retention of ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 29–40.
- [14] M. Rosés, E. Bosch, Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 1–30.
- [15] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC, pH scale in methanol–water and the pK and pH values of buffers, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3651–3657.
- [16] P. Wiczling, R. Kaliszan, Influence of pH on retention in linear organic modifier gradient RP HPLC, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7855–7861.
- [17] P. Wiczling, R. Kaliszan, pH Gradient as a tool for the separation of ionizable analytes in reversed-phase high-performance chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3692–3698.
- [18] I. Canals, K. Valkó, E. Bosch, A.H. Hill, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC.8. Influence of mobile-phase pH change on the chromatographic retention of acids and bases during gradient elution, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4937–4945.
- [19] 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.
- [20] G.W. Tindall, J.W. Dolan, Mobile-phase buffers, part I—the interpretation of pH in partially aqueous mobile phases, *LCGC North Am.* 20 (2002) 1028–1032.
- [21] C.F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [22] A. Andrés, M. Rosés, E. Bosch, Gradient retention prediction of acid–base analytes in reversed phase liquid chromatography: a simplified approach for acetonitrile–water mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1370 (2014) 129–134.
- [23] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, Optimization technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 283–289.
- [24] 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.
- [25] M. Rosés, E. Bosch, Linear solvation energy relationships in reversed-phase liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147–162.
- [26] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion–pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2295–2305.
- [27] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 157–182.
- [28] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, Modeling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 577–590.
- [29] M. Rosés, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 283–298.

- [30] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, Resolution of acid strength in tert-butyl alcohol and isopropyl alcohol of substituted benzoic acids, phenols, and aliphatic carboxylic acids, *Anal. Chem.* 51 (1979) 133–140.
- [31] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Dissociation constants of neutral and charged acids in methyl alcohol. The acid strength resolution, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 309–324.
- [32] M. Rosés, F. Rived, E. Bosch, Dissociation constants of phenols in methanol–water mixtures, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 45–56.
- [33] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Acidity in methanol–water, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 315–333.
- [34] C.L. DeLigny, M. Rehbach, The liquid-junction potentials between some buffer solutions in methanol and methanol–water mixtures and a saturated KCl solution in water at 25°, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 79 (1960) 727–730.
- [35] R.G. Bates, M. Paabo, R.A. Robinson, Interpretation of pH measurements in alcohol–water solvents, *J. Phys. Chem.* 67 (1963) 1833–1838.
- [36] R.G. Bates, *Determination of pH: Theory and Practice*, Wiley, New York, 1964.
- [37] L. Šúcha, S. Kotrlý, *Solution Equilibria in Analytical Chemistry*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1972.
- [38] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol–water mixtures, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 191–202.
- [39] F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Inorganic salts as hold-up time markers in C₁₈ columns, *Talanta* 53 (2000) 667–677.
- [40] L. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley, New York, 1997.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Review

Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients ($\log D$) from low drug amountsAxel Andrés^a, Martí Rosés^a, Clara Ràfols^{a,*}, Elisabeth Bosch^a, Sonia Espinosa^b, Víctor Segarra^b, Josep M. Huerta^b^a *Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*^b *Computational and Structural Drug Discovery Department, R&D Centre, Almirall S.A., Laureà Miró 408-410, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2015
 Received in revised form 8 May 2015
 Accepted 9 May 2015
 Available online 9 May 2015

Chemical compounds studied in this article:

Atenolol (PubChem CID: 2249)
 Salicylic acid (PubChem CID: 338)
 Metoprolol (PubChem CID: 4171)
 Caffeine (PubChem CID: 2519)
 Paracetamol (PubChem CID: 1983)
 Warfarin (PubChem CID: 54678486)
 Acetanilide (PubChem CID: 904)
 Haloperidol (PubChem CID: 3559)
 Ketoconazole (PubChem CID: 456201)
 Phenothiazine (PubChem CID: 7108)

Keywords:

Octanol–water partition
 Hydrophobicity
 Lipophilicity
 $\log D$
 $\log P_{o/w}$
 Shake-flask technique

ABSTRACT

Several procedures based on the shake-flask method and designed to require a minimum amount of drug for octanol–water partition coefficient determination have been established and developed. The procedures have been validated by a 28 substance set with a lipophilicity range from -2.0 to 4.5 ($\log D_{7.4}$).

The experimental partition is carried out using aqueous phases buffered with phosphate (pH 7.4) and n-octanol saturated with buffered water and the analysis is performed by liquid chromatography. In order to have accurate results, four procedures and eight different ratios between phase volumes are proposed. Each procedure has been designed and optimized (for partition ratios) for a specific range of drug lipophilicity (low, regular and high lipophilicity) and solubility (high and low aqueous solubility). The procedures have been developed to minimize the measurement in the octanolic phase.

Experimental $\log D_{7.4}$ values obtained from different procedures and partition ratios show a standard deviation lower than 0.3 and there is a nice agreement when these values are compared with the reference literature ones.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	182
2. Fundamentals of the procedures	183
2.1. Regular lipophilic compounds (Procedure 1)	183
2.2. Poorly lipophilic compounds (Procedure 2)	183
2.3. Highly lipophilic compounds (Procedures 1b and 3)	183
3. Experimental	184
3.1. Instrumentation	184
3.2. Chemicals	184
3.3. Procedures	184
4. Results and discussion	185
4.1. Test of proposed procedures and water/octanol volume ratios	185

* Corresponding author at: Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: crafols@ub.edu (C. Ràfols).

4.2. Precision and accuracy for the developed procedures	187
5. Conclusions.....	190
Acknowledgements	190
References	190

1. Introduction

Drug discovery is a relevant step in the development of new drugs. The common procedure is starting with a large number of new potential molecules, test them against biochemical targets and select the ones that show a significant activity, which may be considered as candidates for further development. The next stage in compound selection is identification of those which are more likely to be well absorbed and distributed in the human body and, although a considerable number of routes for absorption of drugs through membranes exist, transport by passive diffusion is the most common one. In order to be absorbed by this route, drugs must be lipophilic enough to penetrate the lipid cores of membranes, but not so lipophilic that they get stuck there (Comer, 2003). So lipophilicity, the measure of affinity of a drug for a lipid environment, has become a parameter of great importance in the pharmaceutical industry because it indicates the relationship of drugs with their biological, pharmacokinetic and metabolic properties (Hansch and Leo, 1979; Leo et al., 1971; Seydel and Schaper, 1981).

Lipophilicity can be measured by determination of the distribution of a drug between an organic solvent, generally n-octanol saturated with water, and an aqueous phase. The partition coefficient (P) refers to the ratio of compound concentration in each phase and can be determined experimentally by a variety of methods including the well-known shake-flask method (EPA, 1996; OECD 107 Method, 1995), potentiometric methods (Avdeef, 1993, 1992; Ráfols et al., 2012; Takács-Novák and Avdeef, 1996), chromatographic methods (Donovan and Pescatore, 2002; Kaliszan et al., 2002; Liang and Lian, 2015; OECD 117 Method, 2004; Pallicer et al., 2012, 2010; Wiczling et al., 2008) and others. Besides, lipophilicity can also be estimated using computer software and extensive studies about the accuracy of calculated $\log P$ values by different computer software has already been carried out (Chou and Jurs, 1979; Leo, 1987; Mannhold et al., 2009; Pallicer et al., 2014; Tetko et al., 2009). However, when an ionizable compound is equilibrated in a two-phase system at a pH at which it is partially ionized, its concentration in the organic and aqueous phases is directly related to the distribution coefficient (D), which is defined

as the ratio of the concentrations of both the ionized and unionized species of the compound in the organic and aqueous phases at a determined pH value (Scherrer and Howard, 1977). Both of these coefficients, P and D , are usually expressed through their logarithms as the most common way to represent lipophilicity. Then, for the general distribution coefficient

$$\log D = \log \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{water}}} \quad (1)$$

where C_{octanol} and C_{water} represent, respectively, the total drug concentration in the phase indicated in the subscript. The $\log D_{7.4}$ of a compound stands for its distribution coefficient at pH 7.4, and it is considered as a property of utmost importance because of its high physiological relevance and its resemblance to real biological partitions. Besides, it is accepted by most scientists as one of the most relevant lipophilicity descriptors to be applied in absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) studies (Avdeef, 2003; Comer, 2003; Kerns and Di, 2008). The guidelines about $\log D_{7.4}$ values and their implication for drug development are illustrated in Table 1 (Comer, 2003; Taylor and Triggle, 2007).

There are many different approaches which can be used to determine a partition coefficient experimentally (Avdeef, 1993; Donovan and Pescatore, 2002; Gulyaeva et al., 2008; Hitzel et al., n.d.; Kaliszan et al., 2002; Pallicer et al., 2012, 2010; Ráfols et al., 2012; Stopher and Mcclean, 1990; Takács-Novák and Avdeef, 1996; Valko et al., 2001; Wiczling et al., 2008), but the most direct one is the shake-flask method. In this method, an aqueous solution of a compound is mixed in a flask with an organic solvent (usually water saturated n-octanol). Then, the flask is shaken to equilibrate the sample between the two phases, and the phases are then separated. Afterwards, the concentration of analyte is measured in both phases. Because of its simplicity and clear relationship to the partitioning phenomenon, the shake-flask is the reference method against other ones when they have to be validated (Comer, 2003).

The well-known shake-flask procedure requires the appropriate selection of the volumes of solvents to employ and the accurate analysis of the solute in both phases. It is also necessary to pay attention to a number of other details if high accuracy is desired, details such as purity of solvents and solutes, solubility of compounds, quickness of the analytical method, formation of micro-emulsions that prevent phases from separating. These and other drawbacks regarding the shake-flask method have been previously discussed in the literature (Comer, 2003; Dearden and Bresnen, 1988; Leo et al., 1971; Purcell et al., 1973; Sangster, 1997; Valkó, 2000).

UV spectroscopy and HPLC techniques are most widely used to measure the concentration of the compound in each phase. HPLC offers some advantages such as it requires a smaller amount of compound for the measurement and impurities do not interfere because they are separated from the main component (EPA, 1996; Valkó, 2000). In any case, in order to reduce analysis time, and when no absorption of solute to vessel glass occurs, only one phase should be analyzed and the concentration in the other phase is obtained by difference (Leo et al., 1971). From this point of view, a throughput alternative to classic shake-flask determination has been developed (Valkó, 2000). The method is based on the use of sample chromatographic vials as containers performing both the

Table 1

$\log D_{7.4}$ values and their implications for drug development (adapted from reference (Comer, 2003; Taylor and Triggle, 2007)).

$\log D_{7.4}$	Implications for drug development
Below 0	Intestinal and CNS (central nervous system) permeability problems Susceptible to renal clearance
0–1	May show a good balance between permeability and solubility
1–3	Probably an optimum range for CNS and non-CNS orally active drugs Low metabolic liabilities Generally good CNS penetration
3–5	Solubility tends to become lower Metabolic liabilities tend to increase
Above 5	Low solubility and poor oral bioavailability Erratic absorption High metabolic liability, although potency may still be high

equilibration between phases and the analysis of the sample. A standard solution is used both for the initial compound concentration determination and for preparation of the partition solutions. To enhance the range of the lipophilicity that can be achieved, three different octanol/aqueous ratios (0.02; 0.2 and 2) were proposed. After equilibration, the aqueous phase is injected directly from the crimped vial to the HPLC system without a separation step. From the analysis of the first vial, the sample peak is identified and peak areas are calculated for all sample vials. The $\log D$ value is directly calculated by Eq. (2), which derives from Eq. (1)

$$\log D = \log \left(\left(\frac{A_{st}}{A_w} - 1 \right) \frac{V_w}{V_o} \right) \quad (2)$$

where A_{st} and A_w are, respectively, the peak areas of the standard and the aqueous phase of the partition and V_w and V_o the volumes of water and octanol of the partition. The method proposed was applied to $\log D$ determinations covering a range from -1.5 to 3.5 . A limitation of this method is the requirement of a reasonable aqueous solubility of the compound.

Based on the method above, the purpose of this work is to establish systematic experimental procedures able to perform accurate determinations of a wide variety of compounds covering a $\log D$ range between -2 and 4.5 . Moreover, this study tries to get closer to the needs of the pharmaceutical industries and provide them with simple procedures allowing fast routine lipophilicity determination using a very low drug amount and, eventually, using a DMSO solution of the drug instead of its solid form. This is because DMSO solutions of drugs are the usual way to keep the bioactive substances in compound libraries of most pharmaceutical companies.

2. Fundamentals of the procedures

Determination of $\log D$ values by the traditional shake-flask method requires the measurement of the compound concentration in octanol and water phases according to Eq. (1), after equilibration of both phases. Thus, Eq. (1) can be written as:

$$\log D = \log \left(\frac{m_o}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_o} \right) = \log \left(\frac{A_o}{A_w} \right) \quad (3)$$

where m stands for the mass of compound, V the volume of the phase and the subscripts w and o refer to water and organic phase, respectively.

The most precise measurements are obtained when amounts of drug in both phases are similar. It is evident that this fact depends not only on the particular $\log D$ of the compound, but also on the particular V_w/V_o ratio used in the shake-flask procedure, because

$$\log \frac{m_o}{m_w} = \log D - \log \frac{V_w}{V_o} \quad (4)$$

Fig. 1 presents the fraction of compound that remains in water phase after octanol equilibration according to its $\log D$ value and the particular phase ratio used. For $\log D$ values close to 0, the best results should be obtained when similar volumes of both phases are equilibrated. However, $\log D \ll 0$ would require $\log V_w/V_o \ll 0$ for precise results, but $\log D \gg 0$ would require $\log V_w/V_o \gg 0$. Thus, very hydrophilic or very hydrophobic compounds may require very low or very high V_w/V_o ratios which can be difficult and even impossible to handle. The main objective of this work is to set up appropriate volumes and volume ratio for measuring the $\log D$ of drug of different lipophilicity, according to the expected lipophilicity, as well as to develop alternative methods for a more practical measurement of $\log D$, especially for drugs with extreme $\log D$ values. The tested volumes and ratios, experimentally feasible, are proposed in Table 2.

The procedure described above requires the HPLC measurement of compound concentration in octanol and water phases. However, HPLC measurement in octanolic phases is very cumbersome. Octanol is a high viscosity solvent (Landolt-Börnstein IV/18B, n.d.) and the injection into a common HPLC column may require a hard and long time consuming cleaning of the column after use. Moreover, its high viscosity determines a low volatility (Sangster, 1997) which makes it an inappropriate solvent for mass spectrometry detection (MS) which is a very common detection technique in physico-chemical parameter determinations and in analytical drug development laboratories.

2.1. Regular lipophilic compounds (Procedure 1)

For the above reasons, Valkó (2000) proposed the use of the alternative procedure described in Section 1 involving the measurement of an aqueous standard solution which is later equilibrated with octanol. The $\log D$ value can be calculated from HPLC peak areas of the standard and aqueous phase solutions according to Eq. (1), which can be easily generalized to Eq. (5) if different volumes of the two measured solutions are injected

$$\log D = \log \left(\left(\frac{A_{st}}{A_w} \cdot \frac{v_{inj(w)}}{v_{inj(st)}} r - 1 \right) \frac{V_w}{V_o} \right) \quad (5)$$

where $v_{inj(w)}$ and $v_{inj(st)}$ are the injection volumes of the aqueous phase of the partition and the standard solution, respectively, and r the adequate dilution factor of the standard solution. Although the application range of Eq. (5) is the same as that of Eq. (3), the procedure avoids measuring octanol phases. The most precise results should be obtained for phase ratios close to the D values since when $\log V_w/V_o = \log D$, then $m_o = m_w = m_{st}$ for Eq. (4).

Of course, the right V_w/V_o ratio cannot be calculated because the $\log D$ value is not known. However, approximate lipophilicity of the test compound can be usually predicted and an approximate V_w/V_o value derived. Three shake-flask determinations are proposed: the first partition is done using the V_w/V_o ratio calculated from the expected $\log D$ value, and the second and third ones with a volume ratio much lower and much higher, respectively. Commonly, at least one of these determinations is precise enough. In principle, the problem of the procedure may come from drugs of very low or very high $\log D$ values which would require very low or very high V_w/V_o ratios.

2.2. Poorly lipophilic compounds (Procedure 2)

For very low $\log D$ values, the lowest feasible V_w/V_o ratios may not be enough to produce an appreciable partition into the octanolic phase and thus $A_w/v_{inj(w)} \sim A_{st}r/v_{inj(st)}$ and $\log D$ cannot be accurately determined from Eq. (5). In this case, the unique reliable alternative is measuring the octanolic phase, provided that the detector is sensible enough to measure A_o , and thus calculate $\log D$ according to Eq. (6) which would replace Eq. (5)

$$\log D = \log \frac{1}{\frac{A_{st}}{A_o} \cdot \frac{v_{inj(o)}}{v_{inj(st)}} - \frac{V_o}{V_w} r} \quad (6)$$

2.3. Highly lipophilic compounds (Procedures 1b and 3)

For compounds with very high $\log D$ values, Eq. (5) can be used if the detector is sensitive enough to determine A_w (which will be very small) for the prepared V_w/V_o ratios. However, in this instance, the problem of highly lipophilic compounds usually arises from their low aqueous solubility. In this case there are several possibilities. In some instances, solubility of the standard solution can be increased by adding a cosolvent such as DMSO, currently used to

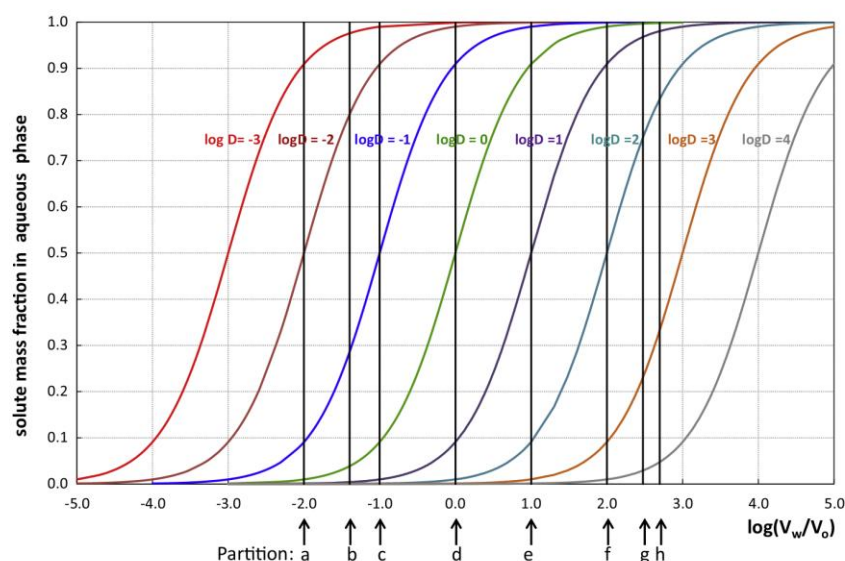


Fig. 1. Solute fraction remaining in the aqueous phase for different $\log D$ values after equilibration according to aqueous/organic phases volume ratio. a–h Partitions defined in Table 2.

Table 2

Volume ratios and volumes of aqueous (V_w) and octanolic (V_o) phases used for proposed partitions.

Partition	V_w (mL)	V_o (mL)	V_w/V_o	$\log V_w/V_o$
a	0.05	5	0.01	-2
b	0.2	5	0.04	-1.4
c	0.5	5	0.1	-1
d	0.5	0.5	1	0
e	1	0.1	10	1
f	1	0.01	100	2
g	3	0.01	300	2.5
h	5	0.01	500	2.7

enhance solubility in the drug discovery process (*Procedure 1b*). Eq. (5) can be used in this case. If the enhancement of the solubility by DMSO is not enough, an alternative procedure is to solve the sample in octanol, instead of water (*Procedure 3*). To increase the amount of the drug in the aqueous phase, this stock solution is directly equilibrated with the aqueous phase without any dilution. Later, the equilibrated aqueous phase and the stock solution, diluted by an r factor, are measured and $\log D$ can be calculated according Eq. (7)

$$\log D = \log \left(\frac{A_{st(o)}}{A_w} \cdot \frac{V_{inj(w)}}{V_{inj(st)}} r - \frac{V_w}{V_o} \right) \quad (7)$$

These developed procedures (summarized in Fig. 2) shall be tested in this work.

3. Experimental

3.1. Instrumentation

For HPLC measurements, a Shimadzu HPLC system has been employed; the system consisted of two LC-10ADVP pumps, a SIL-20AHC auto-injector, a SPD-M10AVP diode array detector (DAD), a CTO-10ASVP oven and a SCL-10AVP controller. The columns used have been a XTerra RP-18 (4.6×50 mm) column from Waters (Milford, MA, USA) and a Luna C18 column (4.6×50 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

For UPLC measurements, a Waters Acquity UPLC system with a Waters Acquity diode array detector has been used. The selected column has been a Waters Acquity UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$ (2.1×50 mm).

The pH values of water mobile phases have been measured with a Crison 5014 combined electrode, connected to a GLP 22 potentiometer from Crison (Alella, Spain), with an accuracy of ± 0.002 in pH units. The performed partitions have been shaken with a rotation shaker *movil-ROD* from Selecta (Abrera, Spain) in chromatographic vials (1.5 mL) or, when the partition volume exceeded the vial capacity, in closed test tubes.

3.2. Chemicals

Acetonitrile was 99.9% for HPLC, gradient grade, and has been obtained from Prolabo (West Chester, PA, USA). Double deionized water has been obtained with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA), with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Dimethyl sulfoxide from Sigma (St. Louis, MO, USA) and n-octanol from Merck (Darmstadt, Germany) have been also used in this work. A set of 28 compounds from Sigma, covering $\log D_{7.4}$ values from -2.0 to 4.5, has been chosen in order to carry out this study.

3.3. Procedures

A phosphate pH 7.4 aqueous buffer solution has been prepared and then saturated with n-octanol. Likewise, an n-octanol solution saturated with pH 7.4 aqueous buffer has been also prepared. The solubility of octanol in water at room temperature is very low but the one of water in octanol is fairly high (Sangster, 1997), so the saturation of both phases before preparing the partitions is mandatory. Both solutions have been heavily shaken and then left resting for at least 24 h to ensure complete separation of the two phases. Once the phases have been prepared, the developed procedures, which are summarized in Fig. 2, have been tested according to the estimated $\log D$ value and solubility of the compound. $\log D$ estimation can be performed by any of the available software packages, ACDlabs (ACD/Labs, 2012) in this work. Except for *Procedure 3*, all drugs have been prepared as 10 mM solutions in DMSO, which is taken as stock drug solution.

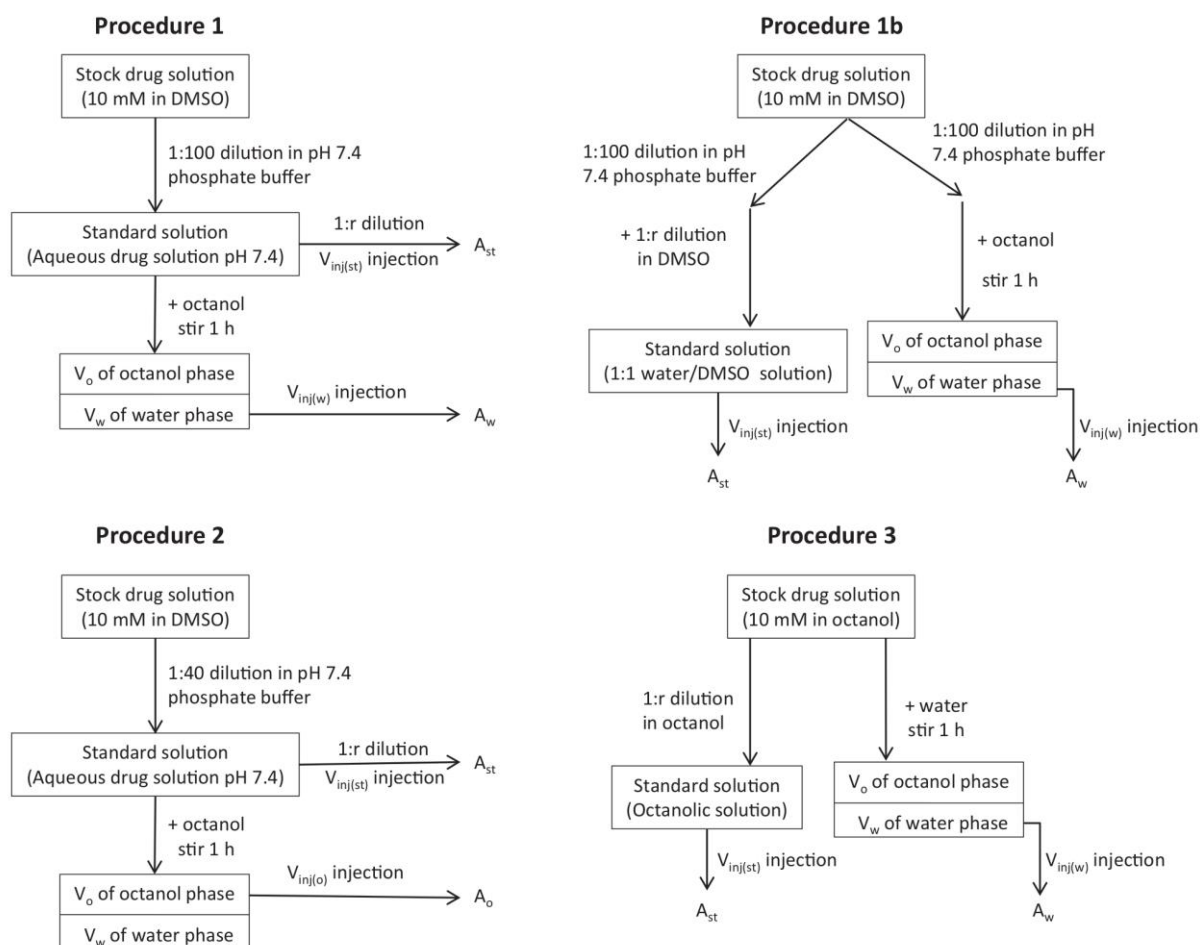


Fig. 2. Flow diagrams of the experimental procedures used in this work.

Procedure 1: The drug solution is diluted in the aqueous pH 7.4 phosphate buffer in a 1:100 volume ratio. This solution is taken as standard solution. From it, different partitions are made with different octanol/water ratios according to approximate $\log D_{7.4}$ value of the drug. Partitions are shaken for one hour at room temperature. Both the standard solution (conveniently diluted, r , if necessary) and the aqueous phase of each partition after equilibration are chromatographed for analysis.

Procedure 1b: This procedure is proposed for hydrophobic compounds which form a precipitate when the stock solution is diluted with aqueous phosphate buffer. In that case, the standard solution is prepared by dilution with DMSO (r , usually a dilution with $r = 2$ is enough) and chromatographed for analysis. Working partitions are performed in the same way as Procedure 1.

Procedure 2: For hydrophilic compounds, a standard solution is prepared by diluting the drug solution in the pH 7.4 phosphate buffer in a 1:40 volume ratio. From the standard solution, the different partitions are made with different octanol/water ratios according to approximate $\log D_{7.4}$ value of the drug. Partitions are shaken for one hour at room temperature. After equilibration, both the standard solution (diluted if necessary) and the octanolic phase of each partition are injected for chromatographic analysis.

Procedure 3: For hydrophobic compounds, the drug is dissolved in n-octanol saturated with aqueous buffer, and then different octanol/water partitions are performed according to the

approximate $\log D_{7.4}$ value of the drug. The standard solution is prepared by diluting the octanolic solution with water saturated n-octanol (according to the sensitivity of the chromatographic detector). Partitions are shaken for one hour at room temperature. Both the octanolic standard and the aqueous phase, after equilibration of each partition, are chromatographed for analysis.

Whenever possible three different partitions from Table 2 have been chosen for $\log D_{7.4}$ determination but in all instances at least two different partitions have been tested. For each partition two or more replicates have been done. Because agitation time is a parameter subject to optimization, the $\log D_{7.4}$ values of some selected compounds have been determined after shaking the partition vials during 1, 2 and 24 h. No significant differences have been found between the $\log D_{7.4}$ values obtained at different agitation times. Therefore, shaking the partitions for one hour has been considered enough agitation time to obtain accurate results in the shortest time possible.

4. Results and discussion

4.1. Test of proposed procedures and water/octanol volume ratios

14 compounds with $\log D_{7.4}$ values covering a range between -2 and 4.5 units have been selected to test the four procedures described in Section 3.3 (Fig. 2) and the proposed volume ratios

Table 3
Study of procedures and volume ratios with tested compounds.

Compound	Predicted ACDLabs ^a log $D_{7,4}$	Procedure	Partition	V_w/V_o	log V_w/V_o	Measured log $D_{7,4}$
Atenolol	-1.99	2	a	0.01	-2	-3.01 ± 0.78
		2	b	0.04	-1.4	-1.76 ± 0.11
		2	c	0.1	-1	-1.93 ± 0.29
		1	c	0.1	-1	-1.64 ± 0.07
		1	d	1	0	-0.58 ± 0.43
Salicylic acid	-1.09	2	a	0.01	-2	-2.31 ± 0.05
		2	b	0.04	-1.4	-1.77 ± 0.04
		2	c	0.1	-1	-1.98 ± 0.12
		1	c	0.1	-1	-1.78 ± 0.10
		1	d	1	0	-1.35 ± 0.31
		1	e	10	1	-0.41 ± 0.08
Metoprolol	-0.31	2	b	0.04	-1.4	-0.74 ± 0.03
		1	c	0.1	-1	-0.20 ± 0.10
		1	d	1	0	-0.35 ± 0.05
		1	e	10	1	-0.33
		1	f	100	2	- ^b
		Caffeine	-0.13	2	b	0.04
1	c			0.1	-1	-0.08 ± 0.01
1	d			1	0	0.00 ± 0.15
1	e			10	1	-0.13
1	f			100	2	- ^b
Paracetamol	0.34	2	b	0.04	-1.4	1.07 ± 0.01
		1	c	0.1	-1	0.25 ± 0.01
		1	d	1	0	0.42 ± 0.03
		1	e	10	1	0.53 ± 0.20
		1	f	100	2	1.55 ± 0.17
		Warfarin	0.62	1	c	0.1
1	d			1	0	0.83 ± 0.21
1	e			10	1	0.86 ± 0.18
1	f			100	2	1.04 ± 0.09
Acetanilide	1.08			1	c	0.1
		1	d	1	0	1.21 ± 0.01
		1	e	10	1	1.20 ± 0.01
		1	f	100	2	1.17 ± 0.09
		Acetophenone	1.66	1	d	1
1	e			10	1	1.58 ± 0.30
1	f			100	2	1.54 ± 0.11
1	g			300	2.5	1.61 ± 0.29
1	h			500	2.7	1.52 ± 0.21
Haloperidol	2.18			1	d	1
		1	e	10	1	2.04 ± 0.26
		1	f	100	2	2.53 ± 0.06
		1	g	300	2.5	2.94 ± 0.12
		1	h	500	2.7	3.08 ± 0.09
Butyrophenone	2.73	1	d	1	0	2.37 ± 0.06
		1	e	10	1	2.46 ± 0.02
		1	f	100	2	2.73 ± 0.31
		1	g	300	2.5	2.68 ± 0.16
		1	h	500	2.7	2.83 ± 0.16
Valerophenone	3.26	1	d	1	0	2.16 ± 0.14
		1	e	10	1	2.86 ± 0.02
		1	f	100	2	3.30 ± 0.15
		1	g	300	2.5	3.38 ± 0.17
		1	h	500	2.7	3.47 ± 3.28
Ketoconazole	3.43	1	f	100	2	2.02 ± 0.53
		1	g	300	2.5	3.50 ± 0.16
		1	h	500	2.7	3.32 ± 0.21
Phenothiazine	4.15	1	g	300	2.5	3.86 ± 0.43
		1b	g	300	2.5	3.85 ± 0.13
		3	g	300	2.5	4.21 ± 0.18
		1	h	500	2.7	3.84 ± 0.15
		1b	h	500	2.7	4.05 ± 0.01
		3	h	500	2.7	4.01 ± 0.24
Anthracene	4.68	1	g	300	2.5	3.47 ± 0.68
		1b	g	300	2.5	3.99 ± 0.06
		3	g	300	2.5	4.52 ± 0.21
		1	h	500	2.7	3.83 ± 0.50
		1b	h	500	2.7	4.24 ± 0.15
		3	h	500	2.7	4.60 ± 0.11

Shaded values are those that do not fall within 0.3 logarithmic units range.

^a From reference (ACD/Labs, 2012).

^b Cannot be determined.

(Table 2). Procedures and volume ratios tested for each substance have been chosen according to its predicted hydrophobicity and they are shown in Table 3 as well as the obtained $\log D_{7.4}$ values. These predicted values have been obtained through the ACDLabs software (ACD/Labs, 2012) and are only used to give a previous estimation of the lipophilicity which, therefore, allow choosing the proper partitions. The accepted dispersion of results to assure a precision good enough when different experimental conditions are involved in the measurement is ± 0.3 logarithmic units (EPA, 1996). Then, and if all the partitions and procedures chosen work well, all the $\log D_{7.4}$ values obtained for each tested compound should not present a difference greater than 0.3 logarithmic units. Shaded with grey color are those that do not fall within the 0.3 logarithmic units range indicating that these partitions and/or procedures are not suitable for the tested compounds.

It is considered that compounds with intermediate hydrophobicity are those with $\log D$ values between 0 and 2.5. Fig. 1 shows that these compounds need volume ratios between $\log(V_w/V_o) - 1.0$ (partition **c**) and 2.7 (partition **h**) to have between 10% and 90% of the solute in aqueous and organic phases after equilibration. Then, partitions from **c** to **h** have been tested with compounds which predicted $\log D_{7.4}$ ranges between -0.13 (caffeine) and 2.73 (butyrophenone).

The results obtained (Table 3) are in concordance with Fig. 1 and show that when $\log D_{7.4}$ value increases, partitions with low volume ratio do not provide results good enough and partitions with higher volume ratio must be used. Although Fig. 1 shows that the lowest volume ratio recommended to obtain robust $\log D$ values is the one that implied a 10% of solute mass in aqueous (or octanolic) phase after equilibration, in fact this limit depends on the detector used for quantification. When a spectrophotometric detector is used, the lowest limit of any partition depends not only on its sensitivity but also on the absorptivity of the drug. Then, acetanilide, which has a high absorptivity, can be well detected using partition **c** although only about 1% of substance remains in aqueous phase after the equilibration step. However, haloperidol, which presents low absorptivity, cannot be well detected when about 10% of the substance remains in aqueous solution after equilibration, that is, when **f** partition is involved in the experimental procedure.

Although partition **e** with Procedure 1 has been used to determine $\log D_{7.4}$ for caffeine and metoprolol, it is in the lowest $\log D$ limit of applicability. On the other end, partition **b** with Procedure 2 has also been tested despite it involves a very low aqueous volume, V_w , difficult to inject properly in the chromatographic system. Thus, Procedure 2, where the octanolic phase is injected, has been applied and Eq. (6) used to calculate $\log D_{7.4}$ values. As shown in Table 3, partition **b** with Procedure 2 does not work well with caffeine or metoprolol because less than 5–8% remain in aqueous phase after equilibration (see Fig. 1), this is a 95–92% of the drug partition to octanol phase and because $A_{st} \cdot F / V_{inj(st)} \sim A_o / v_{inj(o)}$, $\log D$ cannot be accurately determined. Nevertheless the Procedure 2 and partition **b** in tandem is suitable for $\log D$ determinations lower than -1 , such as for atenolol or salicylic acid. Although $\log D_{7.4}$ value obtained with this partition is lower than the one predicted for salicylic acid, it is consistent to the one obtained from Procedure 1 and partition **c**, which are also suitable for this type of compounds, and very close to the one reported in the literature, -1.65 (Biobyte Corp.1995–2006, n.d.). In order to obtain robust $\log D_{7.4}$ values for the most hydrophilic compounds partition **c** with Procedure 2 has been also performed and no significant differences have been observed with the $\log D_{7.4}$ obtained with the same partition applying Procedure 1.

Because of the low solubility of the most hydrophobic compounds ($\log D > 3.5$), Procedure 1b and Procedure 3 have been also tested using partitions **g** and **h**. Table 3 shows the $\log D_{7.4}$ values for phenothiazine and anthracene. For both substances the

$\log D_{7.4}$ values obtained from Procedure 1 are lower than the expected ones whereas those from Procedure 3 agree with the literature (Biobyte Corp.1995–2006, n.d.). It should be noticed the consistency among values obtained using Procedure 1b (partition **h**) and Procedure 3 (partitions **g** or **h**) despite the first one involves a significant amount of DMSO in the standard solutions (see Table 3). Thus, the effect of DMSO on measured $\log D_{7.4}$ seems to be negligible. This assumption is confirmed by results shown in Table 5 for hexanophenone and heptanophenone, compounds not included in Table 3.

According to the results given in Table 3, different procedures and volume ratios are proposed for compounds covering a wide range of lipophilicity, as summarized in Table 4.

4.2. Precision and accuracy for the developed procedures

The recommendations proposed in Table 4 have been applied to determine the $\log D_{7.4}$ value of 28 drugs, including the 14 already analysed, within the $\log D_{7.4}$ range between -1.9 and 4.5. Table 5 shows the results obtained when two different systems (HPLC and UPLC both with DAD detector) are used to quantify the solute present in aqueous (or octanolic) phase after equilibration. The obtained results have been compared with the $\log D_{7.4}$ values recommended in BioLoom database or when there is no recommended value with the average of the BioLoom values collected at pH 7.4 (Biobyte Corp.1995–2006, n.d.).

At least two different aqueous/octanol volume ratios have been used in all cases and for each ratio three or more determinations have been done. The mean values and their standard deviation shown in Table 5 correspond to the ones computed using all the obtained individual values. When a HPLC–DAD system has been used, the standard deviation for all the compounds is lower than 0.3 log units, in accordance with the EPA guidelines for reliable values (EPA, 1996). Eq. (8) shows the correlation between determined $\log D_{7.4}$ values and the experimental values recommended by the BioLoom database (Biobyte Corp.1995–2006, n.d.).

$$\log D_{7.4}(\text{HPLC}) = 0.99(\pm 0.01) \log D_{7.4}(\text{BioLoom}) - 0.01(\pm 0.03) \\ n = 25 \quad r^2 = 0.99 \quad \text{SD} = 0.13 \quad F = 4716 \quad (8)$$

The slope of this correlation is not significantly different from 1 and the intercept from 0 for a 95% confidence level. Thus, it can be

Table 4
Partitions and shake-flask procedures proposed for $\log D$ determination.

$\log D$ range	Partitions	Procedure	Equation	Observations
$\log D < -1$	b, c	2	(6)	Partition d only for $\log D$ values higher than -1.5
	c, d	1	(5)	
$-1 < \log D < 0$	c, d	1	(5)	
$0 < \log D < 1.5$	c, d, e	1	(5)	Partitions d and e might be used for higher $\log D$ values if a more sensible detector is used.
$1.5 < \log D < 3.0$	f, g, h	1	(5)	For high $\log D$ values the suitability of partition f depends on the sensitivity of the detector.
$3.0 < \log D < 3.5$	g, h	1	(5)	
$\log D > 3.5$	g, h	3	(7)	Procedure 1 could be used if no solubility problems are detected
	h	1b	(5)	

Table 5
log $D_{7,4}$ for a set of 28 compounds.

Compound	log $D_{7,4}$ BioLoom database ^a	Procedure	Partition	HPLC–DAD		UPLC–DAD	
				log $D_{7,4}$	Average	log $D_{7,4}$	Average
Atenolol	–1.94	2	b	–1.76 ± 0.11	–1.81 ± 0.23		
		2	c	–1.93 ± 0.29			
		1	c	–1.64 ± 0.07			
Salicylic acid	–1.65 ± 0.59	2	b	–1.77 ± 0.04	–1.85 ± 0.14	–	–1.43 ± 0.11
		2	c	–1.98 ± 0.12		–	
		1	c	–1.78 ± 0.10		–1.43 ± 0.11	
Benzoic acid	–1.43	2	b	–1.37 ± 0.19	–1.27 ± 0.15	–1.37 ± 0.01	–1.27 ± 0.19
		1	b	–		–1.34 ± 0.03	
		1	c	–1.22 ± 0.07		–1.32 ± 0.18	
		1	d	–1.26 ± 0.20		–1.01 ± 0.07	
Metoprolol	–0.15 ± 0.24	1	c	–0.20 ± 0.10	–0.28 ± 0.10	–0.38 ± 0.02	–0.33 ± 0.06
		1	d	–0.35 ± 0.05		–0.29 ± 0.05	
Caffeine	–0.07	1	c	–0.08 ± 0.01	–0.04 ± 0.12	–0.04 ± 0.01	–0.03 ± 0.01
		1	d	0.00 ± 0.15		–0.03 ± 0.01	
		1	e	–		–0.01 ± 0.02	
Theophylline	–0.02	1	c	–0.12 ± 0.04	–0.03 ± 0.09	–0.02 ± 0.01	–0.01 ± 0.03
		1	d	0.03 ± 0.06		0.02 ± 0.02	
		1	e	–		–0.03 ± 0.03	
Procaine	0.23	1	c	0.26 ± 0.15	0.28 ± 0.17	0.27 ± 0.06	0.29 ± 0.05
		1	d	0.30 ± 0.21		0.31 ± 0.04	
		1	e	–		0.28 ± 0.01	
Paracetamol	0.51	1	c	0.25 ± 0.01	0.39 ± 0.13	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02
		1	d	0.42 ± 0.03		0.34 ± 0.01	
		1	e	0.53 ± 0.20		0.32 ± 0.02	
Warfarin	0.88 ± 0.28	1	c	0.74 ± 0.21	0.83 ± 0.19	0.96 ± 0.03	0.91 ± 0.05
		1	d	0.83 ± 0.21		0.90 ± 0.04	
		1	e	0.86 ± 0.18		0.88 ± 0.02	
Colchicine	1.30	1	c	0.91 ± 0.01	1.09 ± 0.05	1.14 ± 0.04	1.15 ± 0.03
		1	d	1.16 ± 0.15		1.14 ± 0.02	
		1	e	1.04 ± 0.01		1.16 ± 0.01	
Acetanilide	1.16	1	c	1.15 ± 0.01	1.19 ± 0.05	1.18 ± 0.06	1.19 ± 0.04
		1	d	1.21 ± 0.01		1.18 ± 0.01	
		1	e	1.20 ± 0.01		1.21 ± 0.02	
		1	f	1.17 ± 0.09		–	
Propranolol	1.24 ± 0.15	1	c	1.30 ± 0.04	1.23 ± 0.05	1.22 ± 0.02	1.22 ± 0.06
		1	d	1.24 ± 0.02		1.22 ± 0.08	
		1	e	1.19 ± 0.01		1.23 ± 0.08	
Lidocaine	1.53 ± 0.26	1	d	1.47 ± 0.33	1.61 ± 0.26	1.80 ± 0.07	1.70 ± 0.19
		1	e	1.57 ± 0.13		1.78 ± 0.12	
		1	f	1.92 ± 0.01		1.71 ± 0.11	
		1	g	–		1.58 ± 0.31	
		1	h	–		1.73 ± 0.09	
Acetophenone	1.58	1	d	1.58 ± 0.13	1.57 ± 0.16	–	1.55 ± 0.16
		1	e	1.58 ± 0.30		–	
		1	f	1.54 ± 0.11		1.52 ± 0.10	
		1	g	1.67 ± 0.29		1.55 ± 0.09	
		1	h	1.52 ± 0.21		1.60 ± 0.12	
Hydrocortisone	1.61	1	d	1.54 ± 0.10	1.58 ± 0.12		
		1	e	1.54 ± 0.13			
		1	f	1.67 ± 0.06			
Propiophenone	2.19	1	d	2.14 ± 0.16	2.24 ± 0.16	–	1.98 ± 0.19
		1	e	2.37 ± 0.17		–	
		1	f	2.17 ± 0.12		2.00 ± 0.16	
		1	g	2.25 ± 0.13		1.88 ± 0.26	
		1	h	2.34 ± 0.09		2.03 ± 0.14	
Butyrophenone	2.66	1	d	2.37 ± 0.06	2.65 ± 0.23	–	2.66 ± 0.10
		1	e	2.46 ± 0.02		–	
		1	f	2.73 ± 0.31		2.64 ± 0.07	
		1	g	2.68 ± 0.16		2.59 ± 0.09	
		1	h	2.83 ± 0.16		2.73 ± 0.10	
Haloperidol	2.92 ± 0.34	1	f	2.53 ± 0.06	2.77 ± 0.26	2.78 ± 0.08	2.78 ± 0.09
		1	g	2.94 ± 0.12		2.79 ± 0.10	
		1	h	3.08 ± 0.09		2.79 ± 0.09	
Valerophenone	–	1	f	3.30 ± 0.15	3.40 ± 0.14	–	3.22 ± 0.12
		1	g	3.38 ± 0.17		3.13 ± 0.08	

Table 5 (continued)

Compound	log $D_{7,4}$ BioLoom database ^a	Procedure	Partition	HPLC–DAD		UPLC–DAD	
				log $D_{7,4}$	Average	log $D_{7,4}$	Average
Naphthalene	3.3	1	h	3.47 ± 0.07	3.19 ± 0.14	3.31 ± 0.04	3.21 ± 0.25
		1	g	3.05 ± 0.08		2.89 ± 0.01	
		1	h	3.28 ± 0.02		3.37 ± 0.10	
Thymol	3.3	1	g	3.43 ± 0.27	3.34 ± 0.23	3.34 ± 0.06	3.32 ± 0.05
		1	h	3.29 ± 0.19		3.31 ± 0.04	
Ketoconazole	3.83	1	g	3.50 ± 0.16	3.42 ± 0.20	3.39 ± 0.18	3.36 ± 0.15
		1	h	3.32 ± 0.21		3.28 ± 0.01	
Reserpine	3.72	3	f	3.67 ± 0.08	3.89 ± 0.21	–	4.27 ± 0.18
		3	g	4.02 ± 0.11		4.44 ± 0.05	
		3	h	3.98 ± 0.21		4.11 ± 0.03	
Hexanophenone	–	3	g	3.72 ± 0.26	3.69 ± 0.23	3.86 ± 0.02	4.05 ± 0.32
		3	h	3.67 ± 0.21		4.54 ± 0.03	
		1b	g	–		3.71 ± 0.01	
		1b	h	–		4.07 ± 0.02	
Phenothiazine	4.15	3	g	4.21 ± 0.18	4.11 ± 0.22	3.87 ± 0.02	4.02 ± 0.04
		3	h	4.01 ± 0.24		4.02 ± 0.02	
		1b	h	–		4.05 ± 0.01	
Heptanophenone	–	3	g	4.42 ± 0.21	4.41 ± 0.27	4.33 ± 0.02	4.52 ± 0.16
		3	h	4.41 ± 0.38		4.65 ± 0.04	
		1b	h	–		4.59 ± 0.13	
Anthracene	4.45	3	g	4.52 ± 0.21	4.49 ± 0.23	4.65 ± 0.02	4.37 ± 0.23
		3	h	4.47 ± 0.24		–	
		1b	h	–		4.24 ± 0.15	
Phenanthrene	4.47	3	g	4.62 ± 0.11	4.58 ± 0.09	–	–
		3	h	4.55 ± 0.07		–	

^a From reference (Biobyte Corp.1995–2006, n.d.). Values without standard deviation correspond to the recommended ones, whereas the ones with standard deviation correspond an average of the collected values.

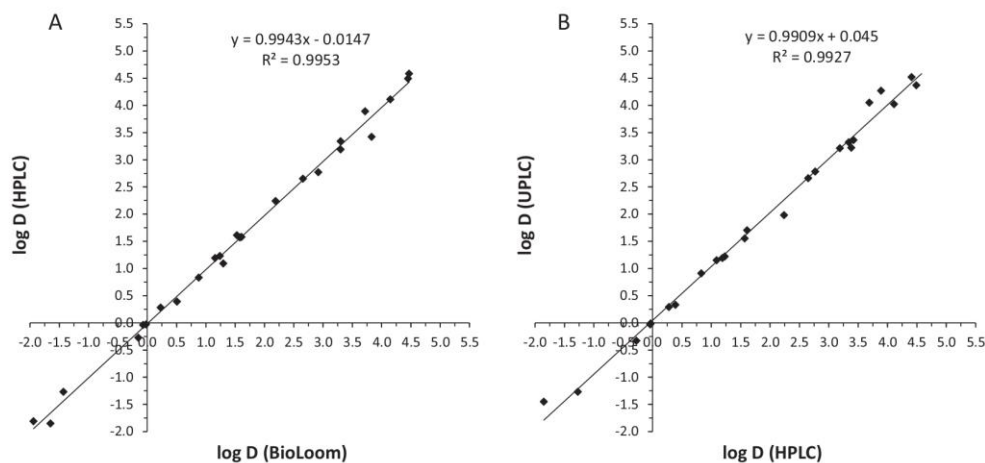


Fig. 3. Comparison of the log $D_{7,4}$ values obtained for the set compounds studied. (A) values obtained with the HPLC system vs. values recommended in the BioLoom reference data and (B) log $D_{7,4}$ values obtained with the UPLC system vs. the ones obtained with the HPLC system.

assumed that the methodology applied in this work using HPLC–DAD system to quantify the solute provide log $D_{7,4}$ values equivalent to those recommended in the literature with a precision of about 0.15 logarithmic units, given as the standard deviation of the correlation. The correlation is plotted in Fig. 3A.

Fig. 3B and Eq. (9) illustrate equivalence between the log $D_{7,4}$ values obtained with UPLC and HPLC systems.

$$\log D_{7,4}(\text{UPLC}) = 0.99(\pm 0.02) \log D_{7,4}(\text{HPLC}) + 0.04(\pm 0.04)$$

$$n = 25 \quad r^2 = 0.99 \quad \text{SD} = 0.15 \quad F = 3200$$

(9)

Again, the slope and the intercept obtained in this correlation are not different from 1 and 0 respectively for a 95% confidence level and thus, no differences in the log $D_{7,4}$ values are observed when a UPLC system is used instead of HPLC system for quantifying the solute remaining in aqueous (octanolic) phase, as expected. The precision is again of 0.15 logarithmic units. However, the injection of octanol in UPLC causes more overpressures than in HPLC and may produce some troubles in the chromatographic system. Thus, Procedure 2 and Procedure 3, where the octanolic phase is injected, are much less suitable when UPLC system is used. In order to minimize the injection of octanolic phase in this system,

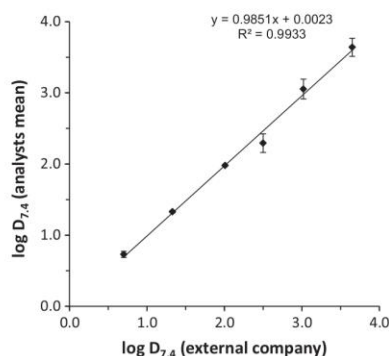


Fig. 4. Comparison between experimental $\log D_{7.4}$ values with those from an external company. Standard deviation error bars are indicated.

partition **b** with *Procedure 1* has been tested for benzoic acid and, although the partition volume of aqueous phase is small, no difference in $\log D_{7.4}$ value has been obtained with respect to the one from *Procedure 2* with HPLC system showing that *Procedure 1* can be extended up to a $\log D$ value of about -1.5 . Moreover, *Procedures 3* (for HPLC) and *1b* (for UPLC and HPLC) with the proposed partitions work well for very hydrophobic compounds ($\log D > 3.5$). Therefore, *Procedure 1b* is a good alternative to *Procedure 3* and avoids the injection of octanol in the chromatographic system.

Finally, the robustness of *Procedures 1* and *1b* has been checked selecting a new set of six pharmaceutical compounds in a $\log D_{7.4}$ range between 0.5 and 3.8 and their $\log D_{7.4}$ values have been determined by three different analysts. The mean values obtained by these analysts have been compared with the ones obtained by an external company that provides research services to pharmaceutical laboratories (CEREP). Fig. 4 and Eq. (10) show the correlation obtained between the two set of $\log D_{7.4}$ values:

$$\log D_{7.4}(\text{analyst mean}) = 0.98(\pm 0.04) \log D_{7.4}(\text{external company}) - 0.002(\pm 0.09) \quad n=6 \quad r^2=0.99 \quad \text{SD}=0.09 \quad F=591 \quad (10)$$

Because the slope and intercept obtained in this correlation are not significantly different from 1 and 0 respectively (for a 95% confidence level), it can be concluded that the proposed procedures for routine “in lab” $\log D$ determination can substitute the external determination procedures common in many pharmaceutical industries.

5. Conclusions

The procedures developed in this paper allow fast routine determination of drug lipophilicity in pharmaceutical laboratory using a small amount of drug. Moreover, they minimize the HPLC and UPLC measurement in octanolic phases which may be very hazardous and cleaning time consuming.

Procedure 1 that avoids injection of octanol can be used for $\log D$ determination in the range from -1.5 to 3.5 using the appropriate partition volumes and ratios (Table 4). This range can be extended up to 4.5 by the use of DMSO as cosolvent if there are solubility problems (*Procedure 1b*).

An accurate determination of $\log D$ of poorly lipophilic drugs ($\log D < -1$) may require the injection of the octanolic phase (*Procedure 2*). Injection of octanolic phase may be also an alternative for the $\log D$ determination of highly lipophilic/low water soluble drugs (*Procedure 3*) if the problems associated to octanol injection are considered and overcome.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia from the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union (Project CTQ2014-56253P) is acknowledged.

References

- ACD/Labs, 2012. Software, ACD/Percepta Platform v2012.
- Avdeef, A., 1992. pH-metric $\log P$. Part 1. Difference plots for determining ion-pair octanol–water partition coefficients of multiprotic substances. *Quant. Struct. Relationships* 11, 510–517. <http://dx.doi.org/10.1002/qsar.2660110408>.
- Avdeef, A., 1993. pH-metric $\log P$. II: Refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances. *J. Pharm. Sci.* 82, 183–190. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600820214>.
- Avdeef, A., 2003. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Biobyte Corp. 1995–2006, n.d. BioLoom Online Database. <<http://www.biobyte.com/bb/prod/bioloom.html>>.
- Chou, J.T., Jurs, P.C., 1979. Computer-assisted computation of partition coefficients from molecular structures using fragment constants. *J. Chem. Inf. Model.* 19, 172–178. <http://dx.doi.org/10.1021/ci60019a013>.
- Comer, J.E., 2003. High-throughput measurement of $\log D$ and pK_a , chapter 2. In: van de Waterbeemd, H., Lennernäs, H., Artursson, P. (Eds.), *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption, and Bioavailability*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Hansch, Corwin, Leo, A.J., 1979. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. John Wiley & Sons Inc..
- Dearden, J.C., Bresnen, G.M., 1988. The measurement of partition coefficients. *Quant. Struct. Relationships* 7, 133–144. <http://dx.doi.org/10.1002/qsar.19880070304>.
- Donovan, S.F., Pescatore, M.C., 2002. Method for measuring the logarithm of the octanol–water partition coefficient by using short octadecyl–poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr., A* 952, 47–61. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00064-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00064-X).
- EPA, U., 1996. Product properties test guideline. OPPTS 830.7550 Partition coefficient (n-octanol/H₂O), shake flask method. <<http://www.regulations.gov/#1documentDetail;D=EPA-HQ-OPPT-2009-0151-0031>> (accessed 17.12.14).
- Gulyaeva, N., Zaslavsky, a., Lechner, P., Chait, a., Zaslavsky, B., 2008. pH dependence of the relative hydrophobicity and lipophilicity of amino acids and peptides measured by aqueous two-phase and octanol–buffer partitioning. *J. Pept. Res.* 61, 71–79. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3011.2003.00037.x>.
- Hitzel, L., Watt, A.P., Locker, K.L., n.d. An increased throughput method for the determination of partition coefficients – ProQuest. <<http://search.proquest.com/docview/222664289/B2F85C6FD6044B2PQ/8?accountid=15293>> (accessed 16.12.14).
- Kaliskan, R., Haber, P., Bączek, T., Siluk, D., Valkó, K., 2002. Lipophilicity and pK_a estimates from gradient high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* 965, 117–127. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00114-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00114-0).
- Kerns, E.H., Di, L., 2008. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012369520-8.50026-7>.
- Landolt-Börnstein IV/18B, N.S., n.d. Landolt-Börnstein.
- Leo, A.J., 1987. Some advantages of calculating octanol–water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* 76, 166–168. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600760217>.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., 1971. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71, 525–616. <http://dx.doi.org/10.1021/cr60274a001>.
- Liang, C., Lian, H., 2015. Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 68, 28–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.009>.
- Mannhold, R., Poda, G.I., Ostermann, C., Tetko, I.V., 2009. Calculation of molecular lipophilicity: state-of-the-art and comparison of $\log P$ methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.* 98, 861–893. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21494>.
- OECD 107 Method, 1995. OECD guideline for the testing of chemicals adopted by the Council on 27th July 1995 Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948169.pdf>>.
- OECD 117 Method, 2004. OECD guidelines for the testing of chemicals. Partition coefficient (n-octanol/water), high performance liquid chromatography (HPLC) method. <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9711701e.pdf?expires=1425293587&id=id&accname=guest&checksum=E0B3F86FA0A5C9C5EE16E7A4CEFF0799>>.
- Pallicer, J.M., Pous-Torres, S., Sales, J., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2010. Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{(o/w)}$ through a new chromatographic method. *J. Chromatogr., A* 1217, 3026–3037. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.051>.
- Pallicer, J.M., Calvet, C., Port, A., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2012. Extension of the liquid chromatography/quantitative structure–property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric drugs. *J. Chromatogr., A* 1240, 113–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.089>.

- Pallicer, J.M., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., Pascual, R., Port, A., 2014. Evaluation of $\log P_{o/w}$ values of drugs from some molecular structure calculation softwares. *ADMET DMPK* 2, 107–114. <http://dx.doi.org/10.5599/admet.2.2.45>.
- Purcell, W.P., Bass, G.E., Clayton, J.E., 1973. *Strategy of Drug Design: A Guide to Biological Activity*. Wiley.
- Ràfols, C., Bosch, E., Ruiz, R., Box, K.J., Reis, M., Ventura, C., Santos, S., Araújo, M.E., Martins, F., 2012. Acidity and hydrophobicity of several new potential antitubercular drugs: isoniazid and benzimidazole derivatives. *J. Chem. Eng. Data* 57, 330–338. <http://dx.doi.org/10.1021/je200827u>.
- Sangster, J., 1997. *Octanol–Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. Wiley, Chichester.
- Scherrer, R.A., Howard, S.M., 1977. Use of distribution coefficients in quantitative structure–activity relations. *J. Med. Chem.* 20, 53–58. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00211a010>.
- Seydel, J.K., Schaper, K.-J., 1981. Quantitative structure–pharmacokinetic relationships and drug design. *Pharmacol. Ther.* 15, 131–182. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(81\)90040-1](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(81)90040-1).
- Stopher, D., Mclean, S., 1990. An improved method for the determination of distribution coefficients. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 144. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb05373.x>.
- Takács-Novák, K., Avdeef, A., 1996. Interlaboratory study of $\log P$ determination by shake-flask and potentiometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, 1405–1413. [http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085\(96\)01773-6](http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085(96)01773-6).
- Taylor, J.B., Triggler, D.J., 2007. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier (S.I.).
- Tetko, I.V., Poda, G.I., Ostermann, C., Mannhold, R., 2009. Large-scale evaluation of $\log P$ predictors: local corrections may compensate insufficient accuracy and need of experimentally testing every other compound. *Chem. Biodivers.* 6, 1837–1844. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200900075>.
- Valkó, K., 2000. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. Elsevier, Amsterdam.
- Valkó, K., Du, C., Bevan, C., Reynolds, D., Abraham, M., 2001. Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient ($\log P_{oct}$) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term (Sigma alpha_{2H}). *Curr. Med. Chem.* 8, 1137–1146. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867013372643>.
- Wiczling, P., Waszczuk-Jankowska, M., Markuszewski, M.J., Kaliszan, R., 2008. The application of gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography to the $pK(a)$ and $\log k(w)$ determination of polyprotic analytes. *J. Chromatogr., A* 1214, 109–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.085>.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. CARACTERITZACIÓ SISTEMÀTICA DE COLUMNES CROMATOGRÀFIQUES

Des que es va proposar a mitjans del segle XX [4], l'equació de van Deemter ha estat la referència a l'hora d'avaluar el rendiment i l'eficàcia d'una columna cromatogràfica. Tal i com s'ha exposat a la introducció (secció 1.2.1), aquesta equació permet explicar les causes que donen lloc a l'eixamplament del pic cromatogràfic a través de diverses contribucions additives. Així doncs, l'amplada d'un pic vindrà determinada per la suma d'un terme A que explica la multiplicitat de camins que pot seguir l'anàlit dins la columna, d'un terme B que fa referència a la difusió de l'anàlit durant la seva elució, i d'un terme C que té en compte la resistència a la transferència de massa i que, per la seva banda, es pot dividir en C_s i C_m en funció de si es refereix a la fase estacionària o a la fase mòbil. Sumant les alçades de plat corresponents a cadascun d'aquests termes, s'obté l'alçada de plats total del pic cromatogràfic (equació (7)).

L'article 1 és un review crític que estudia aquestes contribucions a l'eixamplament de banda explicades pels diferents termes de l'equació de van Deemter i que aprofundeix en la determinació de diversos paràmetres descriptors relacionats amb la columna cromatogràfica que resulten de gran utilitat per avaluar-ne el seu rendiment. En ell, s'estudien diversos paràmetres d'importància com la porositat de la columna, la qual es proposa mesurar a través del mètode de *total pore blocking*, o la difusió de l'anàlit, que es pot determinar a través del mètode de *peak parking*. Addicionalment, l'article 1 demostra que és possible aïllar i fer una estimació de cadascun dels termes de l'equació de van Deemter de manera més o menys acurada. Seguint un ordre sistemàtic en la determinació d'aquestes contribucions és possible caracteritzar fases estacionàries de columnes cromatogràfiques d'una manera força completa.

3.1.1. Establiment d'un full Excel per a caracteritzar columnes cromatogràfiques

En aquest sentit, l'article 1 aporta un full Excel [152] que permet la caracterització pas a pas de la columna cromatogràfica utilitzant les equacions descrites prèviament. Aquesta anàlisi exhaustiva no solament permet saber l'eficàcia i rendiment de columnes sinó que també determina quines són les causes que provoquen l'eixamplament de banda, ja que com més alt sigui el valor de cadascuna de les contribucions més ample serà el pic i , per tant, menys qualitat tindrà.

Com a norma general, en aquest full d'Excel no es treballa amb alçades de plat (H) sinó amb alçades de plat reduïdes (h). Tot i que el nom es presta a confusió, l'alçada de plat reduïda és senzillament una versió adimensional de l'alçada de plat que es pot obtenir fàcilment dividint l'alçada de plat pel diàmetre de partícula d_p [37,153]:

$$h = H/d_p \quad (51)$$

Així mateix, en les columnes G i H del full Excel es generen valors per als paràmetres v_0 i v_i respectivament, que són la velocitat lineal i la velocitat intersticial reduïda i que, com en el cas anterior, són les versions adimensionals dels dos tipus de velocitat. Passar d'un a l'altre paràmetre també resulta senzill en aquest cas; es realitza mitjançant la següent relació [26]:

$$v = ud_p/D_m \quad (52)$$

on D_m és la difusió molecular de l'anàlit estudiat i u és la velocitat de l'anàlit (portant el subíndex 0 en el cas de la velocitat lineal i el subíndex i en el cas de la velocitat intersticial). El tipus de velocitat (u) a la que es faci referència indicarà el tipus de velocitat reduïda (v) obtinguda.

El gran avantatge de treballar amb variables reduïdes és que, en ser adimensionals, permeten la comparació de columnes amb diàmetres de partícula diferents. Per altra banda, també com a norma general, el full d'Excel treballa amb un codi de colors concret: les caselles grogues són dades que l'usuari ha d'omplir, les caselles taronges representen un mètode alternatiu d'introduir dades experimentals i que en principi, excepte en el cas de la longitud de la columna, no cal tocar; per últim, les caselles

verdes són dades calculades pel propi full de càlcul i no s'han de modificar sota cap concepte. En aquest sentit, l'usuari haurà de començar a utilitzar el full de càlcul omplint algunes de les dades que es demanen a la columna S. Aquestes dades són el factor de retenció de l'anàlit (cel·la S19), la porositat total (cel·la S22), el diàmetre de partícula (cel·la S23), el paràmetre ρ que representa la relació entre el diàmetre de partícula i un hipotètic nucli dur present en les partícules core-shell (cel·la S24) i la longitud de la columna (cel·la S26). A més, també caldrà donar valor a la porositat externa (cel·la S21), per la qual es pot donar un valor aproximat de 0.38 (el valor real no sol estar molt lluny d'aquest valor de referència) o es pot realitzar un estudi de porositat mitjançant qualsevol dels mètodes anteriorment esmentats, i també al coeficient de difusió molecular D_m (cel·la S25), que es pot trobar tabulat en la literatura o bé es pot calcular mitjançant l'equació de Wilke-Chang a través de la pestanya de l'arxiu Excel habilitada per aquest propòsit. La Figura 9 mostra la zona de l'Excel en la que cal introduir totes aquestes dades:

Required input (all yellow fields)		Alternative input for t_0 and N	
ΔP_{max}^*	600 (bar)	(only needed for kinetic plot)	
Retention factor k'	5.9 (f)	Phase retention factor, defined as $(t_R - t_0)/t_0$	
D_{eff}	5.24E-10 (m ² /s)	Determined using Sheet: 'Peak Parking' or 'Deff based on u0min'	
External Porosity	0.38 (f)	Determined using Total Pore blocking [1] or ISEC [2]	
Total Porosity	0.5 (f)	Determined using column void time t_0 ($\epsilon_T = V_{column}/(F \cdot t_0)$)	
d_p	5.00E-06 (m)	Particle size	
ρ	0 (f)	Core to particle diameter ratio (fully porous = 0, non porous = 1, typical core shell = 0.6-0.7, $\rho_{ho\ max} = 0.999$)	
D_m	1.09E-09 (m ² /s)	Molecular diffusion coefficient; literature values, measured or calculated using Wilke-Chang equation in separate sheet [3,6,7]	
L_{column}	0.15 (m)	Column length (only necessary if t_0 and N are given as dataset)	
viscosity*	8.00E-04 (kg/(m·s))	(only needed for kinetic plot)	
Calculated Parameters (DO NOT CHANGE)		Specific parameters (calculated, DO NOT CHANGE)	
k''_o	1.63 (f)	zone retention factor of non-retained species	β_{eff} 0.480 (f) [5]
k''_n	17.16 (f)	Zone retention factor [4]	β_1 0.290 (f)
D_{zz}	4.90E-10 (m ² /s)	Effective diffusion coefficient inside mesoporous material of particles [5]	α_{part} 2.225 (f)
D_{zz}/D_m	0.449 (f)		Sh_{rz} 10 (f)
K_{co}	4.62E-14 (m ²)	column permeability	D_{zz}/D_m 0.4494 (f)
η_o	541 (f)	flow resistance	

Figura 9. Captura de pantalla de l'arxiu Excel en la que es mostra la zona d'introducció de dades [152]

Un cop introduïdes aquestes dades, el primer que cal fer per dur a terme la caracterització de columna és construir una corba de van Deemter, per la qual cosa cal mesurar la retenció d'un mateix anàlit en mode isocràtic a diversos cabals de fase mòbil de la mateixa composició. De cada mesura cal anotar-ne el temps de retenció (t_0) i el nombre de plats teòrics (N), les caselles B19-B43 i C19-C43 respectivament estan habilitades per a tal propòsit. Si a més s'afegeix la dada de la longitud de la columna a la casella S26, es generen les dades d'alçada de plat (H) i de velocitat lineal

de l'anàlit (u_0) a les columnes D i E, dades necessàries per obtenir la corba de van Deemter. Addicionalment, es generen dades de velocitat i velocitat reduïda en les següents tres columnes, dades que ens ajudaran a l'hora de calcular la contribució a l'eixamplament de banda del terme C. A la columna I del full Excel es genera l'alçada de plat reduïda total anteriorment esmentada.

Posteriorment, el primer pas per descomposar aquesta alçada de plat i així caracteritzar la columna segons les contribucions de l'equació de van Deemter, és el de calcular la difusió de l'anàlit, és a dir, el terme B. El full de càlcul ofereix dues possibilitats per determinar aquesta contribució, ja que el paràmetre D_{eff} es pot calcular de dues maneres diferents. La manera que requereix menys feina experimental està basada en considerar que, a velocitats extremadament baixes (com a mínim 10 vegades més baixa que la velocitat òptima de treball marcada pel mínim en la corba de van Deemter), la totalitat d'alçada de plat ve donada per la difusió de l'anàlit i que, per tant, $H \approx H_B$. Fent aquesta substitució, es pot aplicar l'equació 13 i trobar el valor de D_{eff} . La pestanya de l'arxiu Excel "Deff via experiments at low F" està habilitada per calcular el coeficient de difusió molecular per aquesta via. Si s'introdueixen per triplicat les dades de velocitat (cel·les A3-A5), les dades d'alçada de plat corresponents (cel·les B3-B5) i el factor de retenció del compost (cel·la F3), el valor de D_{eff} es genera a la cel·la B7. Si es desitja un càlcul de D_{eff} més acurat, es pot determinar a partir del mètode de *peak parking*, explicat anteriorment en la secció 1.2.3.1. El full de càlcul també permet utilitzar aquest procediment mitjançant la pestanya "Deff via peak parking".

En aquest cas, les dades que l'usuari ha d'introduir són la longitud de la columna (cel·la D3), el temps extracolumna per poder fer la correcció de la retenció (cel·la D4), el temps mort del sistema (cel·les A8-A10) i el temps de retenció de l'anàlit (cel·les B8-B10); aquests dos últims valors cal obtenir-los per triplicat. La manera més pràctica de determinar el temps extracolumna és treient la columna del sistema cromatogràfic i mesurant la retenció de l'anàlit en aquestes condicions. Posteriorment cal afegir les dades pròpies de l'experiment de *peak parking*. Es recomana mantenir els temps d'aparcament indicats a l'Excel (15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuts) però poden ser els temps de retenció que desitgi l'usuari (cel·les B17-B34). Tot i això, sempre cal realitzar

experiments addicionals de temps d'aparcament curt per corregir l'eixamplament de banda que pugui produir l'acte d'apagar i posteriorment engegar les bombes; si bé es recomana mig minut aquest temps també pot ser escollit per l'usuari (cel·les B14-B16). Un cop decidits els temps i realitzades les mesures, cal introduir els temps de retenció i el nombre de plats dels diferents pics en l'espai habilitat per fer-ho (cel·les C14-C16 i D14-D16 per les dades de correcció, cel·les C17-C34 i D17-D34 per les dades d'aparcament); com en els temps anteriors també caldrà fer-ho per triplicat.

Un cop introduïdes les dades, el full de càlcul generarà valors per a la resta de paràmetres necessaris per a la determinació de D_{eff} , així com el gràfic de la diferència en la variància espacial ($\Delta\sigma_x^2$) contra el temps d'aparcament (t_{park}) corresponent a l'equació (8). A partir del pendent d'aquest gràfic, el valor de D_{eff} es mostrarà a la casella M12. Sigui quina sigui la manera en la que s'ha determinat D_{eff} , substituint el valor obtingut a la casella S22 de la pestanya principal es generaran els valors de l'alçada de plat reduïda deguda al terme B de l'equació de van Deemter (h_B) a la columna J. A la figura 10 es pot observar una captura de pantalla on es mostra la pestanya habilitada per a calcular D_{eff} mitjançant el mètode de *peak parking*.

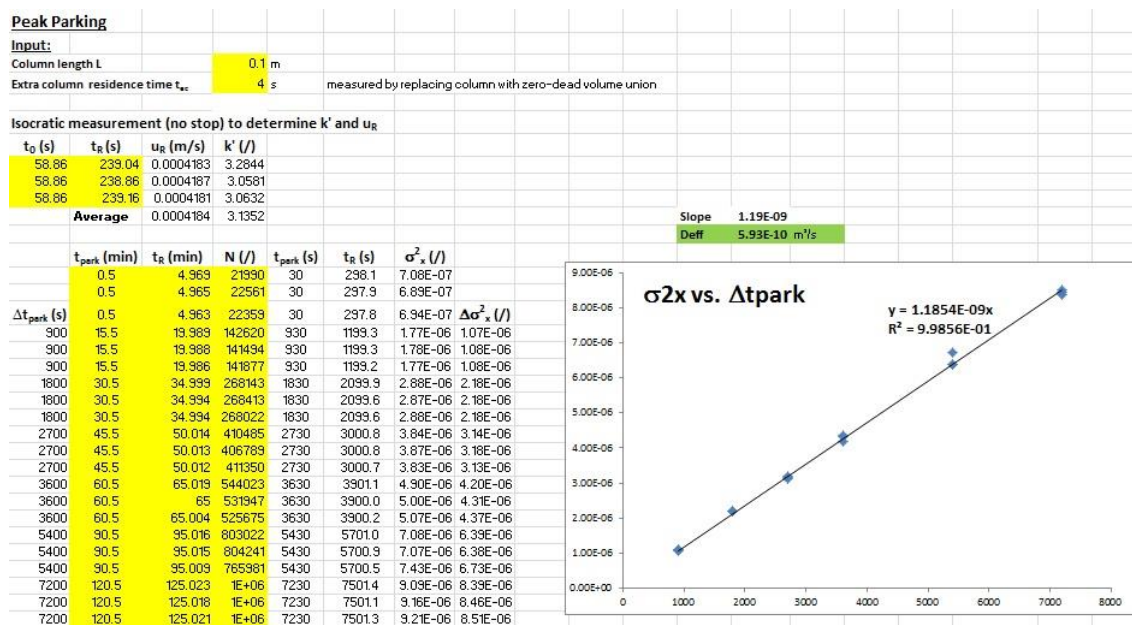


Figura 10. Captura de pantalla de la pestanya referent a "Deff via peak parking" de l'arxiu Excel de caracterització [152]

Paral·lelament, la determinació de D_{eff} , juntament amb el valor de D_m introduït durant la part inicial del procediment, origina els valors de tots els paràmetres

necessaris per dur a terme l'estimació de la contribució a l'eixamplament de banda del terme C_s (caselles AA29-AA33) seguint el procediment matemàtic descrit anteriorment (equacions 10-15). D'aquesta manera, quan s'obté el valor de D_{eff} i s'introdueix a la casella corresponent, l'arxiu d'Excel també genera els valors de h_{Cs} , en aquest cas a la columna K de la pestanya principal. L'obtenció d'aquestes dades està condicionada a que l'usuari hagi introduït els valors de porositat de la columna (tant porositat total com porositat externa), cosa que no era necessària per a la determinació de la difusió i la seva contribució a l'eixamplament de banda. Per últim, si s'introdueix el valor de ρ l'efecte de h_{Cs} quedarà corregit per a partícules del tipus core-shell, en cas que les partícules siguin de tipus totalment porós cal assignar a ρ un valor de 0 i l'estimació de la contribució de C_s a l'alçada de plat serà correcta.

Tot i que, com ja s'ha dit anteriorment, l'estimació a la contribució a l'eixamplament de banda del terme C_m no és massa fiable ja que es basa en aproximacions que poden no ser del tot correctes, el full Excel permet fer un càlcul aproximat d'aquesta contribució. En aquest sentit, el nombre de Sherwood de la fase mòbil (Sh_m) es determina mitjançant la següent aproximació basada en la velocitat intersticial reduïda (v_i) [34]:

$$Sh_m = \frac{13}{1 + 2.1v_i} + 8.6v_i^{0.21} \quad (53)$$

Aquesta aproximació al nombre de Sherwood de la fase mòbil només resulta vàlida quan la columna té una porositat externa entre 0.35 i 0.44 i si es treballa a velocitats intersticials reduïdes entre 1 i 250. Aquests valors de Sh_m es calculen automàticament a la columna AM al generar-se els valors de velocitat intersticial reduïda de la columna H (que per la seva part es generen quan l'usuari introdueix les dades de temps de retenció a la columna B).

Un cop estimades les diferents contribucions a l'eixamplament de banda en forma d'alçada de plat reduïda, la substracció successiva de totes elles a l'alçada de plat reduïda total (h) dóna lloc a una alçada de plat que es pot atribuir a la contribució del terme A de l'equació de van Deemter. Aquests valors es generen a la columna M. A la Figura 11 s'observa la zona d'introducció de dades del full Excel i les diferents

contribucions a l'eixamplament de banda expressades en forma d'alçada de plat reduïda.

Provide data for t_0, N or for u_0, H

t_0 (s)	N (/)	u_0 (m/s)	H (m)	u_i (m/s)	v_0 (/)	v_i (/)	h	h_B	h_{CS}	h_{cm}	h_A^*
1482.60	2098	0.00010	7.151E-05	0.000133	0.5	0.6	14.30	1.43E+01	2.36E-03	8.28E-03	3.66E-03
742.43	3827	0.00020	3.920E-05	0.000266	0.9	1.2	7.84	7.15E+00	4.71E-03	1.76E-02	6.63E-01
372.69	6717	0.00040	2.233E-05	0.000530	1.8	2.4	4.47	3.59E+00	9.38E-03	3.55E-02	8.30E-01
248.80	8934	0.00060	1.679E-05	0.000793	2.8	3.6	3.36	2.40E+00	1.40E-02	5.19E-02	8.94E-01
186.76	10526	0.00080	1.425E-05	0.001057	3.7	4.8	2.85	1.80E+00	1.87E-02	6.73E-02	9.64E-01
149.17	11807	0.00101	1.270E-05	0.001323	4.6	6.1	2.54	1.44E+00	2.34E-02	8.20E-02	9.98E-01
124.90	12584	0.00120	1.192E-05	0.001580	5.5	7.2	2.38	1.20E+00	2.80E-02	9.56E-02	1.06E+00
107.25	13142	0.00140	1.141E-05	0.001840	6.4	8.4	2.28	1.03E+00	3.26E-02	1.09E-01	1.11E+00
93.75	13676	0.00160	1.097E-05	0.002105	7.3	9.7	2.19	9.03E-01	3.73E-02	1.22E-01	1.13E+00
83.50	13535	0.00180	1.108E-05	0.002364	8.2	10.8	2.22	8.05E-01	4.18E-02	1.34E-01	1.24E+00
75.28	13414	0.00199	1.118E-05	0.002622	9.1	12.0	2.24	7.25E-01	4.64E-02	1.46E-01	1.32E+00
83.71	13635	0.00179	1.100E-05	0.002358	8.2	10.8	2.20	8.07E-01	4.17E-02	1.34E-01	1.22E+00
75.49	13379	0.00199	1.121E-05	0.002615	9.1	12.0	2.24	7.27E-01	4.63E-02	1.46E-01	1.32E+00
68.75	13279	0.00218	1.130E-05	0.002871	10.0	13.2	2.26	6.62E-01	5.08E-02	1.58E-01	1.39E+00
63.15	13138	0.00238	1.142E-05	0.003125	10.9	14.3	2.28	6.09E-01	5.53E-02	1.69E-01	1.45E+00
58.40	12899	0.00257	1.163E-05	0.003380	11.8	15.5	2.33	5.63E-01	5.98E-02	1.80E-01	1.52E+00
54.35	12663	0.00276	1.185E-05	0.003631	12.7	16.7	2.37	5.24E-01	6.43E-02	1.91E-01	1.59E+00
50.85	12578	0.00295	1.193E-05	0.003881	13.5	17.8	2.39	4.90E-01	6.87E-02	2.02E-01	1.62E+00
47.31	11931	0.00317	1.257E-05	0.004171	14.5	19.1	2.51	4.56E-01	7.39E-02	2.14E-01	1.77E+00
43.78	11406	0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00
		0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00
		0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00
		0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00
		0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00
		0.00343	1.315E-05	0.004509	15.7	20.7	2.63	4.22E-01	7.98E-02	2.28E-01	1.90E+00

Figura 11. Captura de pantalla de la zona d'introducció de dades i obtenció de les diferents alçades de plat reduïdes de l'arxiu Excel [152]

D'acord amb tots aquests valors de les diferents contribucions a l'eixamplament de banda, a la part superior del full de càlcul es generen dos gràfics que permeten visualitzar de manera clara totes aquestes dades. A la part esquerra es troba el gràfic on les diferents contribucions de l'equació de van Deemter (en forma d'alçada de plat H) es van restant a l'alçada de plat total. Per altra banda, just a la seva dreta, es troba un gràfic on es mostra el valor numèric de les diferents contribucions per a tot l'interval de velocitat de l'anàlit, fet que permet entendre la seva evolució en funció del cabal de la fase mòbil i que també ajuda a comparar-les fàcilment. A la Figura 12 es poden veure els dos gràfics anteriorment descrits.

Per últim, l'arxiu Excel també permet un altre tipus d'avaluació del rendiment d'una columna mitjançant el que es coneix com a gràfics cinètics (*kinetic plots*) i gràfics de límit de rendiment cinètic (*kinetic performance limit plots*, habitualment abreuiats a *KPL-plots*). Els *kinetic plots* són gràfics complementaris a les corbes de van Deemter i s'utilitzen per conèixer la relació existent entre el temps de retenció i el nombre de plats obtingut [154,155], fet que permet a l'usuari buscar un equilibri entre la qualitat

d'un pic cromatogràfic i el temps que s'inverteixi en assolir aquesta qualitat. Per la seva part, els *KPL-plots* són un tipus específic de *kinetic plot* en els que es mostra quin seria el rendiment obtingut per a un determinat pic cromatogràfic si el sistema cromatogràfic treballés en condicions òptimes, és a dir, al màxim de pressió assumible per l'instrument [156].

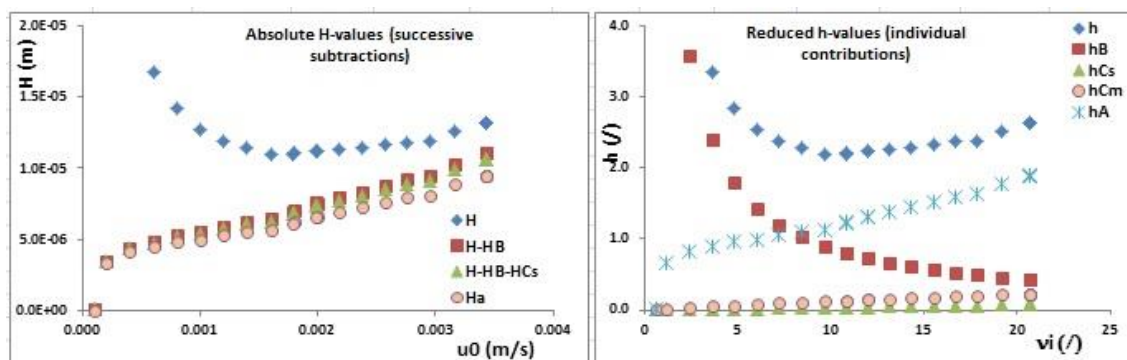


Figura 12. Gràfics donats pel full de càlcul proporcionat. A l'esquerra, la resta successiva de les diferents alçades de plat; a la dreta, les alçades de plat reduïdes corresponents a cadascuna de les contribucions de l'equació de van Deemter

Per portar a terme aquesta caracterització de tipus cinètic en el full Excel, caldrà que l'usuari anoti el valor de pressió màxima al que està disposat a arribar (casella S18), la viscositat de la fase mòbil (casella S27) i la pressió obtinguda en les diferents mesures que han permès la construcció de la corba de van Deemter (columna A). Això generarà dades de tipus *KPL* tant de temps de retenció com de nombre de plats (columnes O-P) i dibuixarà la corba *KPL* corresponent a la part superior dreta del full de càlcul, on es podrà observar el rendiment òptim de la fase estacionària quant a la relació entre temps de retenció i qualitat del pic cromatogràfic (a través del seu nombre de plats).

3.2. PREDICCIÓ DE LA RETENCIÓ D'ANÀLITS IONITZABLES EN MODE GRADIENT

Tal i com s'ha vist anteriorment, la cromatografia de líquids d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC) és una de les tècniques analítiques més emprades actualment i, d'entre els possibles modes a utilitzar, l'elució en gradient és la que té més importància degut a les seves múltiples aplicacions a l'hora de dissenyar mètodes i separacions de mescles. Aquest fet ha provocat que un dels camps de recerca d'interès relacionats amb la RP-HPLC hagi estat el d'establir models que permetin predir la retenció cromatogràfica de substàncies en gradient. Encara que existeixen diversos models per predir la retenció en gradient de substàncies neutres [89,100–102,106], l'atenció prestada a la predicció de la retenció de substàncies ionitzables és molt menor. Així doncs, desenvolupar models de predicció de la retenció de substàncies amb propietats àcid-base és de gran interès.

3.2.1. Desenvolupament de models

El primer pas en el desenvolupament de models que permetin la predicció en gradient d'anàlits ionitzables ha estat el d'entendre, de forma separada, la retenció d'anàlits neutres en mode gradient i la retenció d'anàlits ionitzables en mode isocràtic. Així doncs, es parteix de l'equació que modela la retenció d'anàlits ionitzables en isocràtic com a referència (equació (45)). En aquesta equació, el terme $\log k_N$ respon a la retenció de la forma neutra de l'anàlit, retenció que depèn només de la polaritat de la fase mòbil i, per tant, per a cada anàlit concret és funció, exclusivament, de la naturalesa i fracció de modificador orgànic a la fase mòbil, φ . El segon terme de l'equació (45) referent a la ionització de l'anàlit conté el grau d'ionització, D , paràmetre que depèn alhora del pH de la fase mòbil i el pK_a de l'anàlit (equació (43)), que són funció també de la naturalesa i fracció del modificador orgànic. Per tant, cal modelar els dos termes de l'equació (45) en funció de φ i aquest darrer d'acord amb el gradient aplicat per tal d'aconseguir un model adequat per a la descripció de la retenció en

mode gradient. La substitució de $\log k_N$ per qualsevol de les expressions que relacionen la retenció amb la fracció de modificador orgànic com ara els models de tres, dos i un paràmetres (equacions (30), (33) i (34) respectivament) portarà a expressions que permeten la predicció en gradient de compostos ionitzables. D'aquesta manera, s'obtenen tres models de predicció diferents:

$$\log k = a - \frac{c\varphi}{1 + b\varphi} + \log [1 - D(1 - f)] \quad (54)$$

$$\log k = q + pP_m^N + \log [1 - D(1 - f)] \quad (55)$$

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) + \log [1 - D(1 - f)] \quad (56)$$

L'aplicació de qualsevol d'aquests models implica també la modelació del terme D , és a dir, del pH de la fase mòbil i del pK_a de l'anàlit, amb φ . Després d'establir els diferents models, és necessari comprovar si aquestes expressions són vàlides per predir els valors experimentals. Cal mencionar que aquests models es limiten a predir la retenció d'anàlits monopròtics, ja que els anàlits polipròtics tenen un comportament de retenció molt més complex no previst en cap d'aquests models.

3.2.2. Disseny del treball experimental

Per tal d'assegurar que els models de predicció siguin robustos s'han de validar experimentalment considerant tot l'interval possible en les variables que cal tenir en compte. Per aquest motiu, abans de començar a fer les mesures es va dur a terme un procés de selecció de substàncies i de condicions experimentals per provar que els models fossin aplicables en el major nombre de situacions possibles.

3.2.2.1. Selecció de substàncies

A l'hora de seleccionar les substàncies que s'utilitzarien per fer l'estudi es van seguir els següents criteris:

- La meitat de substàncies estudiades són àcids i l'altra meitat són bases, per tal de garantir l'aplicabilitat a tot tipus de compostos.

- Les substàncies són monoprotòniques, és a dir, han de tenir un únic protó ionitzable (un sol pK_a).
- El pK_a de les substàncies està comprès entre 4 i 9. Idealment es buscaria cobrir un interval de pK_a més gran però cal tenir en compte que caldrà fer mesures en què els anàlits estiguin en la seva forma totalment neutra i en la seva forma totalment ionitzada (cosa que s'assoleix a dues unitats de pH de distància del seu valor de pK_a) i que l'interval de pH de treball de la columna és de 2 a 11. Si a això se li afegeix la variació del pH de la fase mòbil i del pK_a de l'anàlit en funció de la fracció de modificador orgànic, cal preveure aquestes variacions per tal de no traspasar en cap moment els límits de treball de la columna.
- El pK_a dels diferents compostos prové de diferents grups funcionals ionitzables. Aquest aspecte cobra una especial importància en la estimació del pK_a a partir de l'aproximació matemàtica, ja que els coeficients que s'han d'aplicar són funció del grup funcional de l'anàlit.
- Les substàncies contenen com a mínim un anell aromàtic per poder garantir la seva detecció a la longitud d'ona seleccionada en el detector (254 nm).

Sota tots aquests criteris es va proposar una llista de 12 compostos, compostos que es mostren a la Taula 2:

Taula 2. Llista de compostos estudiats, juntament amb el seu valor de $^w pK_a$ i el seu grup funcional ionitzable

Compost	$^w pK_a$	Grup funcional
2,4-dinitrofenol	4.09	Fenol
Àcid benzoic	4.20	Àcid carboxílic aromàtic
2,5-dinitrofenol	5.22	Fenol
2,4,6-tribromofenol	6.10	Fenol
2,4,5-triclorofenol	6.72	Fenol
Vanillina	7.40	Fenol
Piridina	5.25	Piridina
4-tert-butilpiridina	5.99	Piridina
2,4-lutidina	6.79	Piridina
2,4,6-trimetilpiridina	7.43	Piridina
Lidocaïna	7.95	Amina
N,N-dimetilbenzilamina	8.91	Amina

Posteriorment, en comprovar que els models funcionaven amb substàncies de poca complexitat molecular, es va ampliar la llista amb 8 fàrmacs (4 àcids i 4 bases) de pes molecular més elevat i estructura més complexa, però amb els mateixos criteris de selecció esmentats anteriorment. Les estructures d'aquests compostos es poden consultar en la Figura 1 de l'article 4, mentre que els seus valors de ${}^w pK_a$ i el seu grup funcional es mostren a la Taula 3.

Taula 3. Compostos de major complexitat estudiats, afegits a la llista de compostos inicial, juntament amb el seu valor de ${}^w pK_a$ i el seu grup funcional ionitzable

Compost	${}^w pK_a$	Grup funcional
Atorvastatina	4.04	Àcid carboxílic alifàtic
Àcid flufenàmic	4.16	Àcid carboxílic aromàtic
Naproxè	4.28	Àcid carboxílic alifàtic
Rosuvastatina	4.44	Àcid carboxílic alifàtic
Bupivacaïna	8.10	Amina
Clonidina	8.05	Amina
Diltiazem	7.79	Amina
Trazodona	6.73	Amina

Cal aclarir que, si bé moltes d'aquestes substàncies tenen més d'un pK_a , només un protó s'ionitza de forma significativa en l'interval de pH en el que es treballa, per la qual cosa es pot considerar que aquests compostos funcionen com a substàncies monoprotòniques.

3.2.2.2. Selecció de gradients

Tal i com s'ha comentat prèviament, el mode gradient és un tipus d'elució en la qual la composició de la fase mòbil varia durant l'elució. Els paràmetres més importants són la fracció inicial i la fracció final de modificador orgànic i també el temps que dura el gradient, és a dir, el temps que trigarà la fase mòbil en arribar de la composició inicial a la composició final. La velocitat en que la composició de la fase mòbil variï dependrà, en gran mesura, de si l'interval de composicions és molt gran i de si el gradient disposa de més o menys temps per arribar d'una composició a l'altra. Ara bé, mantenint constants aquests tres termes, encara existeixen diferents tipus de gradients en funció de la manera en la qual la fracció de modificador orgànic varia amb el temps. Si la

composició varia d'una forma constant amb el temps es tractarà d'un gradient lineal. Per contra, si la manera com varia la composició va creixent o disminuint amb el temps, es tractarà d'un gradient còncau o convex, respectivament. És possible determinar la fracció de modificador orgànic en la fase mòbil a cada moment de l'elució mitjançant l'equació (57), que explica com el mesclador del sistema cromatogràfic fa variar la composició de la fase mòbil amb el temps [157]:

$$\varphi = \varphi_{in} + (\varphi_f - \varphi_{in}) \frac{e^{\frac{at}{T}} - 1}{e^a - 1} \quad (57)$$

En aquesta equació, φ_{in} i φ_f són, respectivament, les composicions inicial i final del gradient, t és el moment en el que es vol determinar la fracció de modificador orgànic de la fase mòbil φ , T és el temps total del gradient i a representa la corba que segueix el gradient, és a dir, la manera com la variació de la fracció de modificador orgànic va creixent o decreixent amb el temps. Els valors d' a superiors a 0 corresponen a gradients còncaus mentre que els valors d' a inferiors a 0 respondran a gradients convexos. Addicionalment, com més gran sigui el valor absolut d' a del gradient més pronunciada serà la corba que segueixi el gradient.

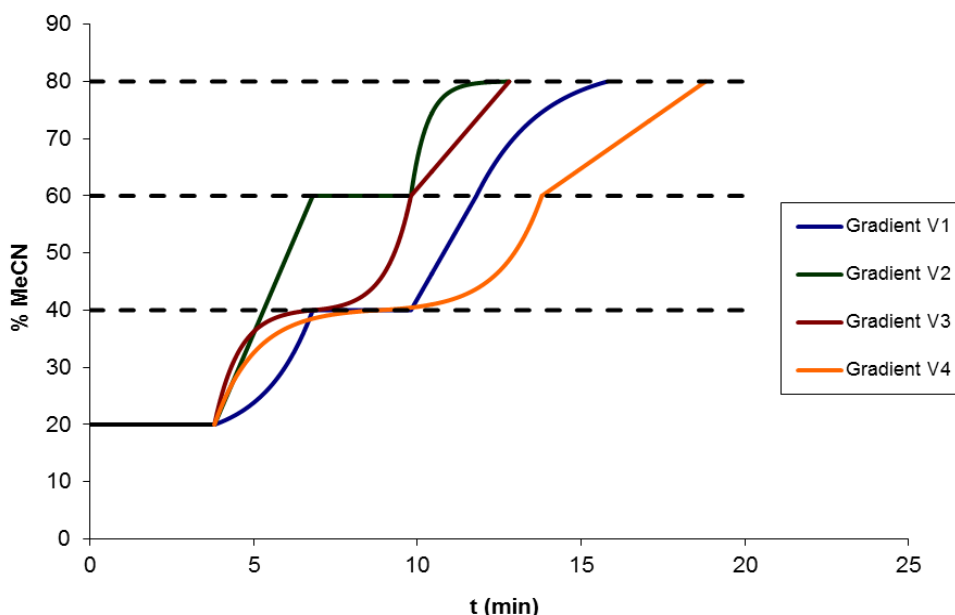


Figura 13. Gradients creats combinant diversos gradients senzills (gradients variats)

Tenint en compte les diferents característiques de cada tipus de gradient, per a fer aquest estudi es van seleccionar 12 gradients dels tipus anteriorment esmentats (4

lineals, 4 còncavs i 4 convexas) i, a més, se'n van crear 4 d'addicionals que encadenen gradients de diversos tipus (anomenats gradients variats, sovint representats per la lletra V). La Figura 13 mostra l'evolució d'aquestes combinacions de gradients amb el temps. Per altra banda, els altres perfils de gradient més senzills utilitzats en els diferents estudis de predicció (lineals, còncavs i convexas) poden consultar-se en els articles publicats (Figures 2A, 2B i 2C en l'article 2, Figura 2A en l'article 4).

Cal afegir que, abans que comenci el gradient, existeix una etapa isocràtica la composició inicial que correspon al temps que el gradient triga en arribar a la columna. Aquest temps és habitualment conegut com a *dwell time* o temps de residència (t_D) i és característic de cada instrument HPLC, ja que depèn dels mòduls que el conformin i els tubs que els connectin. Conèixer el valor del *dwell time* del sistema és un aspecte força important ja que, en cas contrari, no es podria determinar la retenció dels anàlits a través de l'equació (40).

Una de les maneres més habituals de determinar el valor del *dwell time* és la que es descriu a continuació [158]. En un sistema HPLC amb dues bombes cromatogràfiques, es col·loquen dos recipients amb metanol, amb la diferència que en un d'ells cal afegir unes gotes d'acetona. En aquestes condicions, es realitza un gradient lineal de 20 minuts de durada que vagi de metanol pur a la mescla de metanol i acetona (és a dir, el mesclador passarà d'agafar 100% d'una bomba a agafar 100% de l'altra) i s'ajusta el detector a 260 nm, longitud d'ona específica on absorbeix l'acetona. La diferència entre el temps del gradient i el temps que marca el cromatograma equivaldrà al *dwell time* del sistema. L'esquema del mètode utilitzat es mostra a la Figura 14:

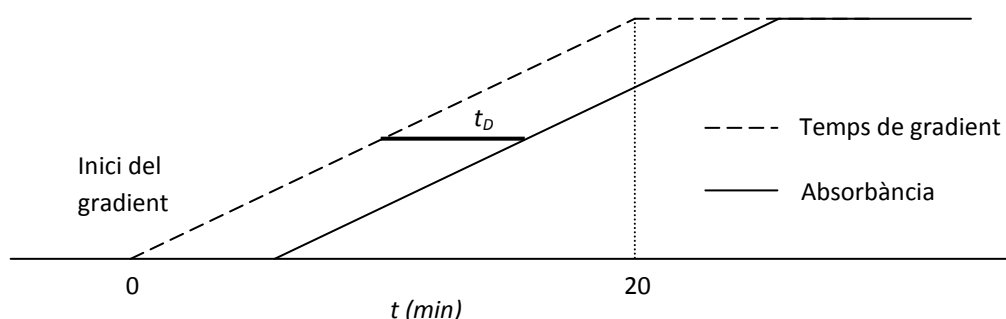


Figura 14. Esquema del procediment per determinar el temps de residència

En aquesta figura, la línia discontinua representa el gradient programat pel software mentre que la línia contínua és l'absorbància observada en el cromatograma. Es

recomana agafar la diferència entre ambdues línies a la meitat del gradient, en aquest cas 10 minuts, per a una major exactitud. D'aquesta manera s'eviten errors per arrodoniment o per possibles irregularitats del senyal en els extrems del propi gradient.

Per tal de comprovar la fiabilitat dels models de predicció en un interval ampli de pH, els gradients proposats per a cada estudi es van implementar a tres valors de w pH diferents. Els tampons seleccionats van ser un tampó d'acetat a pH 5 i un altre tampó de fosfat a pH 7 (el s pH creix conforme augmenta la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil) i un tampó d'amoni a pH 9 (el s pH disminueix conforme augmenta la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil). No es va estudiar la predicció de la retenció a valors més extrems de pH per respectar el màxim possible l'interval de pH de treball de la columna.

3.2.3. Obtenció de dades prèvies

Els tres models de predicció proposats depenen essencialment de tres variables: els paràmetres propis de cada solut (que seran diferents per a cada model de predicció), el grau d'ionització D i la relació entre els factors de retenció de l'espècie neutra i l'espècie ionitzada f . Per tant, abans de poder obtenir les dades de retenció calculades a través dels models, cal determinar amb la màxima exactitud possible tots aquests paràmetres.

3.2.3.1. Paràmetres de retenció propis del solut

En aquest estudi es fan servir tres models de predicció diferents, basats en un, dos i tres paràmetres de retenció, que segueixen l'expressió de les equacions (56), (55) i (54) respectivament. En aquest sentit, el primer que cal fer és determinar els paràmetres propis del solut: p per al model d'un paràmetre, p i q pel model de dos paràmetres i, per últim, a , b i c per al model de tres paràmetres. Cal aclarir que els valors de p per al model d'un paràmetre i per al model de dos paràmetres són lleugerament diferents; el fet que es representin mitjançant el mateix símbol és degut a l'evolució històrica de construcció dels models de retenció.

Per tal de realitzar aquesta determinació cal mesurar la retenció dels diferents soluts en la seva forma neutra a diferents composicions de fase mòbil en mode isocràtic. Per a fases mòbils amb acetonitril, els percentatges de modificador orgànic escollits van ser 20%, 40%, 60% i 80%. Tot i que la intenció inicial era fer servir les mateixes composicions en fases mòbils metanol-aigua, les característiques del solvent orgànic no van permetre-ho. El metanol, en ser un solvent orgànic més polar i amb menor força el·luotrópica que l'acetonitril, dona lloc a temps de retenció més elevats i això va provocar que, en aquest cas, les mesures a un 20% de metanol en la fase mòbil fossin massa llargues com per poder-les portar a terme experimentalment. Per aquest motiu, es va optar per mesurar la retenció dels diferents soluts a un 40%, 50%, 60%, 70% i 80% de metanol en la fase mòbil (de fet, per a algunes substàncies el valor al 40% ja no es va poder determinar, per la qual cosa aquest valor de retenció es va extrapolar a partir de la resta de dades).

La manera conceptualment més correcta de determinar la retenció de l'espècie neutra dels anàlits és mitjançant l'equació (23), però el procediment experimental associat requereix la mesura de la retenció de l'anàlit a diversos valors de pH i no sempre es pot dur a terme ja que es necessita una quantitat significativa de temps i de recursos. Alternativament, es pot considerar que la substància està en la seva forma totalment neutra als valors de pH que delimiten l'interval de pH de treball de la columna, és a dir, pH 2 per a substàncies àcides i pH 11 per a substàncies bàsiques i, per tant, determinar els valors de retenció de l'espècie neutra exclusivament a través de mesures en aquestes condicions de pH. Els tampons utilitzats per a dur a terme aquestes determinacions van ser un tampó d'àcid fosfòric a pH 2 (el pH_w creix conforme augmenta la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil) i un tampó de pirrolidina a pH 11 (el pH_w disminueix conforme augmenta la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil). Detalls sobre com es va dur a terme el treball experimental, com ara marques comercials dels reactius i/o anàlits, algunes especificacions del sistema HPLC o la columna cromatogràfica utilitzada en cada cas, poden consultar-se a la secció titulada *Experimental* en els articles 2 i 4.

Posteriorment, aquestes dades de temps de retenció han de ser convertides a dades a $\log k$ (paràmetre en el qual s'expressa la retenció en els models

cromatogràfics), per la qual cosa es fa necessària la determinació del temps mort del sistema. Tot i que existeixen una àmplia varietat de mètodes per determinar el temps mort, en aquest estudi es va determinar mitjançant la injecció de KBr com a marcador no retingut i la seva detecció a 190 nm [159]. Un cop obtinguts els valors de $\log k$, s'ajusten als models pertinents juntament amb els valors de φ o de P_m^N (depenent del model per al qual es determinin els coeficients) als que han estat mesurats, obtenint així els paràmetres característics de cada solut per als models de dos i de tres paràmetres. No és el cas del model d'un paràmetre ja que aquest, addicionalment, requereix la determinació dels valors de P_s^N i de $(\log k)_0$. Cal recordar que, en treballar amb l'anàlit en la seva forma neutra, el terme referent a la seva ionització en les equacions (54-56) és nul.

Per tal d'obtenir els valors de P_s^N i de $(\log k)_0$ es va dur a terme el procés de caracterització de columna [91], descrit prèviament a la secció 1.4.1.1. El procés va donar lloc als següents valors: $(\log k)_0 = -0.752$; $P_s^N = 0.0066$. Els resultats són coherents especialment en el cas de P_s^N ja que, tenint en compte que la polaritat de la fase estacionària en RP-HPLC ha de ser molt baixa, el valor de P_s^N sempre s'ha de trobar al voltant de 0 [47]. Un cop dut a terme aquest procés, es van poder determinar els valors de p per al model d'un paràmetre. Cal dir que, en no ser un ajust sinó una substitució directa, no es determina un únic valor de p (com en el cas dels altres paràmetres) sinó que cada composició de la fase mòbil dóna lloc a un valor de p . El valor de p per a cada compost serà la mitjana dels valors obtinguts a les diferents fraccions de modificador orgànic estudiades.

Aquest procés de caracterització requereix un treball experimental addicional respecte als altres dos models quan s'utilitza per primera vegada ja que cal determinar els valors de $(\log k)_0$ i P_s^N però té el gran avantatge que, degut a que aquests paràmetres són constants per a cada sistema cromatogràfic, només cal determinar-los una vegada. Aquest fet facilita en gran mesura l'ús del model un cop el sistema està caracteritzat, ja que l'únic valor no conegut serà el del paràmetre p , que fa referència a la retenció del solut que es mesura.

La Taula 4 resumeix els coeficients determinats per a cada un dels models de predicció en fases mòbils de tipus acetonitril-aigua.

Taula 4. Paràmetres de retenció propis del solut per als models de tres, dos i un paràmetres per a la predicció en acetonitril

Compost	3 paràmetres (equació (30))			2 paràmetres (equació (33))		1 paràmetre (equació (34))
	a	b	c	p	q	p
2,4-dinitrofenol	2.048	0.852	5.313	3.462	-1.151	2.30
Àcid benzoic	2.637	4.683	18.023	2.540	-0.964	1.97
2,5-dinitrofenol	2.182	1.181	6.192	3.312	-1.025	2.54
2,4,6-tribromofenol	4.788	2.656	18.448	4.983	-0.996	4.36
2,4,5-triclorofenol	4.768	3.039	20.764	4.867	-1.120	3.87
Vanillina	2.061	5.460	16.622	1.918	-0.845	1.69
Piridina	1.927	11.081	27.663	1.131	-0.578	1.69
4-tert-butilpiridina	4.934	6.427	38.044	3.513	-0.816	3.43
2,4-lutidina	4.377	12.079	60.606	2.157	-0.671	2.48
2,4,6-trimetilpiridina	4.767	10.323	56.654	2.589	-0.726	2.75
Lidocaïna	5.014	4.021	26.672	4.539	-1.043	3.78
N,N-dimetilbenzilamina	3.560	5.017	22.277	2.873	-0.635	3.31

3.2.3.2. Grau d'ionització

El factor que provoca que la predicció de la retenció de substàncies ionitzables sigui més complexa que la de substàncies neutres és que els compostos amb propietats àcid-base tenen la capacitat d'estar en la seva forma neutra o en la seva forma ionitzada, ja sigui totalment o parcialment. El grau d'ionització D és un valor que indica quina fracció de l'anàlit està en la seva forma ionitzada. Tal i com es mostra a l'equació (43), el grau d'ionització depèn tant del pH de la fase mòbil com del pK_a de l'anàlit i , com s'ha vist als apartats 1.3.3 i 1.3.4, aquests dos paràmetres varien en funció del tipus de modificador orgànic i de la composició de la fase mòbil. Per tant, un dels aspectes més importants a l'hora de predir amb exactitud la retenció d'anàlits amb propietats àcid-base ha de ser el de preveure amb la major precisió possible el grau d'ionització de l'anàlit. Això, inequívocament, comporta una bona modelació del pK_a de l'anàlit i del pH de la fase mòbil durant l'elució.

3.2.3.2.1. Estimació del pH

La manera de determinar l'evolució del pH amb la composició de la fase mòbil va ser utilitzant dades experimentals recollides a la sortida del sistema cromatogràfic. Així doncs, sense haver-hi mesura cromatogràfica, es va fer circular fase mòbil a diverses composicions en mode isocràtic (en aquest cas es va fer a 20%, 40%, 60% i 80%) i, a la sortida del sistema cromatogràfic (tub de residus), es va recollir aquesta fase mòbil per mesurar-ne el seu valor de s_w pH. Aquests valors es van ajustar després a una equació que modelés l'evolució del pH amb la fracció de modificador orgànic. En funció de la precisió que es vulgui tenir, es poden utilitzar equacions de major o menor complexitat, en aquest cas es va considerar que la modelació ja era prou bona utilitzant equacions de segon grau, així que es van ajustar els valors de pH mesurats a expressions com la següent:

$$^s_w pH = y_0 \varphi^2 + y_1 \varphi + y_2 \quad (58)$$

Aquest procediment es va dur a terme tant en fases mòbils de tipus acetonitril-aigua com de tipus metanol-aigua; en la Figura 15 s'observa l'evolució del pH dels diferents tampons, així com la manera diferent en què varien en funció del modificador orgànic utilitzat:

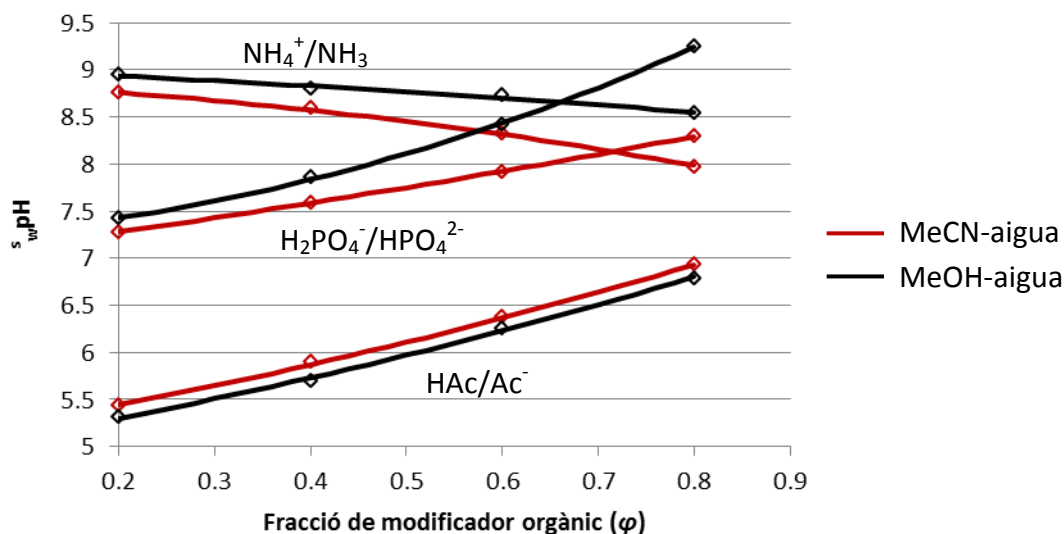


Figura 15. Evolució del pH dels diferents tampons utilitzats en funció de la fracció i naturalesa del modificador orgànic utilitzat

Tal i com es pot observar a la figura anterior, cada tampó mostra un comportament diferent en interaccionar amb el modificador orgànic. El tampó d'acetat a pH 5 mostra un comportament creixent de quasi dues unitats de pH i és força semblant independentment del modificador orgànic utilitzat. Per contra, el tampó de fosfat a pH 7 també mostra un augment en el valor de pH conforme puja la fracció de modificador orgànic, però aquest creixement és molt més pronunciat en fases mòbils amb metanol que en aquelles que contenen acetonitril. Per últim, per al tampó d'amoni a pH 9 s'observa un lleu comportament decreixent per als dos modificadors orgànics però, en aquest cas, són les fases mòbils amb acetonitril les que alteren més el pH de la solució amortidora (a una fracció de MeCN de 0.8 el pH varia una unitat mentre que, a la mateixa fracció de MeOH, el pH només disminueix mitja unitat).

Tenint en compte aquestes diferents evolucions es confirma que resulta essencial monitoritzar i modelar el comportament del s_w pH en funció de la composició de la fase mòbil, no solament perquè el valor de pH es pot arribar a modificar de forma molt significativa (especialment a fraccions altes de modificador orgànic) sinó perquè cada tipus de solució amortidora reacciona de forma diferent amb el solvent orgànic de la fase mòbil, donant lloc a diferents evolucions del valor de pH.

3.2.3.2.2. Estimació del pK_a

Durant aquest treball s'han utilitzat dues aproximacions diferents a l'hora d'estimar l'evolució del valor de pK_a en funció de la composició de la fase mòbil. Una d'elles consisteix en l'obtenció de valors de pK_a experimentals mitjançant l'equació (23). Per dur a terme aquest procés, el primer que cal fer és mesurar la retenció de l'anàlit a diversos valors de pH a una mateixa composició isocràtica de fase mòbil. Es recomana que això es faci per a un nombre considerable de valors de pH, ja que com més punts s'obtinguin més acurada serà la representació gràfica posterior. A títol d'exemple, per a fases mòbils preparades amb acetonitril, es van obtenir un total de 10 valors de retenció a diferents valors de pH, en les condicions que es mostren a la Taula 5.

Taula 5. Valors de pH escollits i solucions amortidores utilitzades per a la determinació de valors de pK_a experimentals (10 mM)

${}^w_w pH$	Tampó	${}^w_w pH$	Tampó
2.00	Àcid fosfòric	7.00	Fosfat
3.00	Àcid cítric	8.00	BIS-TRIS
4.00	Àcid fòrmic	9.00	Amoni
5.00	Acetat	10.00	Trietilamina
6.00	Citrat	11.00	Pirrolidina

Un cop obtinguts els valors de retenció, aquests es van representar respecte al pH al que van ser determinats i, posteriorment, es van ajustar a l'equació (23), obtenint així el valor de pK_a de l'anàlit i la retenció de les seves espècies neutra i ionitzada a la composició isocràtica de fase mòbil a la que es van fer les mesures. Cal recalcar que, tot i que les solucions amortidores es van preparar en base a valors de ${}^w_w pH$, cal representar gràficament la retenció envers el ${}^s_w pH$, per la qual cosa cal mesurar aquests valors amb anterioritat utilitzant el mètode descrit en l'apartat anterior per a la composició a la que s'estigui treballant.

Per tal de poder estimar el comportament del pK_a durant tot el procés d'elució, es realitzar aquest procés per a quatre composicions de fase mòbil diferents (20%, 40%, 60% i 80%), fet que va originar quatre valors de pK_a per a cada anàlit corresponents a aquestes diferents fraccions d'acetonitril. Aquests valors es van ajustar a una equació de segon grau de la mateixa manera que es va fer en la determinació de l'evolució del pH, descrita en l'apartat anterior; en aquest cas també es va considerar que l'equació (59) ja s'ajustava prou bé als punts experimentals obtinguts:

$${}^s_w pK_a = x_0 \varphi^2 + x_1 \varphi + x_2 \quad (59)$$

Aquest procediment de modelació del pK_a basat en dades experimentals es va fer servir a l'article 2 amb resultats força satisfactoris. Ara bé, també es va poder comprovar que era un procediment que requeria invertir molt temps i recursos, ja que calia mesurar de manera isocràtica la retenció de cada anàlit per a diferents valors de pH (10 en total) i per a diferents composicions de fase mòbil (4 en total), fet que el feia poc pràctic a l'hora de fer-lo servir de forma rutinària. Per aquest motiu, a l'article 3 es va proposar un mètode alternatiu per a modelar l'evolució del pK_a dels anàlits durant

el procés d'elució. Aquest mètode consisteix en estimar el valor de pK_a a qualsevol composició de la fase mòbil mitjançant equacions que utilitzen diferents coeficients empírics en funció del grup funcional de l'anàlit (equacions (24), (25) i (26)). Els grups funcionals estudiats i els seus coeficients respectius, tant per acetonitril com per metanol, es poden trobar a la Taula 1 de l'apartat 1.3.4.

El gran avantatge d'aquest mètode és que suposa un gran estalvi de temps, ja que els coeficients per a diversos grups funcionals ja estan establerts [57,72–75]. Per contra, aquesta manera d'estimar el pK_a presenta l'inconvenient de no ser un mètode basat en dades experimentals sinó en estimacions, per la qual cosa no pot no resultar un mètode tan acurat com l'anterior. L'objectiu principal de l'article 3 va ser comparar ambdues maneres de modelar l'evolució del pK_a durant l'elució cromatogràfica.

El primer que cal fer per estimar els valors de pK_a d'aquesta manera és identificar el grup funcional de cada compost per tal d'aplicar a les equacions els coeficients que li pertocuen. Aquest pas, que pot semblar senzill per a substàncies d'estructura simple, pot resultar més complicat en substàncies d'estructura més complexa, ja que s'ha d'identificar primer quin és el protó ionitzable de la substància i, posteriorment, assignar la substància a una família de compostos. En el cas que el grup funcional específic de la substància no fos cap dels anteriorment estudiats, es va aproximar al grup funcional més semblant per al qual ja s'haguessin determinat els coeficients. Els grups funcionals de les substàncies escollides per aquest treball es poden consultar en les Taula 3 (substàncies senzilles) i la Taula 4 (substàncies complexes).

Després de seleccionar el grup funcional de l'anàlit es determinen els valors dels paràmetres a_s i b_s a través dels coeficients corresponents a la família de compostos, que poden consultar-se a la Taula 1, i de la fracció de modificador orgànic de la fase mòbil (equacions (25) i (26)). Posteriorment, l'equació (24) permet la determinació del valor de ${}_s pK_a$ de l'anàlit en aquella composició de fase mòbil; per realitzar aquest càlcul cal conèixer prèviament el valor de ${}_w pK_a$ de l'anàlit. Per últim, l'equació (27) permet transformar els valors de ${}_s pK_a$ en valors de ${}_w pK_a$ a través del coeficient δ , un paràmetre que depèn de la fracció de modificador orgànic i que, per acetonitril i per metanol, es pot calcular mitjançant les equacions (17) i (18) respectivament.

Tal i com s'observa a l'article 3, l'aproximació experimental i l'aproximació calculada a l'evolució del pK_a amb la composició de la fase mòbil va donar lloc a comportaments molt semblants. En la Figura 16 es comparen ambdós tipus de modelacions per als àcids estudiats, mentre que a la Figura 17 es pot observar aquesta comparació per a les substàncies bàsiques, sempre fent servir acetonitril com a modificador orgànic:

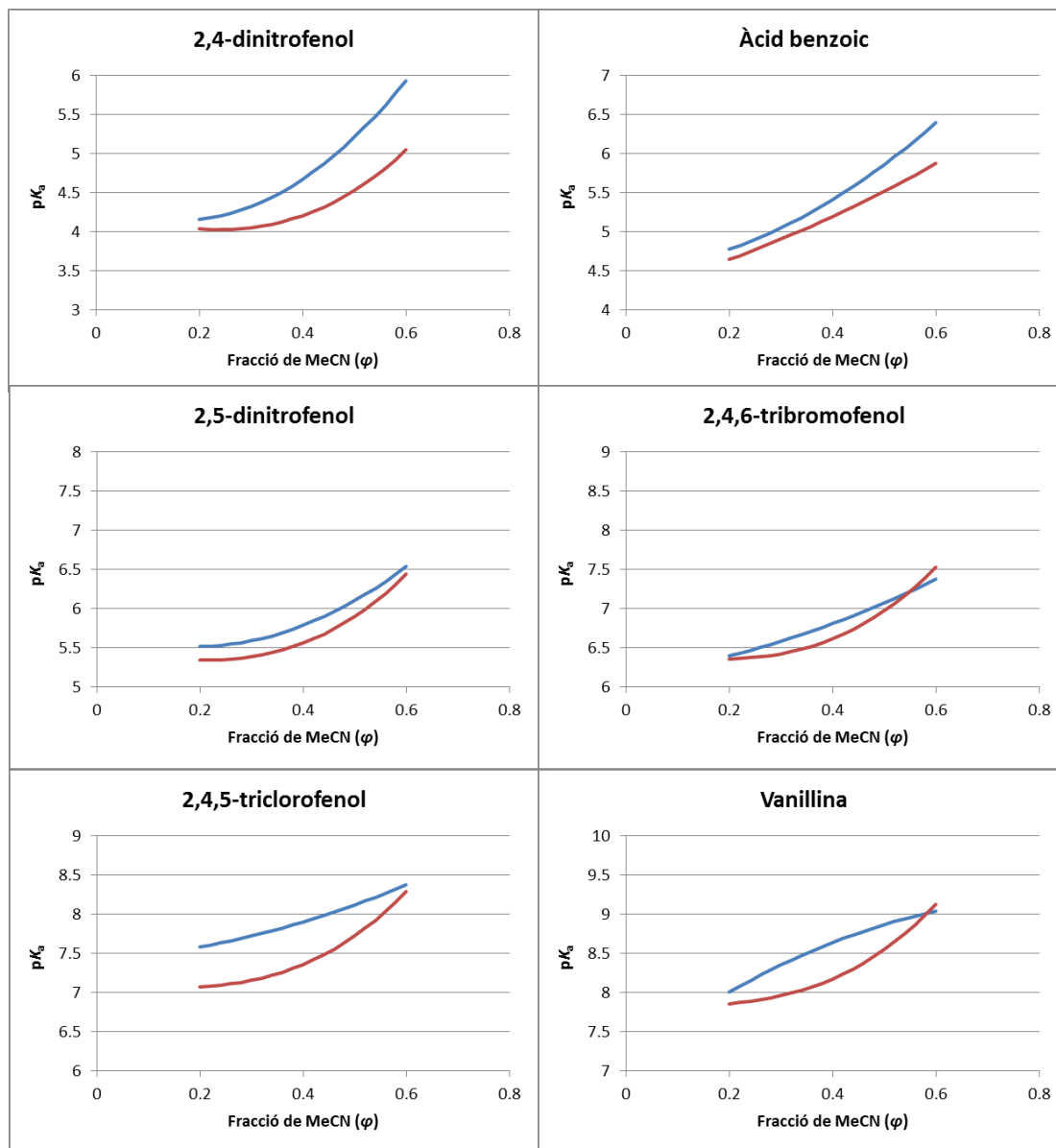


Figura 16. Comparació entre les aproximacions a l'estimació del comportament del pK_a en funció de la composició de la fase mòbil per a les substàncies àcides. La línia blava (—) representa el mètode experimental, la línia vermella (—) representa el mètode calculat

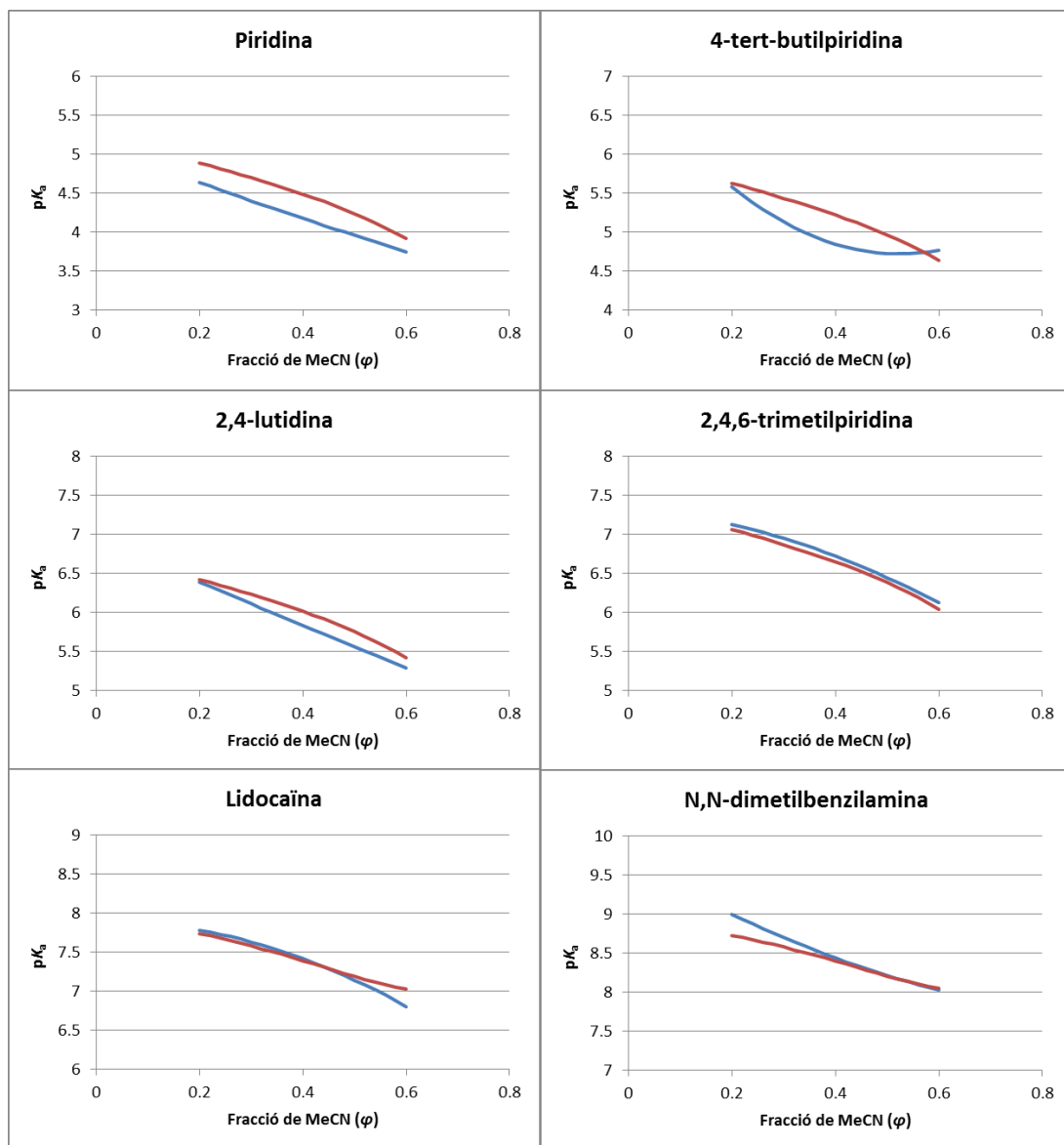


Figura 17. Comparació entre les aproximacions a l'estimació del comportament del pK_a en funció de la composició de la fase mòbil per a les substàncies bàsiques. La línia blava (—) representa el mètode experimental, la línia vermella (—) representa el mètode calculat

En la gran majoria de substàncies, ambdues aproximacions donen lloc a evolucions del pK_a semblants. Això és així especialment en les substàncies bàsiques ja que, com s'observa a la Figura 17, ambdues línies es troben extremadament properes o inclús es solapen durant bona part del gràfic per a la majoria de substàncies. Les substàncies àcides també donen força bé com a norma general, però hi ha alguna que altradesviació significativa. Aquestes diferències es troben a fraccions de modificador orgànic baixes per al 2,4,5-triclorofenol i a fraccions elevades per al 2,4-dinitrofenol

(on la diferència arriba pràcticament a ser d'una unitat de pK_a). Tenint en compte aquestes discrepàncies, és possible que les prediccions de la retenció d'aquestes dues substàncies en gradients en què aquestes composicions de fase mòbil siguin importants (gradients còncaus per a fraccions baixes, gradients convexos per a fraccions elevades) tinguin un cert component d'error sistemàtic en aquest sentit. De totes maneres, excepte aquests dos casos concrets, ambdues aproximacions donen resultats que es consideren com a suficientment similars, per la qual no sembla que substituir la modelació del pK_a experimental per la modelació calculada afecti de forma significativa a la predicció de la retenció.

Cal dir que en aquests gràfics només es realitza aquesta comparació de la modelació del pK_a fins a una fracció de modificador orgànic de 0.6, ja que tant en l'article 2 com en l'article 3 es treballa amb acetonitril i, per a aquest solvent, les equacions de càlcul del ${}^s_w pK_a$ només estan demostrades fins a aquesta composició. En l'article 4, per contra, aquesta aproximació s'ha utilitzat fins a una composició del 80% de metanol, ja que els coeficients estan validats per a fases mòbils que contenen fins a aquest percentatge de modificador orgànic.

3.2.3.3. Paràmetre f

El paràmetre f , tal i com ha quedat definit a l'equació (44), és la relació entre els factors de retenció de l'espècie ionitzada i l'espècie neutra. Depenent de l'aproximació que s'hagi seguit per determinar l'evolució del pK_a amb la fase mòbil (aproximacions descrites en l'apartat anterior), els valors d'aquests factors de retenció seran determinats d'una forma o d'una altra. D'aquesta manera, per a l'aproximació experimental es faran servir els valors obtinguts a través de l'equació (23), mentre que si es fa servir l'aproximació calculada caldrà aprofitar les mesures realitzades a pH 2 i pH 11 per a determinar els paràmetres propis del solut (prèviament explicats a l'apartat 3.2.3.1).

Teòricament, el paràmetre f hauria de ser constant per a la mateixa substància independentment de la composició de la fase mòbil però, en determinar els factors de retenció d'ambdues espècies a diferents composicions de fase mòbil, es va comprovar que això no era del tot cert. Així doncs, es va haver d'establir un criteri robust que

permetés la determinació d'aquest paràmetre de forma acurada. Després de considerar diverses maneres d'obtenir el valor del paràmetre f , es va decidir que el procediment més acurat seria determinar-lo a partir dels valors de retenció a una fracció baixa de modificador orgànic. Aquesta decisió es fonamenta en què a composicions de fase mòbil amb poca quantitat de solvent orgànic els temps de retenció són més llargs i, per tant, l'error que es pugui cometre a l'hora de mesurar aquesta retenció serà menor, donant lloc així a errors relatius molt petits. D'aquesta manera, guanyant fiabilitat en la determinació dels factors de retenció de les espècies neutra i ionitzada, també se'n guanya a l'hora de determinar el paràmetre f . Tot i que determinar el paràmetre f a fraccions de modificador orgànic baixes és l'opció que s'ha comprovat com a més acurada, la retenció d'algunes substàncies (especialment en la seva forma ionitzada) encara segueix sent força baixa, per la qual cosa la determinació del paràmetre f en aquests casos pot ser que porti associat un error experimental inevitable.

Per als articles 2 i 3, en els que es va treballar amb fases mòbils que contenien acetonitril, la composició de fase mòbil escollida per a la determinació del paràmetre f va ser un 20% de modificador orgànic, ja que era la composició inicial dels gradients estudiats. Per contra, durant l'estudi en metanol desenvolupat a l'article 4, el paràmetre f es va determinar a partir de dades de retenció al 40% de modificador orgànic en la fase mòbil. Aquest fet es va produir perquè, com ja s'ha explicat anteriorment en l'apartat 3.2.3.1, els temps de retenció d'alguns anàlits en fases mòbils amb un 20% de metanol són extremadament llargs i la seva determinació no és sempre possible, per la qual cosa calia buscar una composició de fase mòbil alternativa a la que es pogués determinar la retenció. Tenint en compte que el percentatge més baix al qual es va mesurar la retenció per a la determinació dels paràmetres de retenció propis del solut va ser el 40%, es va considerar que els temps de retenció obtinguts a aquest percentatge de metanol en la fase mòbil eren els més adequats per a la determinació del paràmetre f .

3.2.4. Avaluació de resultats

Els tres models de predicció es van posar a prova tal i com està descrit a l'article 2. Per fer això, per una banda es van injectar les 12 substàncies escollides per a tots els gradients i valors de pH seleccionats i, per l'altra, es va elaborar un full Excel que va permetre la predicció automàtica dels temps de retenció per a cadascun dels models un cop introduïts tots els paràmetres que influeixen en l'elució d'un anàlit amb propietats àcid-base: els paràmetres de retenció propis el solut (depenent del model utilitzat), l'equació d'estimació del pH de la fase mòbil i l'equació d'estimació del pK_a de l'anàlit (que conformen el grau d'ionització) i el valor del paràmetre f . Així mateix, també es van afegir dades generals del sistema cromatogràfic com el valor del temps mort i el valor del temps de residència (*dwell time*), imprescindibles per poder realitzar la predicció.

La Figura 18, dividida en les parts A, B i C en funció del model de predicció utilitzat, mostra la retenció predita representada com a funció de la retenció experimental utilitzant acetonitril com a modificador orgànic, així com una línia vermella de pendent 1 i ordenada a l'origen 0 que serveix com a referència. La proximitat dels punts a aquesta línia teòrica indica la qualitat de la predicció, ja que com més prop estigui el punt de la línia més bona serà aquesta. Per a aquesta figura, els rombes són punts obtinguts a pH 5, els quadrats són punts determinats a pH 7 i els triangles són punts corresponents a pH 9.

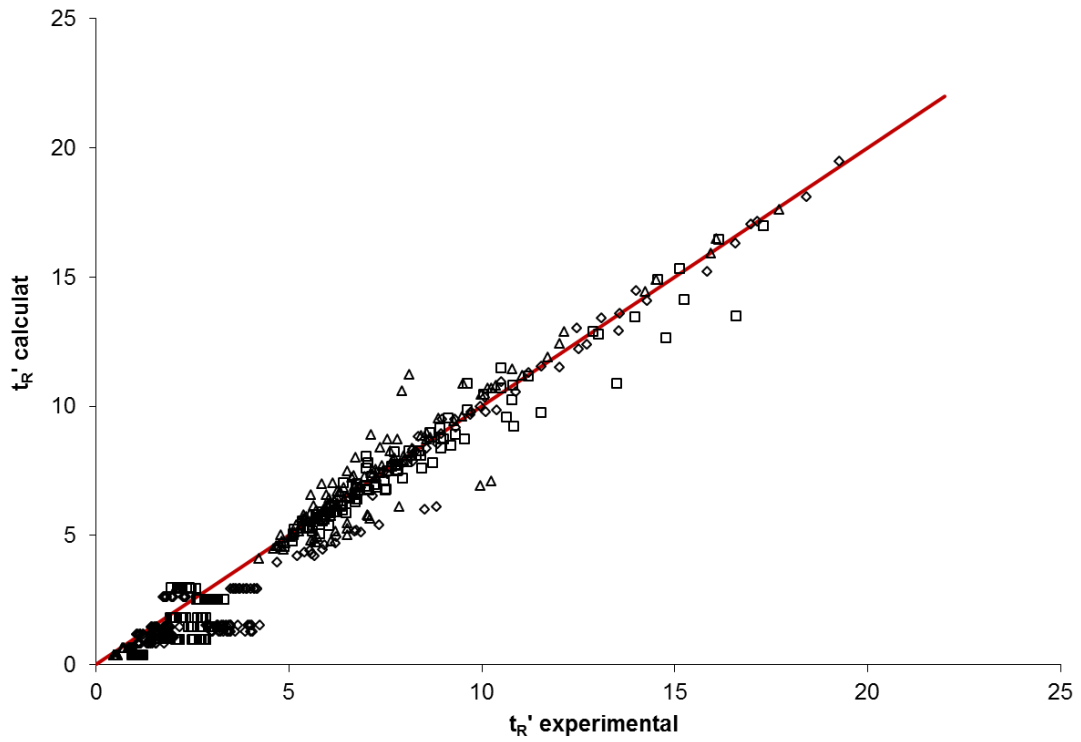


Figura 18A. Predicció per al model d'un paràmetre ($n = 576$) amb acetonitril com a modificador orgànic a pH 5 (\diamond), pH 7 (\square) i pH 9 (Δ)

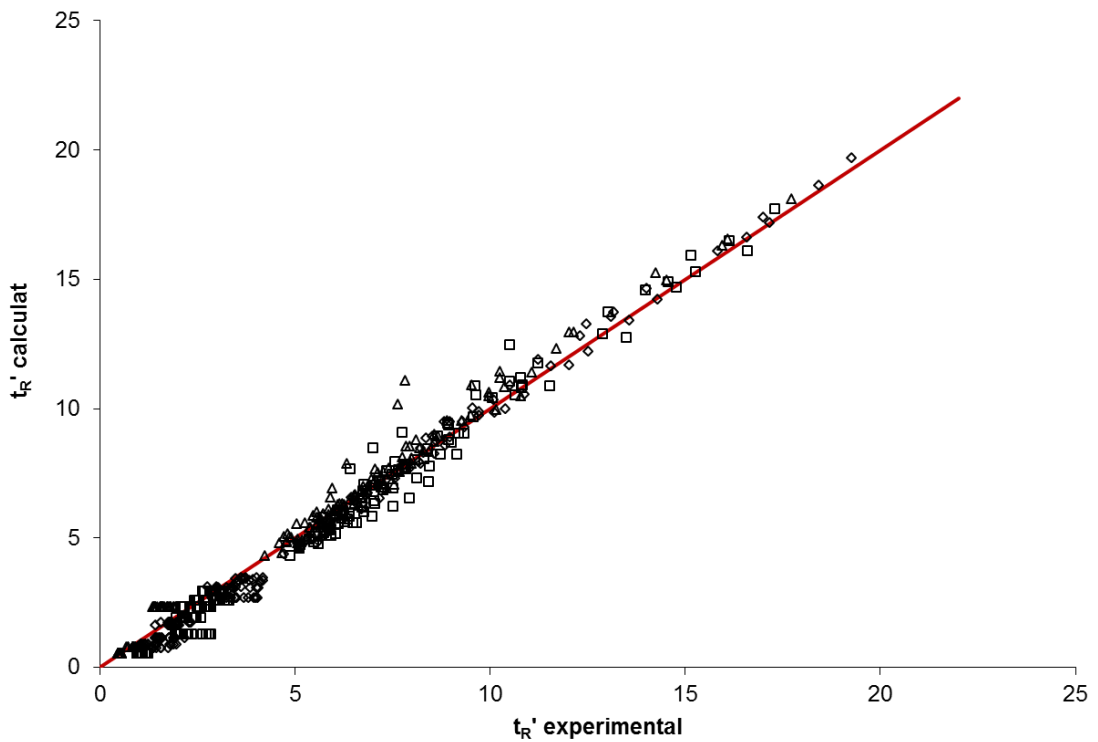


Figura 18B. Predicció per al model de dos paràmetres ($n = 576$) amb acetonitril com a modificador orgànic a pH 5 (\diamond), pH 7 (\square) i pH 9 (Δ)

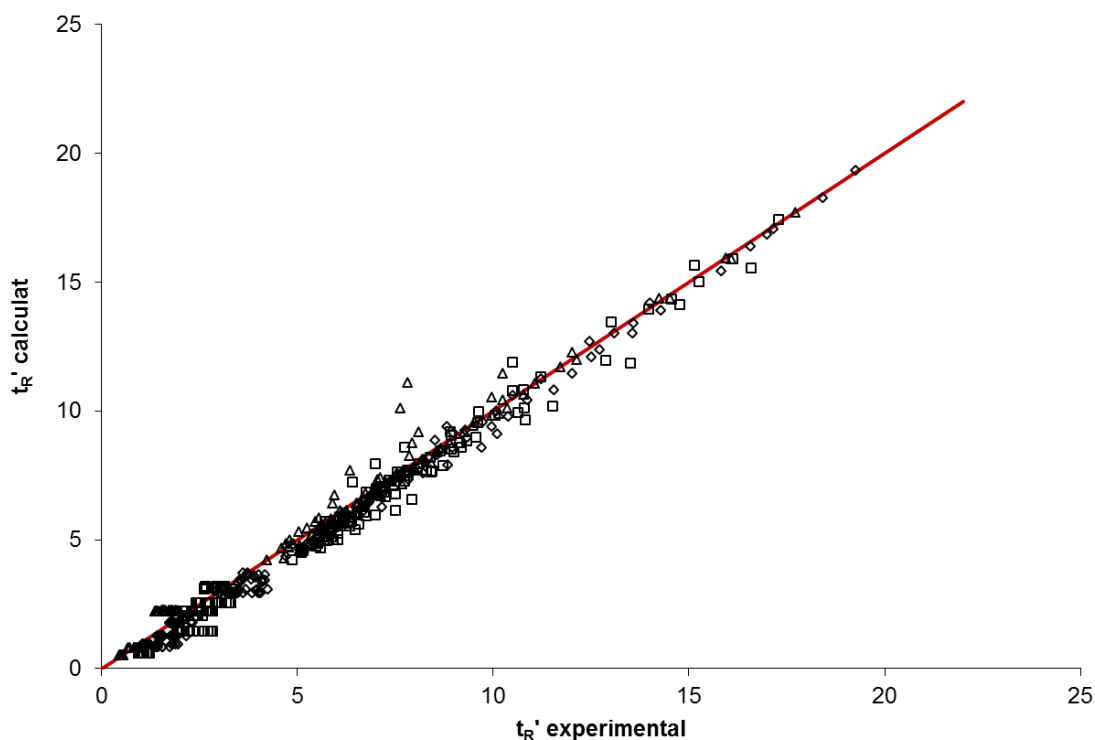


Figura 18C. Predicció per al model de tres paràmetres ($n = 576$) amb acetonitril com a modificador orgànic a pH 5 (\diamond), pH 7 (\square) i pH 9 (Δ)

Tal i com es pot comprovar a la Figura 18, els tres models de predicció donen resultats bons. El que més salta a la vista observant els resultats és que els models de dos i tres paràmetres són força bons però que, per contra, en el model d'un paràmetre (Figura 18A) s'observa força més dispersió al voltant de la línia teòrica, fet que indica que les seves prediccions no són tan fiables com en els altres dos models. Per aquesta raó, si bé resulta un model de ràpida aplicació quan el sistema cromatogràfic utilitzat està ja caracteritzat, es pot afirmar que el model d'un paràmetre no és tan acurat com els altres dos models estudiats i, per tant, només es recomana el seu ús en cas que es desitgi prioritzar la rapidesa a l'exactitud dels resultats. Per la seva banda, es pot veure com les prediccions corresponents als models de dos i de tres paràmetres són força acurades i tenen una exactitud força similar, ja que la gran majoria de punts estan propers a la línia teòrica. De fet, si s'observa amb deteniment la disposició dels possibles valors aberrants (punts que més disten de la línia teòrica), es veu com en ambdós gràfics (Figures 18B i 18C) són extremadament similars (destaquen els dos triangles, punts obtinguts a pH 9, amb un temps predit més alt que el calculat i a un

valor aproximat de 8 minuts en t_R' experimental), fet que assenjala la gran similitud entre les prediccions donades per aquests dos models. Tenint en compte aquesta gran similitud, es recomana utilitzar el model de dos paràmetres com a norma general degut a que la determinació de dos paràmetres comporta menys treball experimental previ que determinar-ne tres. Així doncs, seguint aquestes directrius i d'acord amb aquests resultats, en els següents articles de la tesi es va decidir treballar només amb el model de dos paràmetres.

Globalment, el model de dos paràmetres dóna lloc al gràfic que es mostra a la Figura 19, on hi figuren tots els punts obtinguts en la tesi, és a dir, amb fases mòbils de diversos valors de pH i que utilitzen tant acetonitril com metanol com a modificador orgànic. El gràfic inclou també els valors predits mitjançant la determinació experimental del pK_a i l'estimació d'aquest paràmetre mitjançant l'equació (27). Cal aclarir que el gràfic està expressat en termes de retenció de forma genèrica perquè durant el transcurs de la tesi, s'ha fet servir valors de temps de retenció ajustat (articles 2 i 3) i de temps de retenció (article 4).

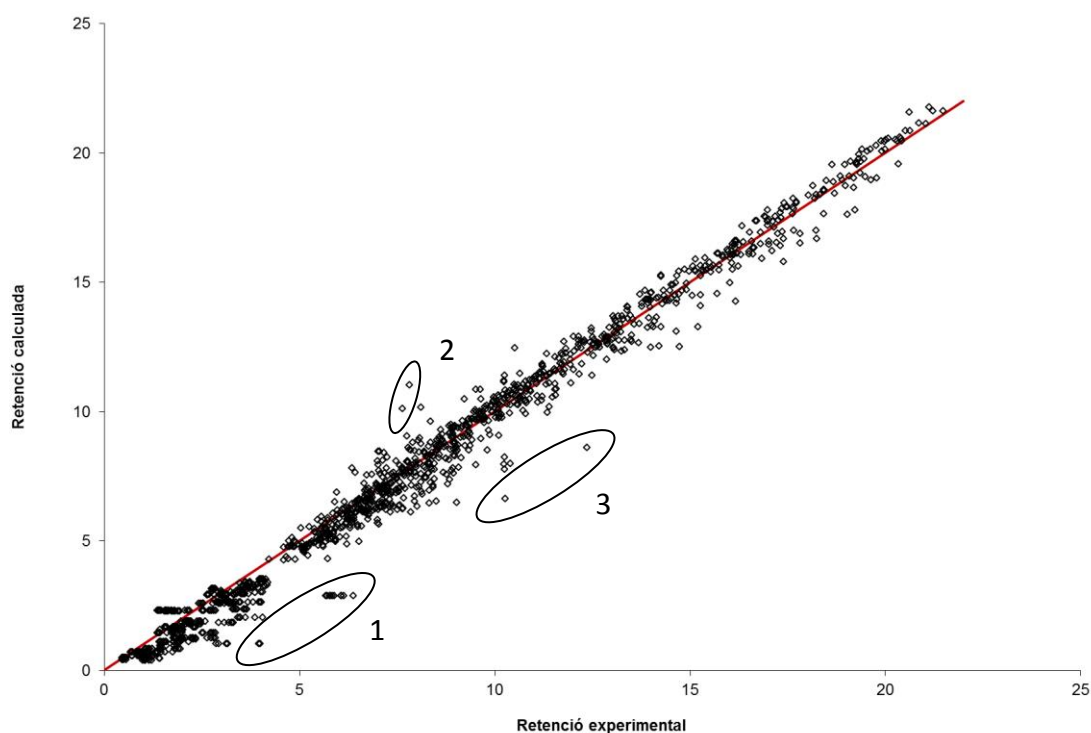


Figura 19. Resultats totals obtinguts per al model de dos paràmetres ($n = 1392$) amb acetonitril i amb metanol com a modificadors orgànics i a pH 5, 7 i 9

Aquesta figura dóna una idea força clara que el model de dos paràmetres, a nivell global, és un molt bon nivell de predicció de la retenció d'anàlits ionitzables en mode gradient. La gran majoria de punts estan molt prop de la línia teòrica i només hi ha tres grups de punts que s'escapen lleugerament d'aquesta tònica general i que s'expliquen a continuació:

- **Grup 1.** El grup 1 està format per mesures superposades de la lidocaïna en acetonitril a pH 5 segons l'aproximació del pK_a basada en equacions, més a l'esquerra, i diverses mesures de la clonidina en metanol a pH 5, més a la dreta. Cal dir que ambdues sèries de punts (així com d'altres substàncies presents en aquesta zona del gràfic) formen una línia horitzontal quan es representen gràficament. Això es deu a que la retenció predita és inferior al *dwell time* del sistema i per tant, sigui quin sigui el gradient aplicat, no afectarà a l'elució calculada ja que, segons la predicció, el gradient mai arribarà a la columna cromatogràfica. Per tant, tot i que els temps experimentals per als diferents gradients siguin diferents, la retenció predita per a tots els casos en aquestes condicions serà sempre la mateixa, i equivaldrà a l'elució en mode isocràtic a la composició de fase mòbil inicial del gradient (un 20% de modificador orgànic). A més de retencions predites inferiors al *dwell time* del sistema, per explicar l'error obtingut es pot dir que tant la lidocaïna com la clonidina són substàncies bàsiques amb valors de pK_a al voltant de 8 (tal i com es mostra a les taules 2 i 3) que, quan són analitzades a pH 5, tenen un grau d'ionització molt elevat. Segons el model de dos paràmetres (equació (55)), quan el grau d'ionització és elevat el paràmetre f pren rellevància, per la qual cosa es dedueix que una determinació no massa acurada del paràmetre f afecta de forma significativa quan l'anàlit està totalment ionitzat i, per tant, és quelcom que pot haver contribuït a aquests errors. Per al cas concret de la lidocaïna, tenint en compte que no s'observa cap error quan s'utilitza l'aproximació experimental, és possible que els factors de retenció de les espècies totalment ionitzada i totalment neutra (obtinguts a pH 2 i a pH 11) no siguin prou exactes i que, per tant, això doni lloc a un valor de f lleugerament erroni. Per altra banda, en el cas de la clonidina, possiblement el valor del paràmetre f a un 40% de metanol, composició on es va determinar el

paràmetre, sigui lleugerament diferent al valor de f a un 20%, la composició majoritària d'elució de l'anàlit.

- **Grup 2.** Aquests dos punts són discutits a l'article 2, corresponents a l'elució del 2,4,6-tribromofenol en un gradient còncav de 15 minuts a pH 9, utilitzant acetonitril com a modificador orgànic, amb la diferència que en un d'ells el gradient arriba fins a un 80% de d'acetonitril (punt més baix) mentre que en l'altre només arriba fins a un 60% (punt més alt). Tal i com es descriu a l'article, es va comprovar que existia una certa diferència entre la retenció de la forma ionitzada donada per l'equació (23) i la retenció experimental isocràtica del compost a pH 9. Tenint en compte que els gradients llargs còncavs passen força estona en una composició de fase mòbil propera al 20%, es pot trobar certa similitud entre l'elució en aquests gradients i l'elució isocràtica a un 20% i, per aquest motiu, resulta lícit dir que la diferència observada durant la construcció de la corba de pK_a es pot traslladar a la predicció de l'elució en gradient.
- **Grup 3.** Aquests dos punts, descrits a l'article 4, representen l'elució amb fases mòbils que contenen metanol del 2,4-dinitrofenol (més a l'esquerra) i el 2,5-dinitrofenol (més a la dreta) utilitzant un gradient de 15 minuts còncav a pH 7. En aquest cas, dos possibles motius expliquen la gran diferència entre la retenció experimental i la retenció predita. El primer és una estimació errònia de l'ionització dels anàlits. Segons el model de predicció, ambdós compostos estan totalment ionitzats en les condicions de treball i, de fet, així es reflecteix en unes retencions estimades a pH 7 i a pH 9 que són pràcticament equivalents. En canvi, la retenció experimental és ostensiblement més elevada a pH 7 que a pH 9 (de l'ordre de 3 minuts per a ambdues substàncies), fet que fa pensar que en realitat el compost no està totalment ionitzat i que, per aquesta raó, es reté més del que preveu el model de predicció. L'altre factor que afecta a aquestes dues prediccions torna a ser, com en el cas del grup 1, la determinació del paràmetre f . És possible que el valor del paràmetre f determinat a un 40% de modificador orgànic sigui lleugerament diferent al valor a un 20%, i això afecta especialment als gradients còncavs ja que aquests romanen la majoria de temps a una composició de fase mòbil força propera al valor inicial de gradient (en aquest cas,

precisament, un 20% de metanol). Per tant, en gradients còncaus com els representats en aquests punts, és més probable que aquest possible error en la determinació del paràmetre f pugui afectar significativament a la predicció de la retenció.

Adicionalment, en l'article 3 es discuteixen alguns punts més, com per exemple l'error sistemàtic en gradients còncaus per al 2,4,5-triclorofenol prèviament previst a la secció 3.2.3.2 degut a la diferència entre les dues aproximacions a la modelació de l'evolució del pK_a . Ara bé, tot i que eren punts que destacaven dins del marc de l'article 3, en adoptar una aproximació més global a la predicció de la retenció no s'observa que aquestes prediccions presentin errors significatius, per la qual cosa es pot afirmar que els petits errors que s'aprecien a l'article 3 quant a la modelació de l'evolució del pK_a no influeixen significativament en el global del model de predicció. Per aquest motiu, es considera que l'aproximació a partir de les equacions (24) a (27) és la manera més adequada de modelar el pK_a , ja que l'estalvi que aquesta aproximació comporta quant a temps i recursos invertits en realitzar el treball experimental previ compensa amb escreix la lleugera pèrdua de qualitat en les prediccions que suposa el seu ús.

Per últim, un dels objectius d'aquest treball era el de desenvolupar un model capaç d'englobar a qualsevol substància que, en les condicions de treball, funcionés com un compost monoprotic. Per aquesta raó, a l'article 4 es van incloure diverses substàncies d'estructura moderadament complexa (que es pot consultar a la Figura 1 d'aquest article) i de pes molecular elevat. Tal i com es pot observar a la Figura 20, la predicció de la retenció d'aquestes substàncies va ser globalment força acurada. En aquesta figura es pot observar com, a excepció del bloc de punts corresponents a la clonidina a pH 5 comentat anteriorment com a part del Grup 1 de la Figura 19, el model de predicció funciona força bé per a substàncies voluminoses, d'una manera semblant, fet que demostra que el model és robust per a qualsevol tipus de substància que es vulgui analitzar.

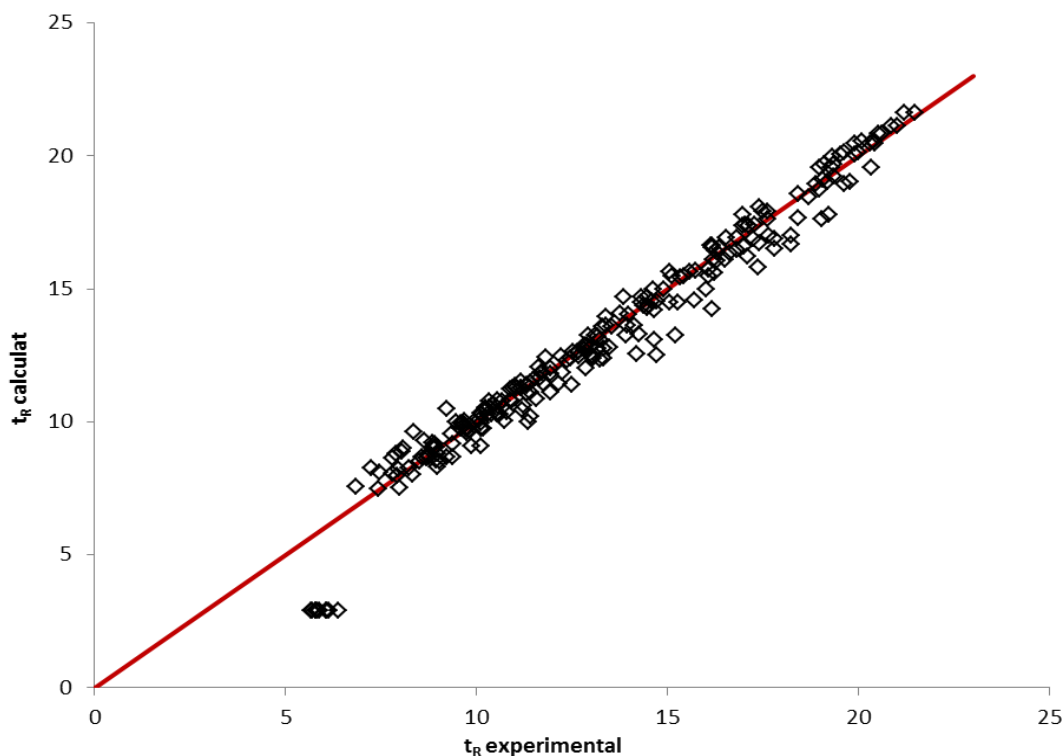


Figura 20. Comparació dels temps de retenció experimentals i els temps de retenció predits per a substàncies estructuralment complexes

Així doncs, tot i que existeixen una minoria de punts que s'escapen més del que seria desitjable, el model de dos paràmetres s'ha fet servir amb èxit en els dos modificadors orgànics més habituals per a un conjunt ampli de substàncies, partint de diferents valors de pH de la fase mòbil i dissenyant diferents gradients d'elució. Això el converteix en un model robust i fiable i, per aquest motiu, es pot afirmar que és una eina molt bona per a la predicció de la retenció d'anàlits amb propietats àcid-base en mode gradient.

3.3. DETERMINACIÓ DE LA LIPOFILICITAT MITJANÇANT UNA VERSIÓ OPTIMITZADA DEL MÈTODE DE SHAKE-FLASK

La lipofilitat d'una substància, mesurada habitualment per mitjà del $\log P$ (coeficient de partició) o del $\log D$ (coeficient de distribució), és una de les propietats més interessants avui en dia per a la indústria farmacèutica. Això és degut a que, en definir-se com el coeficient per al qual un compost es distribuirà entre un solvent aquós i un solvent orgànic, dóna una idea força exacta de com interaccionaran aquests compostos amb les membranes cel·lulars que conformen els diferents teixits i sistemes biològics del cos humà. Un resum general d'aquestes interaccions pot consultar-se a la Taula 1 de l'article 5. D'entre totes les maneres de mesurar la lipofilitat, el mètode de *shake-flask* s'ha establert com el de referència, ja que és un procediment experimental que s'assembla força al procés actual de partició en una membrana biològica. No obstant, el mètode de *shake-flask* presenta algunes limitacions i, per aquest motiu, optimitzar el mètode de referència es converteix pràcticament en una necessitat. Essencialment, aquesta optimització es tradueix en modificar el mètode per tal que sigui apte per a substàncies compreses en un interval més ampli de valors de lipofilitat i fer-lo adequat per a quantitats petites de mostra, ja que la indústria farmacèutica cada cop sintetitza una quantitat més gran de compostos candidats a ser fàrmacs (de valors de lipofilitat molt variables) però ho fa en poca quantitat. En aquest sentit, les millores al mètode de *shake-flask* no solament pretenen fer possible la utilització de poca quantitat de substància sinó que, addicionalment, intenten partir de la solució del compost en DMSO, ja que aquesta és la forma en què els compostos solen estar emmagatzemats a les llibreries de substàncies de les indústries farmacèutiques.

3.3.1. Optimització del mètode de *shake-flask*

L'optimització del mètode de *shake-flask* presenta dos aspectes principals. El primer és el de proposar una o més d'una relació de volums entre les dues fases que participen en el procés de distribució, relació que a partir d'ara s'anomenarà partició. Posteriorment, caldrà dissenyar procediments que permetin l'ús d'aquestes particions, tenint en compte sempre els possibles problemes de caire experimental que puguin anar sorgint. Cal aclarir que la determinació dels compostos d'interès es farà, en aquest treball, mitjançant la cromatografia de líquids (tant HPLC com UPLC).

3.3.1.1. Establiment de particions

Atès que la concentració és la relació entre la massa d'una espècie (m_x) i el volum del solvent en la que estigui continguda (V_x), l'equació (46) es converteix en l'equació (60) després d'una reorganització dels termes:

$$\log \frac{m_o}{m_w} = \log D - \log \frac{V_w}{V_o} \quad (60)$$

on els subíndexs o i w fan referència a la fase octanòlica i a la fase aquosa respectivament. Una bona mesura de la lipofilitat es dona quan, aproximadament, hi ha la mateixa quantitat de compost a les dues fases de la partició, si una de les dues concentracions és molt baixa podria haver-hi problemes de detecció i la quantificació podria comportar un error relatiu molt gran o inclús arribar a límits en els que el pic cromatogràfic no s'observés. Si s'adapta aquesta condició per realitzar les mesures experimentals (de manera que la part esquerra de l'equació (60) sigui propera a 0), s'observa que la relació entre els volums d'ambdós solvents no solament és important sinó que a més cal que sigui el més semblant possible al coeficient de distribució D de l'anàlit. Així doncs, per tal de garantir que el mètode de *shake-flask* fos aplicable per a substàncies compreses en un interval ampli de $\log D$, es van proposar una sèrie de particions on la relació de volums cobrés un interval ampli de lipofilitat. Les particions proposades es mostren a la Taula 6.

Taula 6. Volums de la fase aquosa (V_w) i de la fase octanòlica (V_o) per a les particions proposades

Partició	V_w (mL)	V_o (mL)	$\log V_w/V_o$
a	0.05	5	-2
b	0.2	5	-1.4
c	0.5	5	-1
d	0.5	0.5	0
e	1	0.1	1
f	1	0.01	2
g	3	0.01	2.5
h	5	0.01	2.7

Així doncs, la lipofilitat de les substàncies hidrofíliques estarà ben determinada mitjançant particions on el logaritme decimal de la relació de volums sigui negatiu mentre que per a mesurar la lipofilitat de les substàncies hidrofòbiques caldrà utilitzar particions on el logaritme de la relació de volums sigui positiu. Cal recalcar que, tot i que es podrien haver proposat particions amb una relació de volums més favorable a la fase aquosa per abarcar compostos amb lipofilitat encara més elevada, les particions es van cenyir a volums amb els quals resulta raonable treballar, és a dir, que es puguin mesurar, equilibrar i injectar correctament. La relació entre la lipofilitat d'un compost, la concentració del compost que s'espera a cada fase i la partició que es recomana utilitzar queda sintetitzada a la Figura 21. Per últim, cal afegir que, tenint en compte que en funció de la lipofilitat del compost es recomana utilitzar una o altra partició, abans de dur a terme la mesura experimental de la lipofilitat del compost mitjançant el mètode de shake-flask és necessari fer una estimació prèvia d'aquesta lipofilitat. Així doncs, per a poder comprovar el mètode proposat els valors de $\log D_{7.4}$ es van buscar prèviament a la base de dades BioLoom [79]. Un cop es coneix el valor teòric de lipofilitat, es fa la mesura utilitzant la partició amb la relació de volums que més s'hi acosta i, posteriorment, per tal de donar robustesa als resultats, es realitza la determinació utilitzant la partició immediatament superior i la partició immediatament inferior a la recomanada.

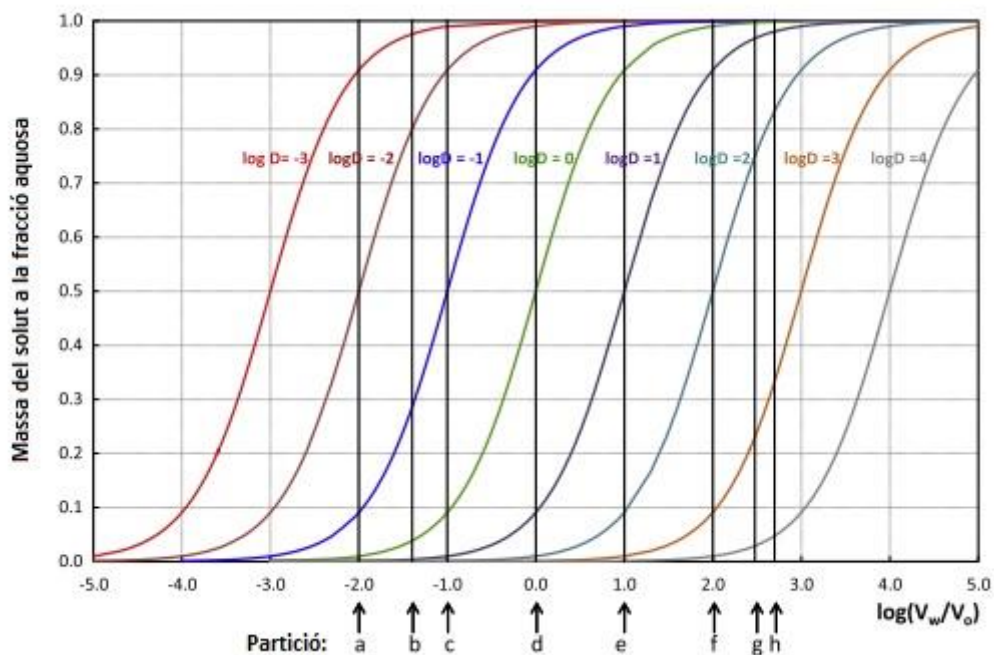


Figura 21. Particions recomanades en funció de la lipofilitat del compost

3.3.1.2. Desenvolupament de procediments

Tal i com s'ha comentat a la introducció, la manera més correcta de determinar la lipofilitat d'un compost pel mètode de *shake-flask* és mesurant la concentració d'ambdues fases. Tanmateix, la injecció d'un solvent de viscositat elevada com l'octanol en HPLC pot comportar problemes ja que tendeix a quedar-se dins del sistema cromatogràfic, fet que requereix la implementació d'un sistema exhaustiu de neteja, i fins i tot pot arribar a deteriorar la fase estacionària de la columna. Per aquest motiu, Valkó va proposar l'equació (50), una equació que permet calcular la lipofilitat dels compostos només injectant la fase aquosa [151] mitjançant la resta entre la massa de l'anàlit present en una solució patró aquosa mesurada abans de dur a terme la partició i la massa de l'anàlit en la fase aquosa injectada un cop la partició ha estat realitzada. Si es tenen en compte els diferents volums d'injecció que es poden fer servir per a mesurar ambdues concentracions, l'equació (50) es converteix en l'equació (61):

$$\log D = \log \left(\left(\frac{A_{st} v_{inj(w)}}{A_w v_{inj(st)}} r - 1 \right) \frac{V_w}{V_o} \right) \quad (61)$$

en la que A_{st} i A_w són les àrees del pic cromatogràfic corresponents, respectivament, a la solució patró i a la fase aquosa, i són proporcionals a la massa de compost injectada d'acord amb el volum corresponent d'injecció. $v_{inj(w)}$ i $v_{inj(st)}$ són els volums d'injecció de cada solució, r és el factor de dilució de la solució patró (en cas que una dilució sigui necessària) i V_w i V_o són els volums de cada solvent presents en la partició.

Per poder aplicar aquesta equació es va seguir un procediment experimental, anomenat procediment 1 a l'article 5, consistent en diluir una petita quantitat de la solució 10 mM en DMSO de l'anàlit utilitzant la solució amortidora de pH 7.4 (el factor de dilució pot variar, en aquest treball s'ha agafat una proporció de 1:100). Aquesta solució és la que es considera com a solució patró i, per una banda serveix per determinar el valor de A_{st} . A més, el seu volum s'utilitza per realitzar les diferents particions juntament amb la quantitat corresponent d'octanol. Tanmateix, es va comprovar que certes particions no es poden dur a terme mitjançant aquest procediment degut a l'aparició de problemes de caire experimental (com per exemple poden ser la precipitació de l'anàlit o la impossibilitat d'injectar la fase aquosa degut al seu poc volum en la partició), per la qual cosa es va fer necessari dissenyar i utilitzar procediments alternatius per poder mesurar la lipofilitat de substàncies molt hidrofíliques i de substàncies molt lipofíliques (també conegudes com a hidrofòbiques).

A l'hora de tractar amb les substàncies hidrofíliques, un dels problemes principals és que, en algunes particions, no hi ha prou volum de fase aquosa com per poder fer la mesura cromatogràfica (cas de les particions *a* i *b*), la qual cosa impossibilita la mesura de la fase aquosa de la partició i, per tant, l'aplicació de l'equació (61). En aquest cas, tot i que no és massa recomanable a nivell experimental, l'única alternativa viable seria mesurar la concentració de l'anàlit a la fase octanòlica, sempre tenint en compte que el detector tingui la suficient sensibilitat. Aquest procediment va rebre el nom de procediment 2 i, si és el procediment que es segueix, l'expressió de càlcul que s'haurà d'utilitzar és la següent:

$$\log D = \log \frac{1}{\frac{A_{st} v_{inj(o)} - V_o}{A_o v_{inj(st)} V_w}} r \quad (62)$$

Per la seva banda, els compostos molt lipofílics no presenten problemes a l'hora de determinar la lipofilitat, especialment si es disposa d'un detector sensible, sinó que els presenten durant el procés experimental de preparació de les particions. Les substàncies amb elevada lipofilitat solen ser insolubles en solucions aquoses (com és el cas de la solució amortidora de pH 7.4) per la qual cosa, en fer la primera dilució amb la solució amortidora, moltes d'elles precipiten. Per evitar aquest fenomen, es van proposar dues alternatives diferents. La primera, anomenada procediment 3, va consistir en fer la primera dilució (des de la solució 10 mM en DMSO) utilitzant octanol en comptes de solució amortidora aquosa, obtenint d'aquesta manera una solució patró en octanol amb l'anàlit totalment solubilitzat. Aquesta solució patró es va fer servir per realitzar les particions i, posteriorment, es va mesurar la concentració en la fase aquosa com en el procediment 1. L'expressió a aplicar per a la determinació de la lipofilitat, en aquest cas, és la següent:

$$\log D = \log \left(\frac{A_{st(o)} v_{inj(w)} r - \frac{V_w}{V_o}}{A_w v_{inj(st)}} \right) \quad (63)$$

L'altra alternativa, que va rebre el nom de procediment 1b, va consistir en fer la primera dilució en solució amortidora però fer la segona (la dilució 1:r per a la mesura de la concentració del patró) en DMSO, per la qual cosa el precipitat de la solució patró es redissolia. Per altra banda, en les particions no existia precipitat ja que aquest es redissolia en afegir la quantitat d'octanol corresponent. En aquest cas, com en el procediment 1, l'equació adequada per calcular la lipofilitat del compost és l'equació (61), simplement cal tenir en compte que el factor r en aquest cas representa la dilució en DMSO.

Informació més detallada sobre els quatre procediments diferents emprats en aquest treball es pot trobar a l'article 5, tant explicats en el text com especialment en la Figura 2, en la qual s'observa un diagrama de flux de tots els procediments que s'han utilitzat en aquest estudi en funció de la lipofilitat dels diferents compostos.

Adicionalment a la proposta dels diferents procediments específics per a cada tipus de substàncies, cal esmentar algunes consideracions generals. La primera fa referència a la preparació de les dues fases amb les que després es realitzaran les particions. Com s'ha dit a la introducció, tot i que a priori són solvents immiscibles i

això és el que permet la formació de dues fases i la posterior mesura de la lipofilitat, l'aigua i l'octanol no són completament immiscibles. Per aquest motiu, per assegurar que els volums emprats per realitzar les particions són exactament els que es proposen, la solució aquosa tamponada a pH 7.4 es va saturar amb octanol amb anterioritat a la preparació de les particions. Per la seva part, l'octanol que es va utilitzar posteriorment per a realitzar les diferents particions també es va saturar amb solució amortidora de pH 7.4 per la mateixa raó. Per altra banda, també cal fer esment del temps d'agitació de les particions necessari per a que l'anàlit es distribueixi correctament entre les dues fases. Per a diversos anàlits es va mesurar la lipofilitat utilitzant les mateixes particions després d'agitar els vials on estaven contingudes durant 1 hora, 2 hores i 24 hores. Els resultats van ser molt semblants entre ells, per la qual cosa es va decidir que una hora d'agitació era temps suficient perquè l'anàlit es repartís correctament entre les dues fases.

3.3.2. Avaluació de resultats

Per verificar la validesa del model, es va seleccionar un conjunt de 28 substàncies amb valors de $\log D_{7.4}$ obtinguts a partir de la base de dades BioLoom [79] compresos en un interval entre -2 i 4.5. En un primer moment, les determinacions de lipofilitat es van fer emprant un instrument HPLC per a l'anàlisi. Posteriorment, procediments i particions es van transferir a una empresa farmacèutica, que va realitzar mesures de lipofilitat de les mateixes substàncies utilitzant un instrument UPLC per a la quantificació final. Per a més especificacions sobre la metodologia experimental i la instrumentació utilitzada, pot consultar-se la secció corresponent de l'article 5. Els resultats obtinguts per a ambdós instruments, juntament amb el valor teòric de $\log D_{7.4}$, es troben resumits a la taula 7.

Taula 7. Determinacions del $\log D_{7,4}$ per al set de 28 substàncies

Substància	$\log D_{7,4}$		
	Tabulat	Experimental (HPLC)	Experimental (UPLC)
Atenolol	-1.94	-1.81 ± 0.23	—
Àcid salicílic	-1.65 ± 0.59	-1.85 ± 0.14	-1.43 ± 0.11
Àcid benzoic	-1.43	-1.27 ± 0.15	-1.27 ± 0.19
Metoprolol	-0.15 ± 0.24	-0.28 ± 0.10	-0.33 ± 0.06
Cafeïna	-0.07	-0.04 ± 0.12	-0.03 ± 0.01
Teofil·lina	-0.02	-0.03 ± 0.09	-0.01 ± 0.03
Procaïna	0.23	0.28 ± 0.17	0.29 ± 0.05
Paracetamol	0.51	0.39 ± 0.13	0.33 ± 0.02
Warfarina	0.88 ± 0.28	0.83 ± 0.19	0.91 ± 0.05
Colquicina	1.30	1.09 ± 0.05	1.15 ± 0.03
Acetanilida	1.16	1.19 ± 0.05	1.19 ± 0.04
Propranolol	1.24 ± 0.15	1.23 ± 0.05	1.22 ± 0.06
Lidocaïna	1.53 ± 0.26	1.61 ± 0.26	1.70 ± 0.19
Acetofenona	1.58	1.57 ± 0.16	1.55 ± 0.16
Hidrocortisona	1.61	1.58 ± 0.12	—
Propiofenona	2.19	2.24 ± 0.16	1.98 ± 0.19
Butirofenona	2.66	2.65 ± 0.23	2.66 ± 0.10
Haloperidol	2.92 ± 0.34	2.77 ± 0.26	2.78 ± 0.09
Valerofenona	—	3.40 ± 0.14	3.22 ± 0.12
Naftalè	3.3	3.19 ± 0.14	3.21 ± 0.25
Timol	3.3	3.34 ± 0.23	3.32 ± 0.05
Ketoconazol	3.83	3.42 ± 0.20	3.36 ± 0.15
Reserpina	3.72	3.89 ± 0.21	4.27 ± 0.18
Hexanofenona	—	3.69 ± 0.23	4.05 ± 0.32
Fenotiazina	4.15	4.11 ± 0.22	4.02 ± 0.04
Heptanofenona	—	4.41 ± 0.27	4.52 ± 0.16
Antracè	4.45	4.49 ± 0.23	4.37 ± 0.23
Fenantrè	4.47	4.58 ± 0.09	—

Com es pot observar a la taula 8, els resultats obtinguts són molt bons. Tal i com s'esperava, ja que és la zona de lipofilitat més estudiada i en la qual el procediment experimental està ben establert, les determinacions de substàncies amb $\log D_{7,4}$ intermedi (aproximadament entre -0.5 i 3.5) han donat resultats força propers als valors tabulats que s'han agafat com a referència. Tanmateix, els compostos amb $\log D_{7,4}$ molt baix (substàncies hidrofíliques) o molt alt (substàncies hidrofòbiques) també han donat resultats raonablement acurats. Tant és així que, en el cas de les mesures en HPLC, totes les substàncies excepte una estan dins d'un interval de ± 0.3 unitats

logarítmiques i només el ketoconazol supera aquest marge. De totes maneres, veient que el valor obtingut en UPLC és molt més semblant al valor obtingut en HPLC que no al valor tabulat, resulta lícit pensar que els valors experimentals són propers al valor real de lipofilicitat del compost mentre que el valor de la base de dades no és prou exacte. En el cas de les determinacions realitzades amb l'instrument UPLC, 23 de les 25 substàncies analitzades també cauen dins de l'interval de ± 0.3 i només el prèviament esmentat ketoconazol i la reserpina s'escapen lleugerament d'aquest criteri d'exactitud. Així doncs, es pot parlar d'una combinació de particions i procediments força exacta per a l'interval de lipofilicitat de treball.

Quant a precisió, la EPA considera que un criteri acceptable en el mètode de *shake-flask* és que la desviació estàndard no superi les 0.3 unitats logarítmiques [148]. Tot i utilitzar un nombre considerable de particions en la determinació de la lipofilicitat de cada substància, com a mínim dues i fins a un màxim de cinc, la desviació estàndard de les determinacions en HPLC està sempre per sota d'aquest valor. En el cas de la determinació en UPLC, quasi totes les determinacions tenen desviacions estàndard compreses en l'interval de precisió acceptable (només les mesures de l'hexanofenona donen un valor lleugerament superior), per la qual cosa es pot dir que el mètode és, a més d'exacte, també força precís. Més específicament, en els dos tipus de mesures realitzats (especialment en UPLC) es pot veure com en la zona on idealment es fan servir les particions *d*, *e* i *f* la precisió és força alta, amb valors que en alguns casos són molt propers al 0, mentre que en zones de lipofilicitat més extrema els valors de desviació estàndard són, com a norma general, una mica més elevats. Així doncs, el que ens indiquen aquestes dades de precisió és que el mètode és molt reproducible a lipofilicitats intermèdies però que, per a compostos hidrofílics i compostos hidrofòbics, l'optimització proposada al mètode de shake-flask també funciona de forma raonablement bona. Per a una informació més exhaustiva sobre els procediments i les particions utilitzades per a cada compost, així com els resultats específics obtinguts per a cadascuna d'elles, es pot consultar a la Taula 5 de l'article 5.

A més del que són els propis resultats, d'aquesta taula cal remarcar alguns aspectes addicionals. Primerament, cal dir que quan el valor de $\log D_{7.4}$ de referència és únic és degut a que és el recomanat per la base de dades BioLoom, mentre que quan té una

desviació estàndard associada és perquè s'ha fet la mitjana entre diversos valors de la base de dades ja que cap d'ells ha estat designat com a referència pels gestors de BioLoom. A més, cal afegir que per a les caselles marcades amb una línia no es disposa d'informació, ja siguin valors teòrics procedents de la base de dades o valors de lipofilitat de substàncies que, amb l'instrument UPLC, no es van poder realitzar.

Adicionalment, els procediments 1 i 1b es van transferir a una empresa externa que proporciona serveis de recerca a la indústria farmacèutica (CEREP). Aquesta empresa va comprovar la robustesa d'aquests procediments mesurant la lipofilitat de sis noves substàncies amb valors teòrics de $\log D_{7,4}$ compresos entre 0.5 i 3.8. Els resultats obtinguts es van comparar amb el valor mitjà de diverses determinacions fetes mitjançant UPLC (realitzades per tres analistes diferents) i es mostren a la Figura 22.

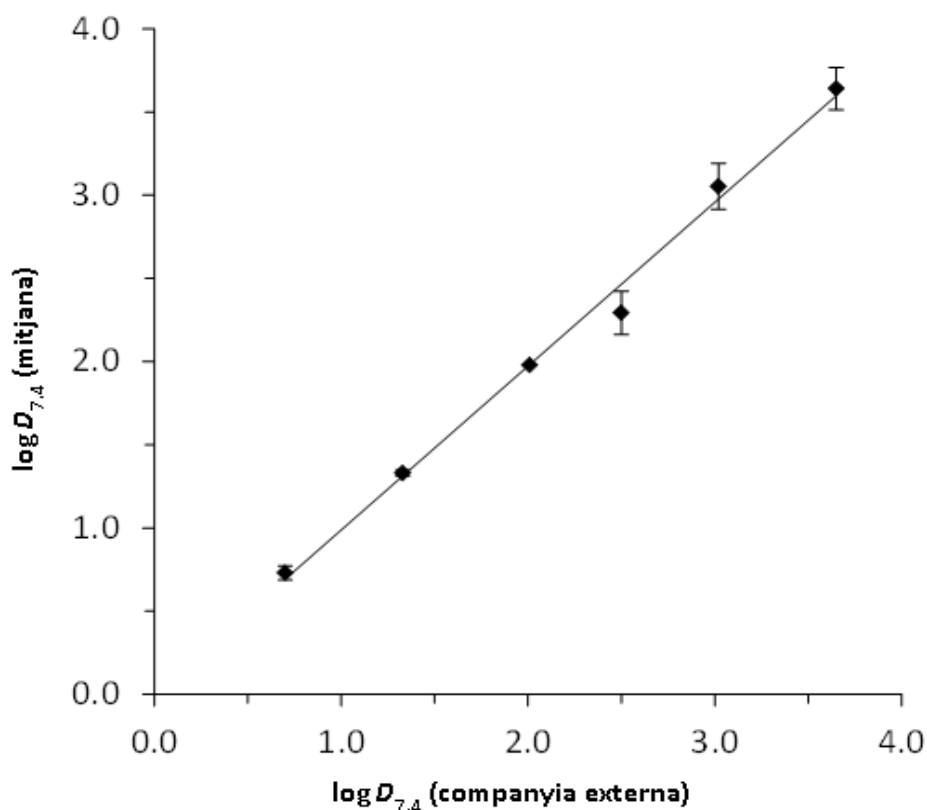


Figura 22. Comparació dels resultats obtinguts per UPLC amb els obtinguts a l'empresa externa CEREP

La Figura 22 dóna una correlació força bona entre els dos grups de valors. Tal i com passava amb les determinacions descrites a la Taula 8, la zona de lipofilitat intermèdia (valors de $\log D_{7.4}$ entre 0 i 2.5) dóna uns resultats molt bons a nivell tant d'exactitud, ja que els punts són molt propers a la línia, com de precisió, ja que les barres d'error pràcticament no s'aprecien. Per la seva part, en compostos de caire més hidrofòbic (valors de $\log D_{7.4}$ superiors a 2.5) la precisió és clarament més baixa, trobant-se al voltant de les 0.3 unitats logarítmiques que marca la EPA, però l'exactitud segueix sent força acceptable tot i que també disminueix lleugerament. Així doncs, la Figura 22 no solament mostra que aquests procediments funcionen sinó que permet afirmar que l'optimització al mètode de *shake-flask* proposada en aquest estudi pot portar-se a terme de forma rutinària en qualsevol laboratori, substituint així a les costoses determinacions externes habituals en la indústria farmacèutica.

CONCLUSIONS

The work conducted throughout the thesis yielded the following conclusions:

1. The van Deemter equation is the main tool to evaluate the performance of chromatographic columns and characterize their stationary phases. For a detailed evaluation, the van Deemter equation can be split into its different terms and the corresponding band broadening contributions can be determined in a stepwise and separate way through calculations and experimental procedures (like the *total pore blocking* or the *peak parking* methods). The Excel file provided in this thesis allows a fast and systematic estimation of the different contributions to the chromatographic band broadening, not only allowing the comparison between the magnitude of the aforementioned contributions but also providing a useful tool able to efficiently perform comparative tests between chromatographic columns.

2. Three different models to predict the retention of ionizable analytes in gradient mode were developed and later tested. The so-called 2-parameter and 3-parameter models gave very accurate results, while the predictions performed using the 1-parameter model were only fairly good. Taking into account the relationship between the accuracy of the predictions and experimental work to be done, the 2-parameter model is the one that works best and, therefore, it is recommended above the other two models tested.

3. In gradient mode, the pK_a of the analyte changes during the elution because its value depends on the mobile phase composition. In order to estimate the pK_a value at every moment of the elution process, two different approaches have been tested. The first one is based on experimental measurements and, although it is quite accurate, obtaining all the isocratic retention data requires spending a great amount of time and resources. The alternative approach, based on equations and empirical coefficients that depend on the functional group of the analyte, allows the calculation of the pK_a evolution in a faster way without significantly losing accuracy. Therefore, the approach based on equations is highly recommended.

4. Although it was supposed to be a constant value, the experimental measurements performed show that the f parameter (the relationship between the retention factors of the ionized and neutral species of the analyte) changes slightly with the mobile phase composition. Among the different ways of estimating the f parameter that have been tested, the determination at low fractions of organic modifier is recommended. When possible, 20% of organic solvent should be used but if reasonable experimental retention times are exceeded at that composition, other fractions such as 40% may be used.

5. The 2-parameter prediction model has been successfully used to predict the retention of ionizable analytes under gradient elution. Besides being very accurate, the model also has quite a lot of robustness as it has shown good accuracy regardless of the size, pK_a and functional group of the compounds tested, the organic modifier used in the mobile phase (acetonitrile and methanol), the initial mobile phase pH value and the gradient patterns used.

6. Three main sources of error can cause inaccuracies in a prediction of the retention of an analyte: poor determination of its specific retention parameters, poor estimation of its ionization degree and poor calculation of the ratio between its neutral and ionized species (f parameter). None of them has affected greatly in the accuracy of the predicting models, although some consideration has to be taken with the calculation of the f parameter since its determination carries an unavoidable experimental error. Determination of the specific retention parameters and estimation of the ionization degree have worked quite well and possible inaccuracies in those two areas have not translated into significant errors in the predictions. Therefore, predictions of the retention of completely ionized compounds might be a little less accurate than those from partially ionized and neutral analytes, since the f parameter has an effect on the prediction of the retention when the ionization degree of the analyte is high (close to 1).

7. The traditional *shake-flask* method has been optimized to assess the lipophilicity of drugs taking into account the new needs of the pharmaceutical

industry. Several phase volume ratios (partitions) have been proposed, as it has been shown that compounds need different phase volume ratios depending on their lipophilicity, and several procedures that allow the experimental execution of these partitions have been suggested. The optimization has been successfully tested for two different instruments, with good agreement between theoretical and experimental $\log D_{7.4}$ values and quite high precision between values obtained through different partitions.

REFERÈNCIES

-
- [1] C.F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2003.
- [2] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of chromatography. II. Application to the microdetermination of the higher monoamino-acids in proteins, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358–1368.
- [3] L. Lapidus, N.R. Amundson, Mathematics of adsorption in beds. VI. The effect of longitudinal diffusion in ion-exchange and chromatographic columns, *J. Phys. Chem.* 56 (1952) 984–988.
- [4] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
- [5] J.F.K. Huber, High efficiency, high speed liquid chromatography in columns, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 85–90.
- [6] E. Kučera, Contribution to the theory of chromatography, *J. Chromatogr. A.* 19 (1965) 237–248.
- [7] C. Horváth, H.-J. Lin, Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 126 (1976) 401–420.
- [8] F. Gritti, G. Guiochon, General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5329–5347.
- [9] A. Felinger, Determination of rate constants for heterogeneous mass transfer kinetics in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1126 (2006) 120–128.
- [10] D. Cabooter, J. Billen, H. Terry, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Detailed characterisation of the flow resistance of commercial sub-2 micrometer reversed-phase columns, *J. Chromatogr. A.* 1178 (2008) 108–117.
- [11] D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Total pore blocking as an alternative method for the on-column determination of the external porosity of packed and monolithic reversed-phase columns, *J. Chromatogr. A.* 1157 (2007) 131–141.
- [12] D. Lubda, W. Lindner, M. Quaglia, C.D.F. Von Hohenesche, K.K. Unger, Comprehensive pore structure characterization of silica monoliths with controlled mesopore size and macropore size by nitrogen sorption, mercury porosimetry, transmission electron microscopy and inverse size exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1083 (2005) 14–22.

- [13] Y. Yao, A.M. Lenhoff, Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1037 (2004) 273–282.
- [14] Y. Yao, A.M. Lenhoff, Pore size distributions of ion exchangers and relation to protein binding capacity, *J. Chromatogr. A.* 1126 (2006) 107–119.
- [15] H. Guan, G. Guiochon, Study of physico-chemical properties of some packing materials. I . Measurements of the external porosity of packed columns by inverse size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 731 (1996) 27–40.
- [16] M.J.M. Wells, C.R. Clark, Liquid chromatographic elution characteristics of some bonded solutes used to measure column void volume on phases, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1341–1345.
- [17] R. McCormick, B. Karger, Distribution phenomena of mobile-phase components and determination of dead volume in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2249–2257.
- [18] G. Desmet, D. Cabooter, K. Broeckhoven, Graphical Data Representation Methods To Assess the Quality of LC Columns, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8593–8602.
- [19] J.C. Heaton, D. V. McCalley, Comparison of the kinetic performance and retentivity of sub-2 μ m core-shell, hybrid and conventional bare silica phases in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1371 (2014) 106–116.
- [20] J.H. Knox, Band dispersion in chromatography – a new view of A-term dispersion, *J. Chromatogr. A.* 831 (1999) 3–15.
- [21] K. Miyabe, N. Ando, G. Guiochon, Peak parking method for measurement of molecular diffusivity in liquid phase systems, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4377–4382.
- [22] J.H. Knox, H.P. Scott, B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 282 (1983) 297–313.
- [23] K. Miyabe, Y. Matsumoto, G. Guiochon, Peak parking - moment analysis. A strategy for the study of the mass-transfer kinetics in the stationary phase, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1970–1982.
- [24] A. Liekens, J. Denayer, G. Desmet, Experimental investigation of the difference in B-term dominated band broadening between fully porous and porous-shell particles for liquid chromatography using the Effective Medium Theory, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4406–4416.

-
- [25] C.R. Wilke, P. Chang, Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 1 (1955) 264–270.
- [26] R.W. Stout, J.J. DeStefano, L.R. Snyder, High-performance liquid chromatographic column efficiency as a function of particle composition and geometry and capacity factor, *J. Chromatogr. A.* 282 (1983) 263–286.
- [27] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography. Part 1*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [28] G. Desmet, K. Broeckhoven, J. De Smet, S. Deridder, G. V Baron, P. Gzil, Errors involved in the existing B-term expressions for the longitudinal diffusion in fully porous chromatographic media Part I: computational data in ordered pillar arrays and effective medium theory, *J. Chromatogr. A.* 1188 (2008) 171–188.
- [29] K. Broeckhoven, D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Errors involved in the existing B-term expressions for the longitudinal diffusion in fully porous chromatographic media Part II: experimental data in packed columns and surface diffusion measurements., *J. Chromatogr. A.* 1188 (2008) 189–198.
- [30] G. Desmet, S. Deridder, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part I: Theory, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 32–45.
- [31] C. Maxwell, *Treatise on electricity and magnetism, Volume 1*, Oxford University Press, London, 1873.
- [32] S. Deridder, G. Desmet, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 46–56.
- [33] G. Desmet, K. Broeckhoven, Equivalence of the different C_m - and C_s -term expressions used in liquid chromatography and a geometrical model uniting them, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8076–8088.
- [34] S. Deridder, G. Desmet, New insights in the velocity dependency of the external mass transfer coefficient in 2D and 3D porous media for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1227 (2012) 194–202.
- [35] C. Horváth, S. Lipsky, Column design in high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 109–116.
- [36] G. Desmet, A finite parallel zone model to interpret and extend Giddings' coupling theory for the eddy-dispersion in porous chromatographic media, *J. Chromatogr. A.* 1314 (2013) 124–137.

- [37] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *J. Chromatogr. A.* 1221 (2012) 2–40.
- [38] J.C. Giddings, *Unified Separation Science*, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- [39] J.P. Bouchaud, A. Georges, A simple model for hydrodynamic dispersion, *Comptes Rendus l'Academie Des Sci. Ser. II.* 307 (1988) 1431–1436.
- [40] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC. pH scale in methanol-water and the pK and pH values of buffers, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3651–3657.
- [41] M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength, and mobile phase composition on the retention of weak acids, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4094–4100.
- [42] K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepman, F. Bohlmann, Pyridinium N-phenolbetaines and their use for the characterization of the polarity of solvents, *Liebigs Ann. Chem.* 661 (1963) 1–37.
- [43] C.L. DeLigny, M. Rehbach, The liquid-junction potentials between some buffer solutions in methanol and methanol-water mixtures and a saturated KCl solution in water at 25°, *Recl. Des Trav. Chim. Des Pays-Bas La Belgique.* 79 (1960) 727.
- [44] R.G. Bates, M. Paabo, R.A. Robinson, Interpretation of pH measurements in alcohol-water solvents, *J. Phys. Chem.* 67 (1963) 1833.
- [45] B.P. Johnson, M.G. Khaledi, J.G. Dorsey, Solvatochromic solvent polarity measurements and retention in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2354–2365.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, Analysis of a solute polarity parameter in reversed-phase liquid chromatography on a linear solvation relationship basis, *Anal. Chim. Acta.* 515 (2004) 209–227.
- [49] 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.
- [50] IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules, 1997, Blackwell, Oxford, 1997.
- [51] R.G. Bates, *Determination of pH: Theory and Practice*, Wiley, New York, 1964.
- [52] L. Sucha, S. Kotrly, *Solution Equilibriums in Analytical Chemistry*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1972.
- [53] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol – water mixtures, *J. Chromatogr. A.* 911 (2001) 191–202.
- [54] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Delta conversion parameter between pH scales (SWpH and SSpH) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3180–3187.
- [55] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC. 4. Mobile-phase pH measurement in methanol/water, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1802–1809.
- [56] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC. 5. pH scales and the retention of acids and bases with acetonitrile-water mobile phases, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5193–5200.
- [57] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography. XV. Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the acetonitrile fraction of the mobile phase, *J. Chromatogr. A.* 1059 (2004) 33–42.
- [58] M. Rosés, E. Bosch, Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *J. Chromatogr. A.* 982 (2002) 1–30.
- [59] M. Rosés, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1037 (2004) 283–298.
- [60] N.A. Izmailov, *Elektrokhimiya Rastvorov (Electrochemistry of Solutions)*, State University, Kharkov, 1959.
- [61] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC. 12. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile-water mobile phases that influence HPLC retention, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3809–3818.
- [62] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVII. Estimation of the pH variation of

- aqueous buffers with the change of the methanol fraction of the mobile phase, *J. Chromatogr. A.* 1138 (2007) 203–215.
- [63] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes — A review, *Sep. Purif. Rev.* 36 (2007) 231–255.
- [64] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, Resolution of acid strength in tert-butyl alcohol and isopropyl alcohol of substituted benzoic acids, phenols, and aliphatic carboxylic acids, *Anal. Chem.* 51 (1979) 133–140.
- [65] E. Bosch, M. Rosés, Ionic equilibria in neutral amphiprotic solvents; resolution of acid strength in tert-butyl alcohol, *Talanta.* 36 (1989) 627–632.
- [66] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Acid–base equilibria and assay of benzodiazepines in acetonitrile medium, *Talanta.* 36 (1989) 837–842.
- [67] E. Bosch, C. Ràfols, M. Rosés, Ionic equilibria in neutral amphiprotic solvents: Structural effects on dissociation constants of several substituted phenols and mercaptoprimidines in isopropyl alcohol, *Talanta.* 36 (1989) 1227–1231.
- [68] C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, A comparison between different approaches to estimate the aqueous pKa values of several non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Anal. Chim. Acta.* 338 (1997) 127–134.
- [69] A. Fini, P. De Maria, A. Guarnieri, L. Varoli, Acidity constants of sparingly water-soluble drugs from potentiometric determinations in aqueous dimethyl sulfoxide, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 48–52.
- [70] A.G. González, M.A. Herrador, Ionization constants of water insoluble arylpropionic acids in aqueous N,N-dimethylformamide mixtures from potentiometric pH-titrations, *Anal. Chim. Acta.* 356 (1997) 253–258.
- [71] D. Barrón, S. Buti, J. Barbosa, Standardization of potentiometric sensors and acid–base behaviour of a series of bases in nitrobenzene, *Anal. Chim. Acta.* 403 (2000) 349–354.
- [72] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Dissociation constants of neutral and charged acids in methyl alcohol. The acid strength resolution, *Anal. Chim. Acta.* 374 (1998) 309–324.
- [73] M. Rosés, F. Rived, E. Bosch, Dissociation constants of phenols in methanol–water mixtures., *J. Chromatogr. A.* 867 (2000) 45–56.
- [74] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Acidity in methanol–water, *Anal. Chim. Acta.* 439 (2001) 315–333.

-
- [75] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases, *J. Chromatogr. A.* 964 (2002) 55–66.
- [76] Z. Pawlak, Solvent effects on acid-base behaviour. Acidity constants of eight protonated substituted pyridines in (acetonitrile+water), *J. Chem. Thermodyn.* 19 (1987) 443–447.
- [77] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andrussov, Dissociation constants of organic acids in aqueous solution, Butterworths, London, 1961.
- [78] D.D. Perrin, Dissociation constants of organic bases in aqueous solution, Butterworths, London, 1965.
- [79] BioLoom online database: <http://www.davidhoekman.com/bio-loom/bin/details>
- [80] W. Melander, C. Horváth, in: C. Horváth, High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives, Academic Press, New York, 1980.
- [81] 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.
- [82] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, Influence of organic modifiers on the retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution, *J. Chromatogr. A.* 185 (1979) 179–195.
- [83] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *Retent. Mech. Chromatogr. Electrophor.* 1216 (2009) 1737–1755.
- [84] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition, *J. Chromatogr. A.* 592 (1992) 157–182.
- [85] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, Modeling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes, *J. Chromatogr. A.* 656 (1993) 577–590.
- [86] 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.
- [87] U.D. Neue, C.H. Phoebe, K. Tran, Y.-F. Cheng, Z. Lu, Dependence of reversed-phase retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity, *J. Chromatogr. A.* 925 (2001) 49–67.

- [88] 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.
- [89] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, New approach to linear gradient elution used for optimization in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1068 (2005) 279–287.
- [90] M. Rosés, E. Bosch, Linear solvation energy relationships in reversed-phase liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter, *Anal. Chim. Acta.* 274 (1993) 147–162.
- [91] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, Polarity parameters of the Symmetry C18 and Chromolith Performance RP-18 monolithic chromatographic columns, *J. Chromatogr. A.* 1107 (2006) 96–103.
- [92] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, A QSPR study of the p solute polarity parameter to estimate retention in HPLC, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240–1247.
- [93] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, Characterization of immobilized artificial membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models, *J. Chromatogr. A.* 1081 (2005) 163–173.
- [94] J.M. Herrero-Martínez, P. Izquierdo, J. Sales, M. Rosés, E. Bosch, Application of a polarity parameter model to the separation of fat-soluble vitamins by reversed-phase HPLC, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3170–3181.
- [95] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Prediction of retention in reversed-phase liquid chromatography by means of the polarity parameter model, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5214–5227.
- [96] J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, Comparative study of solvation parameter models accounting the effects of mobile phase composition in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1166 (2007) 85–96.
- [97] W.J. Cheong, P.W. Carr, Kamlet-Taft π^* polarizability/dipolarity of mixtures of water with various organic solvents, *Anal. Chem.* 60 (1988) 820–826.
- [98] J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$ through a new chromatographic method, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3026–3037.
- [99] J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6356–6368.

-
- [100] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. De Galan, Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 519–537.
- [101] P. Wiczling, M.J. Markuszewski, M. Kaliszan, R. Kaliszan, pH/Organic solvent double-gradient reversed-phase HPLC, *Anal. Chem.* 77 (2005) 449–458.
- [102] P. Jandera, Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems?, *J. Chromatogr. A.* 1126 (2006) 195–218.
- [103] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2007.
- [104] F. Gritti, G. Guiochon, The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1178 (2008) 79–91.
- [105] J. Ståhlberg, The thermodynamic limit of linear gradient chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3172–3179.
- [106] U.D. Neue, H.-J. Kuss, Improved reversed-phase gradient retention modeling, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3794–3803.
- [107] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phase high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1930–1936.
- [108] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVI. Estimation of retention with acetonitrile/water mobile phases from aqueous buffer pH and analyte pKa, *J. Chromatogr. A.* 1121 (2006) 170–177.
- [109] 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.
- [110] L.R. Snyder, Linear elution adsorption chromatography. VII. Gradient elution theory, *J. Chromatogr.* 13 (1964) 415–434.
- [111] L.R. Snyder, Principles of gradient elution, *Chromatogr. Rev.* 7 (1965) 1–51.
- [112] P. Jandera, J. Churacek, *Gradient elution in column liquid chromatography: Theory and practice*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985.
- [113] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, Optimization technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1033 (2004) 283–289.

- [114] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2295–2305.
- [115] J.E. Hardcastle, I. Jano, Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 717 (1998) 39–56.
- [116] P. Wiczling, R. Kaliszan, pH Gradient as a tool for the separation of ionizable analytes in reversed-phase high-performance chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3692–3698.
- [117] D. Bolliet, C.F. Poole, M. Rosés, Conjoint prediction of the retention of neutral and ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, *Anal. Chim. Acta.* 368 (1998) 129–140.
- [118] M. Rosés, D. Bolliet, C.F. Poole, Comparison of solute descriptors for predicting retention of ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, *J. Chromatogr. A.* 829 (1998) 29–40.
- [119] P. Wiczling, R. Kaliszan, Influence of pH on Retention in Linear Organic Modifier Gradient RP HPLC, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7855–7861.
- [120] P. Wiczling, R. Kaliszan, Retention time and peak width in the combined pH/organic modifier gradient high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3375–3381.
- [121] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* (Washington, DC, United States). 71 (1971) 525–616.
- [122] C. Hansch, A. Leo, *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*, USA., 1979.
- [123] J.K. Seydel, K.J. Schaper, Quantitative structure-pharmacokinetic relationships and drug design, *Pharmacol. Ther.* 15 (1981) 131–182.
- [124] C. Hansch, T. Fujita, ρ - σ - π Analysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616–1626.
- [125] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Wiley, Chichester, 1997.
- [126] A. Avdeef, *Absorption and Drug Development*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2003.
- [127] R.A. Scherrer, S.M. Howard, Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relations, *J. Med. Chem.* 20 (1977) 53–58.

-
- [128] J. Comer, High-throughput measurement of logD and pKa, Chapter 2. In: van de Waterbeemd, H., Lennernäs, H., Artursson, P. (Eds.), *Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*, 2003.
- [129] E.H. Kerns, L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Elsevier, London, 2008.
- [130] A. Avdeef, pH-metric log P. Part 1. Difference plots for determining ion-pair octanol-water partition coefficients of multiprotic substances, *Quant. Struct. Relationships*. 11 (1992) 510–517.
- [131] A. Avdeef, pH-metric log P. II: Refinement of partition coefficients and Ionization constants of multiprotic substances, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 183–190.
- [132] K. Takács-Novák, A. Avdeef, Interlaboratory study of log P determination by shake-flask and potentiometric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1405–1413.
- [133] C. Ràfols, E. Bosch, R. Ruiz, K.J. Box, M. Reis, C. Ventura, et al., Acidity and hydrophobicity of several new potential antitubercular drugs: isoniazid and benzimidazole derivatives, *J. Chem. Eng. Data*. 57 (2012) 330–338.
- [134] R. Kaliszan, P. Haber, T. Bączek, D. Siluk, K. Valko, Lipophilicity and pKa estimates from gradient high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 965 (2002) 117–127.
- [135] P. Wiczling, M. Waszczuk-Jankowska, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, The application of gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography to the pKa and determination of polyprotic analytes, *J. Chromatogr. A*. 1214 (2008) 109–114.
- [136] K. Valkó, C.M. Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient (Log Poct) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\sigma_{\alpha 2H}$), *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137–1146.
- [137] S.F. Donovan, M.C. Pescatore, Method for measuring the logarithm of the octanol–water partition coefficient by using short octadecyl–poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A*. 952 (2002) 47–61..
- [138] K. Fikri, J. Debord, J.-C. Bollinger, D. Cledat, B. Penicaut, J.-M.H. Robert, RP-HPLC lipophilicity studies for some (hetero)arylamides derived from 2-amino 4,6-dimethylpyridine: introduction of an hydrogen-bond descriptor, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 1356–1366.

- [139] C. Liang, H. Lian, Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 28–36.
- [140] J.M. Pallicer, C. Calvet, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, Extension of the liquid chromatography/quantitative structure–property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric drugs, *J. Chromatogr. A.* 1240 (2012) 113–122.
- [141] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP-HPLC: a high-throughput alternative to log P/log D., *Anal. Chem.* 69 (1997) 2022–2029..
- [142] M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols, E. Fuguet, Chromatographic hydrophobicity index (CHI), *Adv. Chromatogr.* 50 (2012) 377–414.
- [143] J.T. Chou, P.C. Jurs, Computer-assisted computation of partition coefficients from molecular structures using fragment constants, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 19 (1979) 172–178.
- [144] A.J. Leo, Some advantages of calculating octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 166–168.
- [145] R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I. V Tetko, Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 861–893.
- [146] I. V Tetko, G.I. Poda, C. Ostermann, R. Mannhold, Large-scale evaluation of log P predictors: Local corrections may compensate insufficient accuracy and need of experimentally testing every other compound, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 1837–1844.
- [147] J.M. Pallicer, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, R. Pascual, A. Port, Evaluation of log Po/w values of drugs from some molecular structure calculation softwares, *ADMET DMPK.* 2 (2014) 107–114.
- [148] EPA Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7550, Partition Coefficient (n-octanol/water), Shake Flask Method, 1996.
- [149] W.P. Purcell, G.E. Bass, J.M. Clayton, *Strategy of Drug Design: A Guide to Biological Activity*, 1973.
- [150] J.C. Dearden, G.M. Bresnen, The measurement of partition coefficients, *Quant. Struct. Relationships.* 7 (1988) 133–144.
- [151] K. Valkó, *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. [In: *Handb. Anal. Sep.*, 2000 1], 2000.

-
- [152] Link to “detailed column performance analyzer_v1.0.xls” at <http://vubchemicalengineering.be/?ban=chromotography>.
- [153] F. Gritti, G. Guiochon, Optimization of the peak capacity per unit time, *J. Chromatogr. A.* 1263 (2012) 125–140.
- [154] G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Geometry-independent plate height representation methods for the direct comparison of the kinetic performance of LC supports with a different size or morphology, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4058–4070.
- [155] K. Broeckhoven, D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, The kinetic plot method applied to gradient chromatography: theoretical framework and experimental validation, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2787–2795.
- [156] K. Broeckhoven, D. Cabooter, S. Eeltink, G. Desmet, Kinetic plot based comparison of the efficiency and peak capacity of high-performance liquid chromatography columns: theoretical background and selected examples, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 20–30.
- [157] System Controller SCL-10Avp for Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph Instruction Manual. User’s Manual, Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto (Japan), 1997.
- [158] L. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley and Sons, New York, 1997.
- [159] F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Inorganic salts as hold-up time markers in C18 columns, *Talanta.* 53 (2000) 667–677.