

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 737**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2013 PCT/EP2013/050935**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2013 E 13701415 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2828653**

54 Título: **Simulación de un ciclo cromatográfico**

30 Prioridad:

**23.03.2012 EP 12161056**  
**23.03.2012 US 201261614799 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.02.2021**

73 Titular/es:

**BIOTAGE AB (100.0%)**  
**Kungsgatan 76**  
**753 18 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**HALLIN, ERIK**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 805 737 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Simulación de un ciclo cromatográfico

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento, un programa informático y un aparato que comprende un dispositivo informático para simular un ciclo cromatográfico en un cromatógrafo.

## 10 TÉCNICA ANTERIOR

La cromatografía es una técnica química utilizada para separar uno o más compuestos de una muestra con fines analíticos o preparatorios. La muestra se suministra a una fase estacionaria, por ejemplo un gel de sílice, y se hace que una fase móvil que comprende un eluyente fluya a través de la fase estacionaria. Dependiendo de la polaridad y el tamaño de las moléculas en la muestra, una parte de ésta se adsorbe a la fase estacionaria, mientras que otra parte se disuelve en la fase móvil. La fracción relativa de cada compuesto que reside en la fase móvil, también conocida como factor de retardo (R), junto con el caudal de la fase móvil induce diferentes tasas de movimiento para diferentes compuestos a través de la fase estacionaria, lo que da como resultado su separación.

20 Un problema con la cromatografía es asegurar que dos o más compuestos estén separados adecuadamente. Otro problema es estimar la carga máxima, o cantidad de muestra, que se puede cargar en una columna específica y aun así lograr una separación suficiente. Otro problema más es minimizar el coste de realizar un ciclo cromatográfico, tanto en términos de tiempo como en términos de costes de los productos químicos. En particular, para la cromatografía polar, el coste de los constituyentes de eluyente en la fase móvil puede ser sustancial. Por lo tanto, es necesario predecir el resultado de un ciclo cromatográfico antes de realizar el ciclo en la práctica.

En "Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems?" P. Jandera, J. de Chromatography A, 1126(2006)195-218, se muestra una descripción general de los modelos analíticos para calcular el resultado de un ciclo cromatográfico en fase inversa o polar cuando se usa un eluyente en gradiente. En particular, Jandera describe el uso de factores de retención  $k$  medidos para el más fuerte de los dos constituyentes de eluyente, en la formación de una ecuación analítica para calcular un volumen de elución esperado para un compuesto (ec. 17, pág. 205, columna 2, línea 2, en el caso de la fase normal) dado un gradiente lineal específico.

En el documento WO2011/094264 se muestra un procedimiento analítico para calcular el resultado de un ciclo cromatográfico que implica la medición de dos factores de retención isocráticos (mezcla de eluyentes constante) ( $k$ ) de dos ciclos de TLC anteriores para cada compuesto a analizar con respecto del eluyente más fuerte en la mezcla, la modificación del factor de retención ( $k$ ) con un factor de retención óptimo  $k_{opt}$ , y el cálculo de una concentración de volumen de disolvente en gradiente inicial y una concentración de volumen de solución en gradiente final en función de dicha ecuación analítica descrita en Jandera. El documento WO2011/094264 también muestra la comprobación de un volumen de elución calculado con respecto a una serie de condiciones fijas, y el cambio de la concentración de volumen de disolvente en gradiente inicial y la concentración de volumen de solución en gradiente final en direcciones que se sabe que dan como resultado una mejor separación hasta que los picos satisfagan dichas condiciones.

Un problema con estos enfoques es que solo se puede modelar una pequeña clase de sistemas cromatográficos, que se ajustan directamente al modelo analítico seleccionado. Otro problema más es que puede ser difícil para un usuario proporcionar muchos valores de entrada adecuados, precisos y suficientes para los parámetros requeridos por el modelo. Para el procedimiento descrito en el documento WO2011/094264 se requieren dos mediciones de los valores  $R$  para cada uno de los compuestos en la muestra a dos concentraciones de disolvente diferentes, que son mediciones que pueden no estar disponibles a un coste o esfuerzo razonable. Otro problema es que los procedimientos solo pueden calcular una solución aceptable para un ciclo cromatográfico, cuya solución, en realidad, puede estar lejos de ser una solución óptima. Por ejemplo, puede ser que dos compuestos puedan eluirse más cerca el uno del otro de lo calculado.

KARLSSON ET AL, J. Chromatography A, 1033 (2004), 71-82 describen un procedimiento para simular la purificación de proteínas en cromatografía en gradiente, utilizando el modelo de Langmuir y la acción de masa estérica (SMA), respectivamente. Los aspectos de optimización relacionados con el mismo se analizan adicionalmente en KARLSSON ET AL, J. Chromatography A, 1055 (2004), 29-39; DEGERMAN ET AL, J. Chromatography A, 1113 (2006), 92-100; y GALLANT ET AL, J. Chromatography A, 725 (1996) 295-314.

## RESUMEN DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es permitir la simulación de un ciclo cromatográfico para tener en cuenta un resultado deseado para el ciclo cromatográfico en consideración.

Otro objetivo de la presente invención es permitir la simulación de un ciclo cromatográfico en respuesta a la entrada manual con respecto a un resultado deseado.

Otro objetivo de la presente invención es indicar un procedimiento para la simulación de un ciclo cromatográfico en respuesta a la entrada manual relativa a un resultado deseado, y para admitir la presentación del resultado de la simulación en tiempo real.

Según la invención, se proporciona un procedimiento según la reivindicación 1.

Según dicho procedimiento, un ciclo cromatográfico en un cromatógrafo se simula con un dispositivo informático que comprende al menos un procesador y una memoria digital asociada, donde el ciclo cromatográfico usa una fase móvil que comprende una mezcla de al menos dos constituyentes de eluyente que tienen diferentes propiedades cromatográficas y que forman un perfil de eluyente. La invención comprende además:

- almacenar información en la memoria digital perteneciente a un modelo cromatográfico que comprende ecuaciones matemáticas para la simulación del ciclo cromatográfico, comprendiendo las ecuaciones matemáticas un sistema de modelado de ecuaciones diferenciales

a) una progresión del perfil de eluyente de la fase móvil con respecto a una fase estacionaria en el cromatógrafo, b) una distribución relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil basada en el perfil de eluyente

local en la ubicación del compuesto, y c) elución del compuesto con respecto a la fase estacionaria basada en la progresión del perfil de eluyente y en dicha distribución relativa,

y

- simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una posición pico simulada para el al menos un compuesto, - almacenar una función de compensación para al menos dos variables simuladas en el modelo cromatográfico en la memoria digital,

- almacenar valores deseados para las al menos dos variables y almacenar ponderaciones numéricas atribuidas a cualquier desviación de los valores deseados para dichas variables en la memoria digital,

- simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener valores simulados para dichas al menos dos variables, y

- ejecutar una optimización con al menos un procesador para optimizar la función de compensación a fin de minimizar las desviaciones ponderadas.

Mediante el uso de una función de compensación que define ponderaciones para cualquier desviación para un conjunto de variables, es posible equilibrar las variables entre sí. Por lo tanto, es posible dar un mejor ajuste, incluso para situaciones que no son físicamente posibles de lograr. Preferentemente, la invención también comprende estimar y mostrar una medida de los errores a partir de los valores deseados. Otra ventaja más de usar una función de compensación es que es más fácil optimizar la simulación cromatográfica, lo que da como resultado, entre otros, una

disminución de la carga de cálculo, y también una mayor libertad en la que se pueden optimizar las variables y bajo qué condiciones. Por lo tanto, la función de compensación introduce un límite de tolerancia dinámico para las dos o más variables, donde la suma ponderada de los límites de tolerancia dinámicos se minimiza.

Preferentemente, al menos una de dichas variables simuladas comprende una posición pico simulada para un compuesto destinado a eluirse en el ciclo cromatográfico. Según aún otra realización preferida, las al menos dos variables simuladas comprenden dos posiciones pico simuladas para dos compuestos diferentes. Por lo tanto, es posible asignar una importancia diferente a diferentes picos, de modo que, por ejemplo, es posible garantizar una buena separación entre los picos y optimizar la elución rápida de uno de los compuestos, sin tener en cuenta la elución del segundo (o más) compuesto(s). Esto es ventajoso en caso de optimizar la producción o la purificación de uno o más compuestos.

Mediante el uso de un conjunto de ecuaciones diferenciales como modelo cromatográfico al simular un ciclo cromatográfico, se puede usar un mayor número de parámetros como incógnitas o se pueden simular simultáneamente, dando un modelo que tiene un mayor número de grados de libertad. Por lo tanto, se pueden evaluar situaciones y condiciones cromatográficas más generales con la simulación. En particular, no es necesario especificar

- tantas variables como cuando se utiliza un enfoque analítico, y, además, el número, la naturaleza y la calidad de los valores de entrada con respecto al modelo pueden variar según la disponibilidad, los costes y la precisión necesaria. De manera similar, al usar un conjunto de ecuaciones diferenciales para el modelo cromatográfico, el número y la naturaleza de las variables de salida simuladas y los valores del modelo también pueden cambiar dependiendo de la información buscada. También es posible simular un ciclo cromatográfico basado en nuevas combinaciones de entrada o en parámetros deseados del modelo, lo que permite la simulación de nuevos aspectos, que un modelo analítico sería incapaz de evaluar. Por lo tanto, un usuario gana más libertad al configurar un modelo cromatográfico particular. Además, es posible determinar cambios arbitrarios o mejoras en el ciclo cromatográfico y simular a continuación qué condiciones pueden lograr estos cambios y mejoras.
- 10 Al simular la progresión del perfil de eluyente de la fase móvil con respecto a una fase estacionaria en el cromatógrafo, es posible evaluar las proporciones de los constituyentes de eluyente en cualquier momento y en cualquier lugar de la fase estacionaria. Esta etapa también puede incluir la simulación de la diferencia en el caudal entre los diferentes componentes del eluyente en la fase móvil, dependiendo de sus diferentes tendencias a adsorberse en la fase estacionaria, un fenómeno que tiende a distorsionar el perfil de eluyente. Al simular la distribución relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil en función del perfil de eluyente local en la ubicación del compuesto, se puede evaluar la resistencia del eluyente o, por consiguiente, la movilidad del compuesto, en particular en combinación con la simulación del perfil de eluyente. Esta etapa también puede incluir interacciones compuesto-compuesto, ya que la propia presencia de un compuesto en la fase móvil puede cambiar la resistencia de la fase móvil, en particular en el caso de sobrecarga y ruptura. Al simular la elución del compuesto con respecto a la fase estacionaria en función de la progresión del perfil de eluyente y en dicha distribución relativa, la posición pico para el compuesto puede simularse fácilmente mediante la integración sobre la elución del compuesto en función de la progresión del ciclo cromatográfico.
- 25 A los efectos de la presente solicitud, y para garantizar una terminología clara y concisa, se cumplen las siguientes definiciones a lo largo de esta solicitud. Se enfatiza que estas definiciones no necesariamente se adoptan comúnmente y se pueden definir de otra manera si se encuentran en fuentes externas a esta solicitud.
- La fase móvil se define aquí como todos los componentes que se mueven a través de la fase estacionaria, incluido el eluyente y cualquier compuesto disuelto o en solución en el eluyente. A su vez, el eluyente se define para comprender todos los fluidos (constituyentes de eluyente) que son conducidos a fluir a través de la fase estacionaria, normalmente por alguna fuerza impulsora, tal como por bombeo, gravedad o acción capilar, y sin incluir los compuestos en la muestra. Un constituyente del eluyente se define aquí como un componente fluido del eluyente, que comprende así un componente o complejo químico, normalmente en estado fluido (gaseoso o líquido).
- 35 La resistencia de la fase móvil, o la resistencia de un constituyente de eluyente en la fase móvil, se define como la capacidad de la fase móvil o el constituyente de eluyente para eluir las moléculas de un compuesto. La resistencia también se puede expresar en términos del factor de retención (como se define a continuación). Normalmente, un constituyente de eluyente A en un sistema con un tipo dado de fase estacionaria es más débil que un constituyente de eluyente más fuerte B si el constituyente B tiene una polaridad relativa más cercana a la polaridad de la fase estacionaria. Tal constituyente de eluyente B tiene una mayor afinidad por el número limitado de sitios de adsorción en la fase estacionaria, lo que significa que existe una mayor competencia por los sitios de adsorción, de modo que una fracción mayor de los compuestos reside en la fase móvil, lo que induce un tiempo de elución más rápido. La resistencia también puede incorporar otros parámetros, tal como el tamaño de las moléculas, la viscosidad, las propiedades estereoscópicas, la temperatura, los componentes disueltos, tal como las sales, etc.
- Se define un perfil de eluyente que comprende información sobre las proporciones (c) de los constituyentes de eluyente en la fase móvil tal como se introducen en el cromatógrafo en momentos dados del ciclo cromatográfico. La proporción se puede dar como concentraciones, relaciones molares, relaciones en volumen, relaciones en peso, o similares medidas, por ejemplo, en porcentaje, en moles, gramos o alguna otra unidad adecuada. En el caso de un eluyente que comprende solo dos constituyentes de eluyente, es suficiente que el perfil del eluyente se proporcione como la proporción de uno de los constituyentes, y en general, si el eluyente comprende N constituyentes, es suficiente que el perfil del eluyente se dé como N-1 proporciones conocidas. Los constituyentes de eluyente en una fase móvil que forma el perfil de eluyente se seleccionan normalmente para tener diferentes propiedades cromatográficas, tales como diferentes polaridades y viscosidades, y por lo tanto tienen diferentes resistencias. Preferentemente, el perfil de eluyente también incluye información sobre la resistencia de uno o más de los constituyentes de eluyente en la fase móvil, donde el perfil de eluyente también puede comprender información sobre la resistencia total de la fase móvil. El perfil de eluyente también puede comprender opcionalmente información sobre otros factores que pueden afectar a la resistencia de la fase móvil. El perfil de eluyente también incluye preferentemente información sobre los cambios en la proporción en función de la progresión del ciclo cromatográfico.

La progresión del ciclo cromatográfico puede incluir cualquier parámetro que refleje la realización del ciclo cromatográfico. En una realización preferida, la progresión del ciclo cromatográfico incluye uno o más del tiempo de ejecución para realizar el ciclo cromatográfico, el volumen de fase móvil o eluyente que se ha introducido hasta ahora en el cromatógrafo, tal como el volumen de eluyente bombeado, o el volumen de fase móvil o eluyente inducido para moverse a través de la fase estacionaria. Estos parámetros están a su vez conectados entre sí a través del caudal del disolvente y el volumen de la fase móvil que puede residir dentro de la fase estacionaria (cuyo volumen se denomina comúnmente volumen de columna). Una unidad preferida para medir la progresión del ciclo cromatográfico son los volúmenes de columna bombeados, o como alternativa, los volúmenes de columna relativos. En una realización preferida, el perfil de eluyente comprende información sobre la proporción del eluyente más fuerte en la fase móvil en función de la cantidad de fase móvil o eluyente introducida en términos de volúmenes de columna (o, como alternativa, según la distancia recorrida por el frente del disolvente en el caso de TLC).

La progresión del perfil de eluyente se define a su vez como el movimiento del perfil de eluyente a través de la fase estacionaria. Por lo tanto, la progresión del perfil de eluyente también depende del caudal de la fase móvil y del volumen de columna, y puede darse como un perfil de eluyente local (o proporción de eluyente local) en una ubicación dada de la fase estacionaria en función de la presente progresión del ciclo cromatográfico.

La distribución relativa de un compuesto entre las fases estacionaria y móvil puede darse mediante cualquier medida que mida la proporción, participación, relación o concentración. Preferentemente, sin embargo, la distribución relativa es simulada por un modelo para un factor de retardo o factor de retención. Los términos factor de retardo y factor de retención se adhieren a las definiciones dadas por la IUPAC.

El término posición pico para un compuesto específico se refiere a su posición en un diagrama cromatográfico, y se define como el centro del pico de detección para ese compuesto en términos de un parámetro que mide la progresión del ciclo cromatográfico. Por lo tanto, la posición pico se puede dar en términos de tiempo, cantidad de fase móvil introducida medida en volúmenes de columna o medidas similares de progresión cromatográfica, dependiendo de las preferencias del usuario. La importancia física de la posición pico corresponde al pico de detección para ese compuesto cuando se eluye. El volumen de fase móvil requerido para eluir la mitad de un compuesto (correspondiente a la mitad del pico de detección) fuera de la fase estacionaria, el volumen de elución, también se puede expresar en términos del factor de retardo, que está relacionado con la cantidad de exceso de fase móvil (en volúmenes de columna) necesaria para hacer que un compuesto se mueva fuera de la fase estacionaria en un ciclo cromatográfico isocrático.

El modelo también incluye preferentemente la predicción de la relación o proporciones entre los constituyentes de eluyente en la fase móvil en cualquier lugar en cualquier momento en la columna. Preferentemente, el modelo también comprende información sobre el caudal de la fase móvil. El modelo modela aún más la movilidad basada en la distribución de cada compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Estos parámetros pueden obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, incluidos valores tabulados o valores medidos de experimentos.

En una realización preferida, la invención comprende

- recibir una entrada de un usuario sobre un valor deseado para una posición pico para al menos un compuesto a eluir,
- simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una correspondencia entre la posición pico para el compuesto y un perfil de eluyente para la fase móvil, y
- variar la simulación para predecir un perfil de eluyente para la fase móvil que da como resultado que una posición pico simulada esté dentro de un límite de tolerancia de la posición de pico deseada.

Por lo tanto, es posible que un usuario establezca una posición pico deseada para al menos un compuesto en un ciclo cromatográfico y reciba un resultado simulado que indique las condiciones necesarias para obtener esa posición pico.

En una realización alternativa, la invención también comprende

- presentar una posición pico simulada para al menos un compuesto y su perfil de eluyente asociado en una pantalla, y
- proporcionar una interfaz de usuario para recibir información de un usuario sobre los cambios deseados con respecto a una o más de las posiciones pico simuladas y con respecto al perfil de eluyente.

Por lo tanto, es posible que un usuario cambie la posición pico de uno o más compuestos en tiempo real y reciba casi directamente comentarios sobre cómo deben cambiarse las condiciones para el ciclo cromatográfico con el fin de obtener esta o estas posiciones pico. De manera similar, el usuario también puede recibir información sobre cómo un cambio en una posición pico necesariamente conduce a un cambio en otra posición pico. También es posible que un

usuario cambie las condiciones iniciales para un ciclo cromatográfico y reciba directamente retroalimentación sobre cómo esto cambia las posiciones pico.

Según una realización, la invención comprende

- 5 - proporcionar una interfaz de usuario para recibir información de un usuario sobre los cambios deseados en al menos dos posiciones pico simuladas,
  - simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una correspondencia entre las posiciones pico para los al menos dos compuestos y un perfil de eluyente para la fase móvil, y
- 10 - variar la simulación para predecir un perfil de eluyente para la fase móvil que da como resultado que las dos o más posiciones pico simuladas estén dentro de un límite de tolerancia de sus respectivas posiciones pico deseadas. Por lo tanto, es posible simular qué perfil de eluyente puede dar como resultado valores deseados para dos o más posiciones pico. Por lo tanto, es posible que un usuario controle directamente la separación deseada y/o el volumen de elución para dos o más compuestos.

15

Según una realización, la invención comprende simular el ciclo cromatográfico simulando las posiciones pico para los al menos dos compuestos como puntos de dimensión cero. Al renunciar a una simulación de la difusión y ampliación de los picos, la carga computacional disminuye sustancialmente. En una realización, la invención comprende simular las posiciones pico como puntos de dimensión cero en una primera simulación del ciclo cromatográfico, y a continuación simular la difusión y ampliación de los picos en una segunda simulación. Por lo tanto, la difusión se puede simular como una perturbación del primer ciclo de simulación, lo que también conduce a una disminución de la carga computacional. En otra realización más, la invención comprende simular el ciclo cromatográfico simulando las posiciones pico dentro de un intervalo de un ancho limitado. Por lo tanto, la simulación comprende la simulación de una cantidad limitada de ampliación de difusión, al simular solo un ancho limitado de la columna, lo que también limita el número de cálculos necesarios en relación con la simulación del ciclo cromatográfico en todos los puntos de la columna.

Según la invención, el procedimiento comprende además

- recibir una entrada de un usuario que interactúa con el dispositivo informático en un valor deseado para al menos una de dichas al menos dos variables, y
- ejecutar una optimización de la función de compensación con al menos un procesador en función del nuevo valor de entrada.

Por lo tanto, es posible recibir cambios arbitrarios o mejoras en el ciclo cromatográfico de un usuario y simular a continuación qué condiciones pueden lograr estos cambios y mejoras. Esto puede realizarse tanto en términos de resultados deseados, tal como la posición pico, como en términos de condiciones deseadas, tal como un perfil de eluyente deseado o proporciones de eluyente deseadas.

Según una realización preferida, el procedimiento comprende simular un ciclo cromatográfico en una columna de cromatografía de fase normal. La simulación o realización de cálculos de un modelo cromatográfico en fase normal se considera mucho más difícil y más inestable que el cálculo y la simulación de un ciclo cromatográfico de fase inversa. Sin embargo, con la invención, se ha llegado a la conclusión de que el procedimiento propuesto es casi igualmente excelente para simular un ciclo cromatográfico en una columna de fase normal. Preferentemente, la invención comprende recibir información sobre los valores medidos del factor de retardo (R) y/o los valores del factor de retención (k) de ciclos cromatográficos anteriores.

Preferentemente, los valores medidos se obtienen a partir de ciclos isocráticos. Si se reciben valores para factores de retardo medidos, el procedimiento comprende preferentemente convertir el factor de retardo recibido (R) en factores de retención (k), preferentemente usando la ecuación  $k = (1-R)/R$ . El procedimiento comprende además formar un modelo para el factor de retención k que comprende ajustar los valores medidos recibidos al modelo:  $k = (a+bc)^{-m}$ , donde a, b y m son parámetros arbitrarios del modelo, y que han de determinarse, y c es la proporción de un componente eluyente fuerte en la fase móvil. En caso de que el número de valores medidos de R (o k) sea insuficiente para determinar todos los parámetros en el modelo, el procedimiento comprende establecer uno o más de los parámetros en el modelo en un valor neutro. Por ejemplo, en caso de que solo se reciba un valor medido, el procedimiento puede comprender establecer "a" en cero y "m" en uno. Preferentemente, la invención también comprende recibir valores del factor de retardo (R) de ciclos cromatográficos anteriores en placas de TLC. Al recibir los valores del factor de retardo de las mediciones en placas de TLC, se garantiza un bajo coste, ya que los ciclos en placas TLC son normalmente muy rápidos y económicos. Sin embargo, si está disponible, la invención también puede incluir recibir y usar los valores de una o más mediciones de ciclos LC (isocráticos o en gradiente), que probablemente sean más precisos que si se usan valores basados en mediciones en placas de TLC.

Según una realización, la invención comprende

- recibir uno o más valores del factor de retardo (R) o factor de retención (k) medidos en un primer sistema cromatográfico,

- 5 - usar un factor de corrección ( $\alpha$ ) para corregir las diferencias entre el primer sistema cromatográfico y un segundo sistema cromatográfico al estimar al menos uno de los parámetros del modelo de factor de retención, y  
 - simular el ciclo cromatográfico en el segundo sistema cromatográfico.

El factor de corrección se determina preferentemente experimentalmente para cada par de sistemas cromatográficos.

- 10 Preferentemente, uno o más factores de corrección se almacenan en la memoria, y se selecciona un factor de corrección adecuado dependiendo de los sistemas cromatográficos a partir de los cuales se obtienen los valores de medición, y del sistema cromatográfico en el que se realizará la simulación. El factor de corrección  $\alpha$  puede ajustarse por las diferencias entre los sistemas que pueden afectar al rendimiento de la cromatografía, tal como el factor de forma, la densidad del paquete, la calidad y el tamaño de las partículas en fase sólida, el sistema de transmisión de fluido y otras diferencias. En particular, es conveniente incluir el factor de corrección si se obtienen los valores medidos en una placa de TLC mientras se simula en una columna LC.

Según una realización, la invención comprende controlar un ciclo cromatográfico en un cromatógrafo, mediante

- 20 - la recepción de información de un usuario en un perfil de eluyente simulado seleccionado que se desea analizar en el cromatógrafo, y  
 - el control del cromatógrafo para analizar una muestra en el cromatógrafo con una fase móvil que tiene un perfil de eluyente correspondiente al perfil de eluyente simulado seleccionado.

Por lo tanto, no es necesario transferir manualmente los resultados y las condiciones de un ciclo cromatográfico

- 25 simulado al cromatógrafo para realizar el ciclo cromatográfico, sino que el aparato y el dispositivo informático realizan el ciclo cromatográfico automáticamente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS

- 30 La invención se describirá ahora como una serie de ejemplos no limitativos de la invención y con referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra un aparato que comprende un dispositivo informático y un cromatógrafo según un ejemplo de la descripción.

- 35 La figura 2 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento según un ejemplo de la invención.  
 La figura 3 muestra una implementación informática del cálculo numérico del modelo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 40 En la figura 1 se muestra un aparato 1 que comprende un dispositivo informático 3 y un cromatógrafo 5. El dispositivo informático comprende un procesador 7 y una memoria digital asociada 9. El procesador está dispuesto para procesar las instrucciones del programa informático 11 almacenadas en la memoria digital, y para recibir y transferir señales al cromatógrafo y a una o más unidades de E/S, en este ejemplo al menos a una pantalla 13. El cromatógrafo comprende una columna 15 empaquetada con una fase estacionaria 17 que puede ser polar (denominada fase normal), no polar
- 45 (denominada fase inversa), o tener alguna otra forma de selectividad. El cromatógrafo incluye además un puerto de introducción de muestra 19, una o más entradas 24 para constituyentes de eluyente de una fase móvil, uno o más impulsores 23 para impulsar un flujo de la fase móvil, tales como bombas, un detector conectado en el extremo aguas abajo de la columna, y una salida de desechos 27 o colector 29.

- 50 Durante el funcionamiento, una muestra que comprende uno o más compuestos se introduce en el puerto de muestra 19. Los impulsores 23, en este ejemplo las bombas, impulsan los constituyentes que forman el eluyente de la fase móvil para que fluyan a través del cromatógrafo. La fase móvil lleva la muestra hacia y a través de la columna 15. Debido a las diferencias en polaridad y las diferencias en selectividad, la proporción de cada compuesto que se encuentra en la fase móvil 31 en relación con la adsorción a la fase estacionaria difiere entre los compuestos. Esto
- 55 conduce a una separación de los compuestos durante su recorrido a través de la columna debido a sus diferentes velocidades de movimiento. A continuación, los compuestos pueden detectarse por el detector 25, y pueden llevarse a la salida de desechos 27 o recogerse en el colector 29 para su posterior procesamiento o uso.

El cromatógrafo 5 se ilustra en este ejemplo mediante un cromatógrafo simple de cromatografía líquida (LC), pero en

- 60 principio podría estar constituido por cualquier otro tipo de cromatógrafo, tal como un cromatógrafo de cromatografía

ultrarrápida, un cromatógrafo de cromatografía líquida de alto rendimiento, o similares. Además, la columna 15 se empaqueta preferentemente con una fase estacionaria polar, formando un cromatógrafo de fase normal, que es particularmente adecuado para el procedimiento resultante. El material de la fase estacionaria podría ser entonces, por ejemplo, un gel de sílice, o cualquier otra fase estacionaria polar o hidrófila conocida en la técnica. Como alternativa, la columna podría ser una columna de fase inversa y el material de la fase estacionaria podría ser entonces un gel de sílice modificado, un polímero, tal como estireno u otro material no polar conocido en la técnica. El cromatógrafo está además dispuesto para poder operar al menos un ciclo cromatográfico con una fase móvil 31 que comprende una mezcla de al menos dos constituyentes de eluyente que tienen diferentes propiedades cromatográficas y que forman un perfil de eluyente 33. El perfil de eluyente comprende las proporciones relativas de los constituyentes de eluyente participantes que forman la fase móvil según se introdujo en relación con la progresión del ciclo cromatográfico, tal como en diferentes tiempos de ejecución, o como alternativa, según se midió por el volumen total de la fase móvil bombeada hasta ahora. El uso del volumen de columna o el tiempo de ejecución como medida de la progresión del ciclo cromatográfico es opcional y están relacionados entre sí a través del caudal de la fase móvil y el volumen de columna.

La memoria digital 9 del dispositivo informático 3 comprende instrucciones de programa 11 almacenadas en la misma que forman un programa informático 35, y que están destinadas a ejecutarse por el procesador y a controlar las acciones del procesador. En este ejemplo, el programa informático se dispone para inducir al procesador a realizar el procedimiento como se describe en relación con las figuras 2-3. El programa informático 35 está dispuesto además para controlar el funcionamiento del cromatógrafo 5.

En las figuras 2-3 se muestra un procedimiento para simular un ciclo cromatográfico en el cromatógrafo 5 con el dispositivo informático 3 según la presente invención. La figura 2 muestra un diagrama de flujo sobre una estructura operativa para el programa informático 35. Dependiendo del propósito y de las condiciones para realizar un ciclo cromatográfico, el orden de realización de las diferentes etapas del procedimiento como se describe en relación con la figura 2, así como qué etapas se incluirán y qué partes de cada etapa se realizarán, puede diferir entre ejecuciones. A su vez, la figura 3 muestra un diagrama de flujo de las diversas funciones matemáticas y numéricas que pueden realizarse durante la ejecución numérica del modelo cromatográfico.

En una etapa de iniciación 41, el procedimiento comprende almacenar información en la memoria digital 9 perteneciente a un modelo cromatográfico que comprende ecuaciones matemáticas para la simulación del ciclo cromatográfico. Según la invención, las ecuaciones matemáticas comprenden un sistema de modelado de ecuaciones diferenciales

- a) una progresión del perfil de eluyente 33 de la fase móvil 31 con respecto a una fase estacionaria 17 en el cromatógrafo 5,
- b) una distribución relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil 31 basada en el perfil de eluyente local 33 en la ubicación actual del compuesto, y
- c) elución del compuesto con respecto a la fase estacionaria 17 basada en la progresión del perfil de eluyente 33 y en dicha distribución relativa.

El modelo puede almacenarse en forma de un conjunto de instrucciones de programa, un conjunto de ecuaciones matemáticas adecuadas o una combinación de las mismas. El término almacenamiento pretende incluir tanto la descarga del modelo en la memoria digital 9, tal como cargar un programa informático en la memoria digital, y proporcionar una memoria digital con el modelo ya escrito en la misma. La memoria digital 9 puede ser una memoria caché del procesador, una memoria de acceso aleatorio, una memoria flash, un disco duro o una memoria auxiliar a la que puede acceder el procesador 7.

En la etapa de iniciación 41, el procedimiento también comprende almacenar una función de compensación para al menos dos variables simuladas en el modelo cromatográfico en la memoria digital. Preferentemente, el procedimiento comprende almacenar una función de compensación para un número adecuado, preferentemente más de dos, de las variables en el modelo. En un ejemplo particularmente útil, la función de compensación se refiere a dos o más posiciones pico 37 para dos o más compuestos. La función de compensación podría entonces definirse para que la simulación se optimice con el objetivo de encontrar las condiciones que hagan que las posiciones pico simuladas 37 se formen a una cierta distancia, tal como dos volúmenes de columna separados. Las ponderaciones asignadas a la función de compensación podrían ser entonces una ponderación de dos para cualquier discrepancia en la dirección de dos picos demasiado separados, y una ponderancia de veinte para cualquier discrepancia en la dirección de dos picos más cerca de dicha distancia deseada. Por lo tanto, se permite cierto margen de maniobra, de modo que se pueda obtener un resultado de simulación incluso si el resultado deseado es imposible de formar. Además, el uso de una función de compensación permite una implementación más sencilla del procedimiento de optimización. En este ejemplo, la función de compensación también podría incluir, en principio, variables que describan las condiciones para



realizar un ciclo cromatográfico, tal como información sobre el perfil de elución, la temperatura y otros factores que puedan afectar al ciclo cromatográfico.

5 En una etapa de entrada 43, el procedimiento comprende recibir una entrada de un usuario o de alguna otra fuente, tal como la lectura de un archivo de datos o de la codificación en el programa informático. En este ejemplo, la etapa de entrada 43 comprende recibir uno o más valores para factores de retardo, R, y/o factores de retención, k, medidos durante uno o más ciclos cromatográficos anteriores de ese compuesto y con una fase móvil que comprende uno o más componentes de eluyente que deben simularse, y también recibir información sobre el perfil de eluyente asociado de los ciclos cromatográficos anteriores. Es suficiente que solo se reciba un valor del factor de retardo o de retención  
10 para cada compuesto. Sin embargo, cuantos más valores estén disponibles, mejor y más precisa será la simulación. En un ejemplo, el procedimiento comprende recibir dos valores medidos. En un ejemplo preferido, el procedimiento comprende recibir al menos tres valores medidos para los factores de retardo, R o factores de retención k, para al menos un compuesto, junto con información sobre su perfil de eluyente asociado. Preferentemente, los perfiles de eluyente asociados con los factores de retardo medidos comprenden un eluyente con proporciones constantes para  
15 preferentemente todos, pero también es posible usar al menos para los constituyentes más fuertes del eluyente en ese ciclo cromatográfico (un perfil de eluyente isocrático), o los perfiles de elución en gradiente lineal. El factor de retardo o de retención también puede recibirse como una medida de un volumen de columna (LC) en elución o como una distancia recorrida (TLC) para el compuesto, a partir de la cual pueden estimarse los factores de retardo o de retención.

20 La etapa de entrada 43 opcionalmente puede comprender además, o como alternativa, valores o información para otros parámetros, variables o datos cualitativos. Por ejemplo, la entrada puede comprender información sobre los compuestos a simular, y/o qué componentes de eluyente están destinados a usarse en la cromatografía. El procedimiento puede comprender entonces verificar en una base de datos los valores de los factores de retraso,  
25 factores de retención u otros parámetros. El procedimiento puede comprender además recibir y almacenar valores deseados para las al menos dos variables de las funciones de compensación, y/o almacenar ponderaciones numéricas atribuidas a cualquier desviación de los valores deseados. La etapa de entrada 43 también puede comprender recibir información sobre un tipo deseado de perfil de elución, tal como si el perfil de elución comprende dos, tres o más constituyentes de eluyente, la naturaleza de los constituyentes de eluyente, y la forma de un cambio en las  
30 proporciones entre los constituyentes de eluyente, tales como el gradiente lineal, gradiente no lineal, etc. Posiblemente, también se podría recibir información sobre la naturaleza de la fase estacionaria y/o de los compuestos en la muestra. En una realización alternativa, la etapa de entrada 43 también podría comprender recibir y almacenar parcial o completamente variables y/o ponderaciones de la función de compensación.

35 En una etapa de modelado 45, el procedimiento comprende almacenar un modelo para un factor de retención, k, de la forma  $k = (a+b*c)^{-m}$  en la memoria digital, donde a, b y m son parámetros de modelo. El procedimiento comprende además estimar al menos uno de los parámetros a, b o m ajustando el al menos un valor medido de los factores de retardo o de retención y la proporción de eluyente asociada c en el modelo. En caso de solo haber recibido un valor  
40 medido del factor de retención, el procedimiento comprende calcular el parámetro b, y establecer a en cero y m en uno. En caso de recibir solo dos valores medidos del factor de retención, el procedimiento comprende calcular el parámetro b, y uno de a o m, mientras se establece el tercer parámetro en su valor definido como anteriormente. En caso de que se reciban tres o más valores medidos del factor de retención, el procedimiento comprende estimar los parámetros a, b y m por regresión no lineal. Como alternativa, la entrada recibida en la etapa de entrada 43 puede comprender en cambio valores ya estimados para los parámetros a, b y m para el modelo para el factor de retención  
45 directamente. Esto puede suceder si ya se han realizado estimaciones de a, b y m, por ejemplo, durante un intento de simulación anterior, o a partir de datos tabulados. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender incluir un factor de corrección  $\alpha$  en el modelo, cuyo factor de corrección incluye correcciones por diferencias en el factor de forma, densidad del paquete, calidad de las partículas, sistema de transmisión de fluido y otras diferencias entre el sistema cromatográfico en el que se hacen las mediciones experimentales de los factores de retención y/o de retardo, y el  
50 sistema cromatográfico que se va a simular, tal como entre una placa de TLC y una columna de LC. El factor de corrección puede introducirse en el modelo para k como  $k = \alpha(a+b*c)^{-m}$ , o el factor de corrección puede introducirse como una corrección con respecto a los valores medidos de retención o retardo antes de introducirse en el modelo para el cálculo de a, b, m, por ejemplo, como:  $k_{\text{corregido}} = \alpha * k_{\text{medido}}$ , donde se usa  $k_{\text{corregido}}$  en el modelo en lugar de  $k_{\text{medido}}$ . El valor del factor de corrección  $\alpha$  se determina preferentemente experimentalmente para cada par de sistemas  
55 cromatográficos.

En una etapa de modelado 45, el procedimiento comprende además almacenar un vector de perfil de eluyente  $\hat{c}$  en la memoria digital que comprende N elementos de vector, comprendiendo cada elemento de vector  $\hat{c}_N$  información sobre la proporción c de uno de los constituyentes del eluyente en la fase móvil en cierto punto de progresión del ciclo  
60 cromatográfico. En este ejemplo, el procedimiento también comprende asociar cada elemento de vector  $\hat{c}_N$  con una

medida de la progresión del ciclo cromatográfico, en este ejemplo con un volumen  $v_N$  de eluyente introducido en el cromatógrafo. El volumen de eluyente introducido se mide preferentemente en volúmenes de columna. En caso de que el eluyente comprenda tres o más constituyentes, el vector de perfil de eluyente puede comprender correspondientemente un segundo conjunto de valores de proporción para el segundo eluyente, y así sucesivamente.

5 Preferentemente, el número N de elementos de vector es superior o igual a cuatro, lo que permite una descripción de un gradiente lineal. Preferentemente, el número N de elementos de vector es superior o igual a cinco, lo que permite perfiles de eluyente mucho más generales. Al proporcionar el perfil de eluyente como un vector que comprende  $N > 5$  elementos, se puede simular una gran selección de diferentes perfiles de eluyente, y no es necesario en absoluto que el perfil de eluyente sea un perfil de gradiente lineal, ni que consista en una proporción de elución constante. Por lo  
10 tanto, se puede simular una clase más amplia de ciclos cromatográficos. Además, el uso de un vector de perfil de eluyente proporciona un procedimiento de simulación muy estable y permite el uso de procedimientos numéricos menos exigentes para su solución.

En una etapa de simulación 47, el procedimiento comprende simular el ciclo cromatográfico por el al menos un  
15 procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una o más posiciones pico simuladas para al menos uno o más compuestos. Las relaciones entre los cálculos numéricos realizados durante la simulación se muestran en la figura 3. En este ejemplo, la progresión del ciclo cromatográfico se da en términos del número actual de volúmenes de columna de fase móvil introducidos,  $v_P$ , debido a que esta medida proporciona un modelo matemático más sencillo. Sin embargo, debe apreciarse que, en principio, también podrían utilizarse otras medidas.

20 En un primer bloque de simulación 49, el procedimiento comprende simular la progresión del perfil de eluyente de la fase móvil con respecto a la fase estacionaria 17 en el cromatógrafo. En este ejemplo, esta etapa comprende simular las proporciones de los constituyentes de eluyente de la fase móvil en diferentes ubicaciones de la columna en diferentes momentos, según se mide por la progresión del ciclo cromatográfico. El primer bloque de simulación 49  
25 comprende llamar primero a una función de cálculo de perfil de elución, representada por el segundo bloque de simulación 51, para recibir a partir de la misma una estimación del presente perfil de eluyente en términos de las presentes proporciones de constituyente de eluyente  $c_{P,1..i}$  introduciéndose en el cromatógrafo, preferentemente al comienzo de la fase estacionaria 17, en un punto de progresión del ciclo cromatográfico,  $v_P$ .

30 El segundo bloque de simulación 51 comprende a su vez el uso de información sobre el vector de perfil de eluyente  $\hat{c}$ , sus elementos de vector  $\hat{c}_N$ , y el presente punto de progresión del ciclo cromatográfico,  $v_P$ , para evaluar las proporciones  $c_{P,1..i}$  de cada constituyente de eluyente (i) al comienzo de la fase estacionaria en el presente punto de progresión del ciclo cromatográfico  $v_P$ . En este ejemplo, el segundo bloque de simulación 51 comprende interpolar las proporciones  $c_{P,1..n}$  en función de los elementos de vector de perfil de elución  $\hat{c}_N$ , sus volúmenes de elución asociados,  
35 y la presente progresión del ciclo cromatográfico, proporcionando así las proporciones momentáneas  $c_{P,1..i}$  de los constituyentes de eluyente, y devolviendo estos valores al primer bloque de simulación 49.

El primer bloque de simulación 49 comprende además estimar el perfil de eluyente local, o las proporciones de constituyente de eluyente  $c_{Local,1..i}(v_P)$  en toda la columna para cada constituyente de eluyente (i). En este ejemplo, la  
40 estimación comprende simular la progresión del perfil de eluyente a través de la columna, por ejemplo mediante el uso de la ecuación

$$c_{Local,1..i} = C(c_{P,1..i}, V-Z, v_P)$$

45 donde  $v$  representa el volumen de eluyente introducido, y  $z$  representa la posición en la columna según se mide en volúmenes de columna relativos que van de 0 a 1. Por lo tanto, se obtiene la progresión del perfil de elución a través de la fase estacionaria.

Sin embargo, también pueden usarse otras ecuaciones que describen la progresión del perfil de eluyente para  
50 diferentes configuraciones de un cromatógrafo, o pueden reemplazar el ejemplo anterior. Por ejemplo, la ecuación puede comprender un submodelo para describir el caudal en términos de fuerza gravitacional, presión de gas, caída de presión, difusión, etc., en lugar de incorporar el caudal indirectamente en el vector de perfil de eluyente, así como modelos para otros factores tales como la retención y adsorción de un constituyente de eluyente en la fase estacionaria.

55 En un tercer bloque de simulación 53, el procedimiento comprende simular la distribución relativa de un compuesto entre la fase estacionaria (17) y la fase móvil (31) basándose en el perfil de eluyente local,  $c_{Local,1..n}$ , en la presente ubicación del compuesto. En este ejemplo, el procedimiento comprende simular la resistencia de la fase móvil localmente para cada compuesto. En este ejemplo, el procedimiento comprende usar la información del primer y  
60 segundo bloque de simulación 49, 51 en el perfil de eluyente local en combinación con el modelo para el factor de

retención como se describe en la etapa de modelado 45 del modelo, obteniendo así la distribución relativa de cada compuesto entre la fase estacionaria y la móvil en la ubicación del compuesto.

Por lo tanto, el tercer bloque de simulación 53 comprende llamar a una función de cálculo de factor de retención, representada por un cuarto bloque de simulación 55. En este ejemplo, el cuarto bloque de simulación 55 comprende recibir el valor o valores para las proporciones locales de los constituyentes de eluyente en la presente ubicación de los compuestos  $C_{local,1..n}$  y usar el modelo para el factor de retención  $k = (a+b*c)^m$ , que proporciona una estimación directa de la distribución relativa del compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil. En este ejemplo, en el caso de un perfil de eluyente que tiene solo dos constituyentes de eluyente, la distribución puede evaluarse mediante la ecuación de la forma:

$$k_{Local,1..j} = (a_j + b_j * C_{local,1..i})^{-mj},$$

para cada compuesto  $j$ , y con los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $m$  tal como se ajustan en la etapa de modelado 45. Sin embargo, la expresión en el cuarto bloque de simulación también puede comprender opcionalmente otros factores o parámetros que pueden afectar a la distribución de cada compuesto  $j$ . Por lo tanto, el procedimiento comprende simular la distribución relativa del compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil en función del modelo para el factor de retención ( $k$ ) y el perfil de eluyente local en la ubicación del compuesto.

En un quinto bloque de simulación 57, el procedimiento comprende simular una elución del compuesto con respecto a la fase estacionaria en función de la progresión del perfil de eluyente del bloque 49 y en dicha distribución relativa de las etapas 53 y 55. En este ejemplo, el quinto bloque de simulación 57 comprende simular el movimiento (elución) de cada compuesto en relación con la fase estacionaria (columna) basándose en la progresión del perfil de eluyente y teniendo en cuenta la proporción  $k_{Local,1..j}$  del compuesto que reside en la fase móvil 31 del bloque 55. En este ejemplo particular, el modelo puede comprender una ecuación de la forma:

$$dz_j/dv = 1/(1+k_{Local,1..j}),$$

Esto proporciona una medida de la elución, o sinónimamente, el cambio de posición para el compuesto con respecto a la fase estacionaria medida en un volumen de columna relativo (de 0 a 1). Por lo tanto, estas ecuaciones forman un conjunto de ecuaciones diferenciales que, en el cálculo, proporciona la progresión momentánea de cada compuesto a través de la columna cromatográfica.

El procedimiento comprende además un sexto bloque de simulación 59 que comprende simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador 7 que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico. En este ejemplo, el procedimiento comprende repetir los bloques de simulación 49-55 con un procedimiento numérico para resolver ecuaciones diferenciales, lo que da como resultado la obtención de las posiciones pico simuladas resultantes 37 para cada uno de los compuestos. Las ecuaciones diferenciales del bloque 51 al 57 pueden calcularse ejecutando un procedimiento numérico para resolver un sistema de ecuaciones diferenciales, tal como un procedimiento Euler, un procedimiento Runge-Kutta o cualquier otro procedimiento numérico para resolver sistemas diferenciales de ecuaciones. En este ejemplo, la simulación comprende simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una correspondencia entre la posición pico resultante para un compuesto y un perfil de eluyente para la fase móvil, mediante la ejecución de los bloques 49 a 57. Por lo tanto, el procedimiento también comprende simular el ciclo cromatográfico con cálculos basados en el vector de perfil de eluyente  $\hat{c}$ .

El procedimiento comprende además simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador 7 que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener valores simulados para al menos dos variables de la función de compensación. En este ejemplo, las variables de la función de compensación se establecen en dos posiciones pico. Sin embargo, debido a la naturaleza general del modelo de simulación, es posible incluir casi cualquier otra variable o parámetro del modelo como también las variables deseadas de la función de compensación. El procedimiento comprende además calcular una puntuación de compensación ponderada basada en la función de compensación. Por lo tanto, se asigna una puntuación al punto representado por el vector de perfil de elución simulado actualmente  $\hat{c}$ , en un espacio puntual abarcado por el conjunto de todos los valores posibles para los elementos  $\hat{c}_N$  de un vector de perfil de elución arbitrario de la misma dimensión.

En un séptimo bloque de simulación 60, el procedimiento comprende calcular una puntuación para la función de compensación en dicho punto en el espacio puntual, sumando las desviaciones ponderadas para todas las variables actualmente seleccionadas como variables activas de la función de compensación.

En un octavo bloque de simulación 61, el procedimiento comprende ejecutar una optimización de la simulación para

producir un ciclo cromatográfico optimizado. La optimización puede comprender volver a ejecutar la simulación, tal como la simulación en los bloques 49-60, para obtener una pluralidad de resultados de simulación, y seleccionar el resultado de simulación óptimo entre la pluralidad de resultados de simulación. En un ejemplo, el procedimiento comprende variar la simulación volviendo a ejecutar la simulación (en los bloques 49-60) con un perfil de eluyente de simulación variable para predecir un perfil de eluyente resultante (33) para la fase móvil dando como resultado una posición pico simulada (37) que está dentro de un límite de tolerancia de la posición pico deseada. El límite de tolerancia puede ser, por ejemplo, un intervalo específico en torno a la posición pico, que puede predefinirse o introducirse por el usuario en la etapa de entrada 43. Sin embargo, el límite de tolerancia también puede establecerse dinámicamente como se describe a continuación.

10

El octavo bloque de simulación 61 del procedimiento comprende ejecutar una optimización con al menos un procesador para optimizar la función de compensación a fin de minimizar la suma de las desviaciones ponderadas, en este ejemplo la puntuación de la función de compensación según se calcula en el séptimo bloque de simulación 60. En este ejemplo, el procedimiento puede comprender optimizar el valor de la función de compensación variando el perfil de eluyente en la forma del vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}$ ), y volver a ejecutar la simulación en los bloques 49-60 con los nuevos y variados elementos de vector  $\hat{c}_N$ . El procedimiento comprende además seleccionar el vector de perfil de eluyente  $\hat{c}$  que da como resultado el valor mínimo para la puntuación de la función de compensación como el perfil de eluyente óptimo. Por lo tanto, las ponderaciones de la función de compensación junto con la selección de la simulación que proporciona la menor puntuación establecen dinámicamente los límites de tolerancia para la posición o posiciones pico.

20

En este ejemplo, al menos una de dichas variables simuladas de la función de compensación comprende una posición pico simulada para un compuesto destinado a eluirse en el ciclo cromatográfico. Sin embargo, al menos una de dichas variables de la función de compensación también podría comprender el perfil de eluyente  $\hat{c}$  e información sobre la proporción  $c$  de al menos uno de los constituyentes de eluyente en la fase móvil. Por lo tanto, las tolerancias en torno a cada posición pico, elemento de vector de perfil de eluyente, y/u otras variables de la función de compensación pueden establecerse dinámicamente en los valores que minimizan la puntuación de la función de compensación.

25

El procedimiento comprende optimizar el valor de la función de compensación por el al menos un procesador 7 que ejecuta un procedimiento de búsqueda directa numérica que varía el vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}$ ), y volver a ejecutar la simulación en los bloques 49-60 con los nuevos y variados elementos de vector  $\hat{c}_N$ . El procedimiento comprende además seleccionar el vector de perfil de eluyente  $\hat{c}$  que da como resultado el valor mínimo para la función de compensación como el perfil de eluyente óptimo, y que también establece dinámicamente el límite de tolerancia para la posición o posiciones pico. El procedimiento de búsqueda directa comprende preferentemente un procedimiento simplex, como el procedimiento simplex de Nelder Mead, que varía los elementos de vector  $\hat{c}_N$ . El modelo del ciclo cromatográfico no se comporta necesariamente bien para todas las formas de cromatografía, lo que significa que es una ventaja utilizar un procedimiento de búsqueda directa, o un procedimiento simplex, que son procedimientos fuertes menos afectados por las fluctuaciones de error.

30

35

Volviendo ahora a la figura 2, en una etapa de presentación 63, el procedimiento comprende presentar la posición pico resultante simulada para al menos un compuesto simulado y su perfil de eluyente asociado en la pantalla 13. Continuando una vez más hasta la etapa de entrada 43, el procedimiento también comprende proporcionar una interfaz de usuario 13 para recibir información de un usuario. En este ejemplo, el procedimiento comprende proporcionar una interfaz de usuario 13 para recibir la entrada de un usuario sobre un valor deseado para una posición pico resultante para al menos un compuesto. El procedimiento también comprende preferentemente recibir información de un usuario sobre los cambios deseados con respecto a una o más de las posiciones pico simuladas resultantes y con respecto al perfil de eluyente. Como alternativa, o en combinación, el procedimiento también puede comprender recibir una entrada de un usuario sobre uno o más valores deseados para el perfil de eluyente.

45

En este ejemplo, la pantalla es una pantalla táctil, donde el usuario puede señalar la pantalla y, por ejemplo, arrastrar una posición pico visualizada simulada a una nueva posición pico deseada. De manera similar, el usuario puede simplemente señalar una ubicación del perfil de eluyente 33, tal como en un elemento visualizado del vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}_N$ ), y arrastrar el perfil de eluyente 33 (o elemento del vector de perfil de eluyente) para formar un nuevo perfil de eluyente deseado con una nueva proporción  $c$  para un constituyente de eluyente, y/o hacia un nuevo punto de progresión del ciclo cromatográfico. Como alternativa, la entrada también podría recibirse desde un teclado, un ratón de ordenador, o alguna otra forma de dispositivo de entrada conocido en el campo de las unidades de E/S.

50

55

En caso de que uno de los valores deseados recibidos sea una variable de la función de compensación, el valor deseado para ese parámetro se cambia en función de la entrada del usuario. En caso de que uno de los valores deseados recibidos no pertenezca a la función de compensación, este valor y su parámetro pueden incorporarse como

una variable en la función de compensación. Por lo tanto, el procedimiento comprende recibir una entrada de un usuario que interactúa con el dispositivo informático en un valor deseado para al menos uno de dichos al menos dos parámetros de la función de compensación.

- 5 El procedimiento comprende entonces repetir la etapa de simulación 47 y los cálculos de los bloques de simulación 49-61, para ejecutar una optimización de la función de compensación con el al menos un procesador en función de los nuevos valores de entrada. Por lo tanto, es posible que un usuario proporcione fácil y rápidamente una entrada directa al dispositivo informático, después de haber recibido un primer resultado de simulación, y cambiarlo a voluntad para optimizar el ciclo cromatográfico en cooperación con la simulación. Por lo tanto, la habilidad, la experiencia y el conocimiento experto del usuario, y el conocimiento del usuario o las preferencias sobre los resultados deseados para el ciclo cromatográfico, en combinación con una simulación general y muy permisiva, se pueden usar en concierto para dar resultados aún mejores de lo que el usuario o el dispositivo informático podrían lograr en solitario.

- 15 El procedimiento comprende además una etapa de control 65 que comprende recibir información de un usuario en un perfil de eluyente simulado seleccionado 33 que se desea analizar en el cromatógrafo, y controlar el cromatógrafo 5 para analizar una muestra en el cromatógrafo con una fase móvil que tiene un perfil de eluyente correspondiente al perfil de eluyente seleccionado 33. Por lo tanto, es posible simular un ciclo cromatográfico para obtener las condiciones que dan los resultados deseados, y a continuación usar directamente las condiciones de la simulación para controlar el cromatógrafo 5 para llevar a cabo un ciclo cromatográfico con estas condiciones exactas. En este ejemplo, el procedimiento también comprende una etapa de retroalimentación en la que los resultados del ciclo cromatográfico real se comparan con el resultado simulado, y se evalúa cualquier discrepancia para determinar las posibilidades de mejorar el modelo. Por ejemplo, la información sobre la posición pico real para un compuesto podría usarse para mejorar los parámetros a, b, m del modelo para el factor de retención.

- 25 La invención no se limita a los ejemplos y realizaciones que se muestran, sino que puede variarse libremente dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. En particular, los diferentes aspectos y características de los ejemplos y realizaciones no son exclusivos entre sí, sino que pueden combinarse para formar nuevas realizaciones, que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para simular un ciclo cromatográfico en un cromatógrafo (5) con un dispositivo informático (3) que comprende al menos un procesador (7) y una memoria digital asociada (9), donde el ciclo cromatográfico utiliza una fase móvil (31) que comprende una mezcla de al menos dos constituyentes de eluyente que tienen diferentes propiedades cromatográficas y que forman un perfil de eluyente (33), comprendiendo el procedimiento las etapas de
- almacenar información en la memoria digital perteneciente a un modelo cromatográfico que comprende ecuaciones matemáticas para la simulación del ciclo cromatográfico, comprendiendo las ecuaciones matemáticas un sistema de modelado de ecuaciones diferenciales
  - a) progresión del perfil de eluyente de la fase móvil con respecto a una fase estacionaria (17) en el cromatógrafo,
  - b) una distribución relativa de un compuesto entre la fase estacionaria (17) y la fase móvil (31) basada en el perfil de eluyente local en la ubicación del compuesto, y
  - c) elución del compuesto con respecto a la fase estacionaria basada en la progresión del perfil de eluyente y en dicha distribución relativa,
- y
- simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador (7) que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una posición pico simulada (37) para el al menos un compuesto;
- el procedimiento **caracterizado porque** comprende además:
- almacenar una función de compensación para al menos dos variables simuladas en el modelo cromatográfico en la memoria digital (9),
  - almacenar valores deseados para las al menos dos variables y almacenar ponderaciones numéricas atribuidas a cualquier desviación de los valores deseados para dichas variables en la memoria digital,
  - simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener valores simulados para dichas al menos dos variables,
  - calcular una puntuación ponderada de compensación basada en la función de compensación y
  - ejecutar una optimización con el al menos un procesador para optimizar la función de compensación a fin de minimizar la puntuación ponderada de compensación de la función de compensación,
  - recibir una entrada de un usuario que interactúa con el dispositivo informático en un valor deseado para al menos una de dichas al menos dos variables, y
  - ejecutar una optimización de la función de compensación con al menos un procesador en función del nuevo valor de entrada,
  - almacenar un vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}$ ) en la memoria digital que comprende N elementos de vector, comprendiendo cada elemento de vector ( $\hat{c}_N$ ) información sobre la proporción momentánea c de uno de los constituyentes de eluyente en la fase móvil en un punto de progresión del ciclo cromatográfico y
  - simular el ciclo cromatográfico con cálculos basados en el vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}$ ),
  - minimizar la puntuación de compensación de la función de compensación por el al menos un procesador que ejecuta un procedimiento de búsqueda directa numérica que varía el vector de perfil de eluyente ( $\hat{c}$ ) y vuelve a ejecutar la simulación con los elementos de vector variados  $\hat{c}_N$ .
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento comprende
- recibir una entrada de un usuario sobre un valor deseado para una posición pico para al menos un compuesto cuando se eluye,
  - simular el ciclo cromatográfico por el al menos un procesador (7) que ejecuta un cálculo del modelo cromatográfico para obtener una correspondencia entre la posición pico (37) para el compuesto y un perfil de eluyente (33) para la fase móvil (31), y
  - variar la simulación para predecir un perfil de eluyente para la fase móvil que da como resultado que una posición pico simulada esté dentro de un límite de tolerancia de la posición de pico deseada.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el procedimiento comprende
- presentar una posición pico simulada para al menos un compuesto y su perfil de eluyente asociado en una pantalla,
  - y
  - proporcionar una interfaz de usuario para recibir información de un usuario sobre los cambios deseados con respecto a una o más de las posiciones pico simuladas y con respecto al perfil de eluyente.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el procedimiento comprende
- recibir uno o más valores medidos del factor de retardo (R) o del factor de retención (k) para al menos un compuesto que se origina a partir de uno o más ciclos cromatográficos anteriores de ese compuesto con una fase móvil que comprende uno o más de los al menos dos constituyentes de eluyente, y recibir información sobre la proporción

asociada  $c$  de al menos uno de los constituyentes de eluyente con respecto a la fase móvil total,

- almacenar un modelo para un factor de retención de la forma  $k = (a+b*c)^{-m}$  en la memoria digital, donde  $a$ ,  $b$  y  $m$  son parámetros del modelo,

- estimar al menos uno de los parámetros  $a$ ,  $b$  o  $m$  ajustando el al menos un factor de retardo ( $R$ ) o factor de retención

5 ( $k$ ) medidos y la proporción de eluyente asociada  $c$  en el modelo, y

- simular el ciclo cromatográfico basado en el modelo del factor de retención ( $k$ ).

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el procedimiento comprende

- recibir tres o más valores medidos del factor de retardo ( $R$ ) o del factor de retención ( $k$ ) para uno y el mismo

10 compuesto y las proporciones asociadas ( $c_1, c_2, c_3$ ) para al menos uno de los constituyentes de eluyente, y

- estimar los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $m$  por regresión no lineal.

6. Un procedimiento según la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque el procedimiento comprende

- recibir uno o más valores del factor de retardo ( $R$ ) o del factor de retención ( $k$ ) medidos en un primer sistema

15 cromatográfico,

- usar un factor de corrección ( $\alpha$ ) para corregir las diferencias entre el primer sistema cromatográfico y un segundo sistema cromatográfico al estimar al menos uno de los parámetros del modelo de factor de retención, y

- simular el ciclo cromatográfico en el segundo sistema cromatográfico.

20 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el procedimiento comprende además controlar un ciclo cromatográfico en el cromatógrafo (5), mediante

- la recepción de información de un usuario en un perfil de eluyente simulado seleccionado que se desea analizar en un cromatógrafo, y

- el control de un cromatógrafo (5) para analizar una muestra en el cromatógrafo con una fase móvil (31) que tiene

25 un perfil de eluyente correspondiente al perfil de eluyente seleccionado (33).

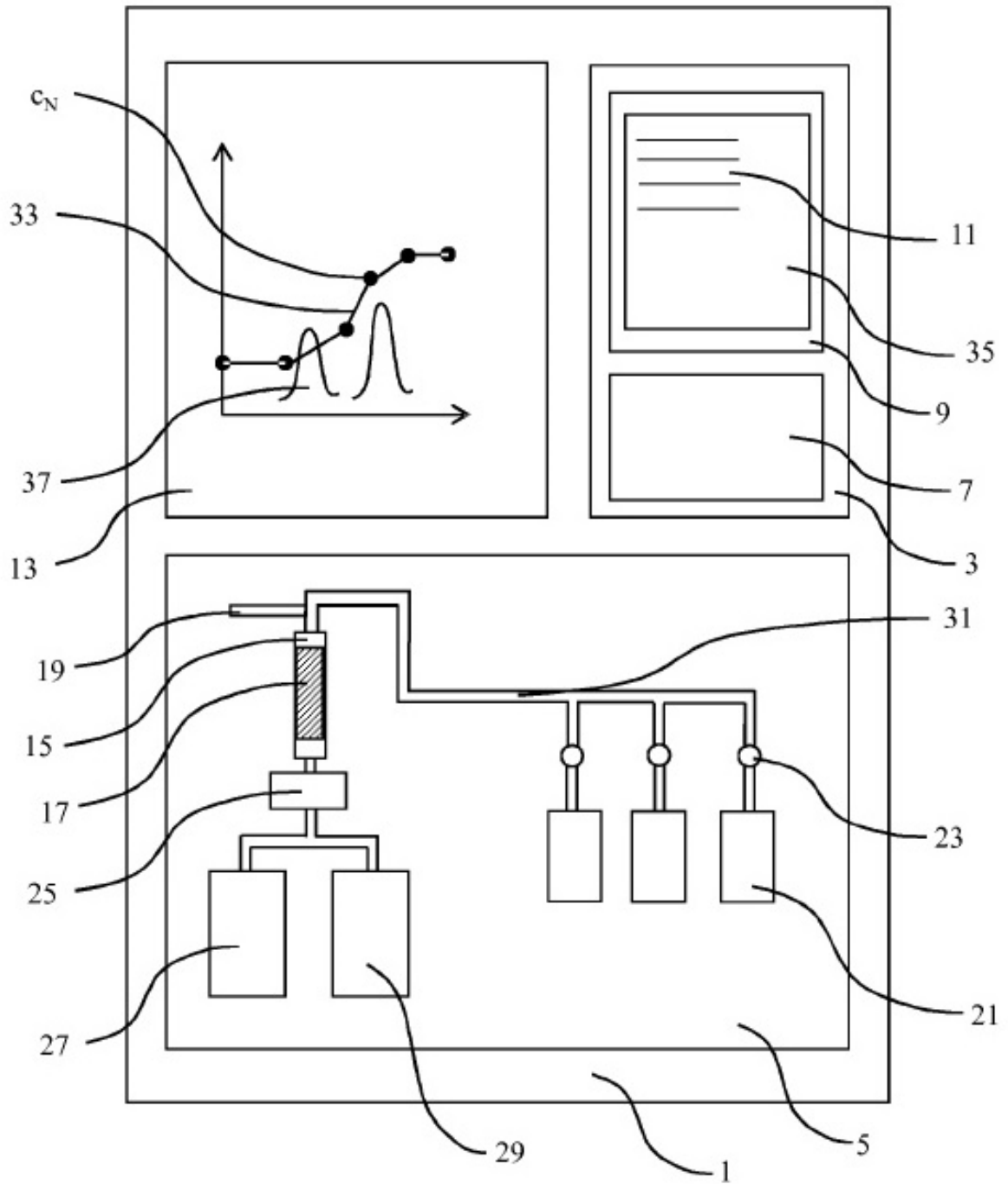


Fig. 1



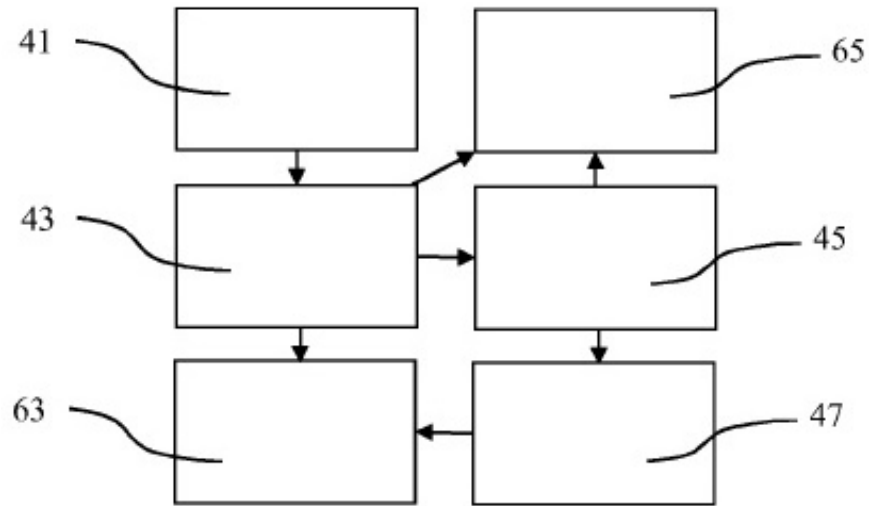


Fig. 2

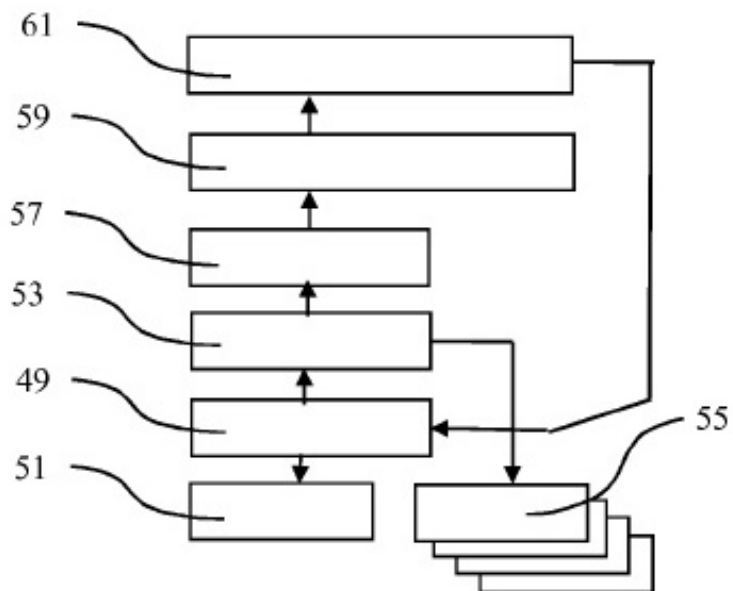


Fig. 3