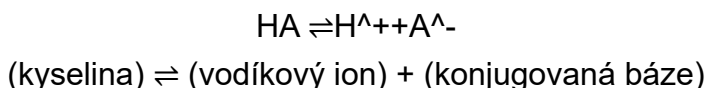


Význam správně připravené mobilní fáze

Pufr je VODNÍ roztok obsahující slabou kyselinu a její konjugovanou bázi (nebo slabou bázi a její konjugovanou kyselinu). Po přidání malého množství silné kyseliny nebo zásady se pH pufrovacího roztoku mění velmi málo a může tak pomoci zamezit změnám podmínek v analytické metodě při malých odchylkách faktorů prostředí. Pufrovací roztoky se používají k udržení pH na téměř konstantní hodnotě. Jsou odolné vůči změně pH v důsledku přítomnosti rovnováhy mezi touto slabou kyselinou (HA) a její konjugovanou bází (B).



Jak fungují pufrы

Když se do rovnovážné směsi slabé kyseliny a její konjugované báze přidá nějaká silná kyselina (více H⁺), rovnováha se posune doleva v souladu s Le Chatelierovým principem. Podobně, pokud je do směsi přidána silná báze, koncentrace vodíkových iontů klesá o méně než množství očekávané pro množství přidané báze.

Při přípravě pufrů existuje několik obecných pokynů, které byste měli dodržovat:

- Kalibrujte pH metr; ideálně při hodnotách pH nad a pod cílovou hodnotou pro přípravu pufru.
- K tomuto účelu se prodávají kalibrační pufrovací roztoky.
- Odvažte sůl pufru, abyste dosáhli požadované koncentrace pufru.
- Přidejte ji do odměrné baňky obsahující vodu v čistotě pro HPLC a důkladně promíchejte, aby se rozpustila.
- Pomocí sondy a pH metru změřte pH roztoku.
- Upravte pH na požadovanou hodnotu přidáním malého objemu silné kyseliny a/nebo silné báze.
- Jakmile je pH správné, zřeďte roztok na konečný požadovaný objem a dobře promíchejte.

V HPLC se pufrы obvykle používají k ovlivnění sekundárních interakcí, které jsou v chromatografii obecně považovány za „nežádoucí“. Používají se také k řízení ionizačního stavu analytu, aby se zajistilo, že není přítomen ve více než jednom ionizovaném stavu. pK_a sloučeniny představuje pH, při kterém je z 50% ionizovaná a z 50% neutrální. Pokud pracujete při tomto pH, uvidíte rozdělené píky (split peaks) a proměnlivé retenční časy. Všechny metody by měly být alespoň dvě jednotky pH od pK_a cílového analytu.

Fig 1.

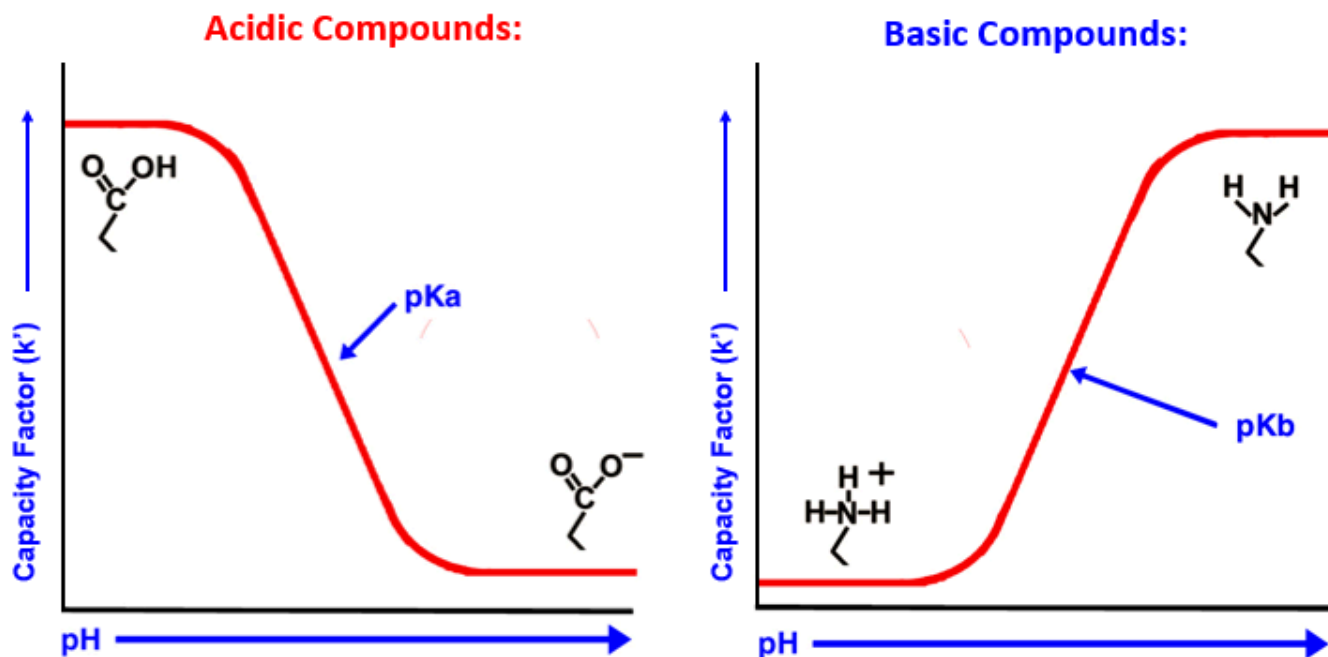
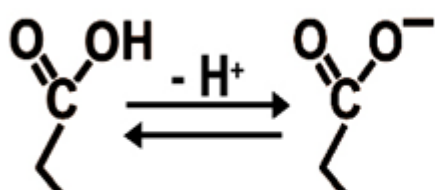


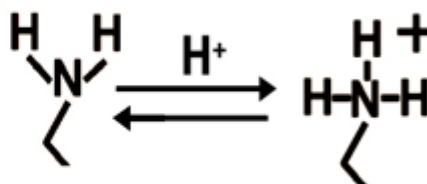
Fig. 2

Acids



- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| • More hydrophobic | • Less hydrophobic |
| • More strongly retained | • Less strongly retained |

Bases



- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| • More hydrophobic | • Less hydrophobic |
| • More strongly retained | • Less strongly retained |

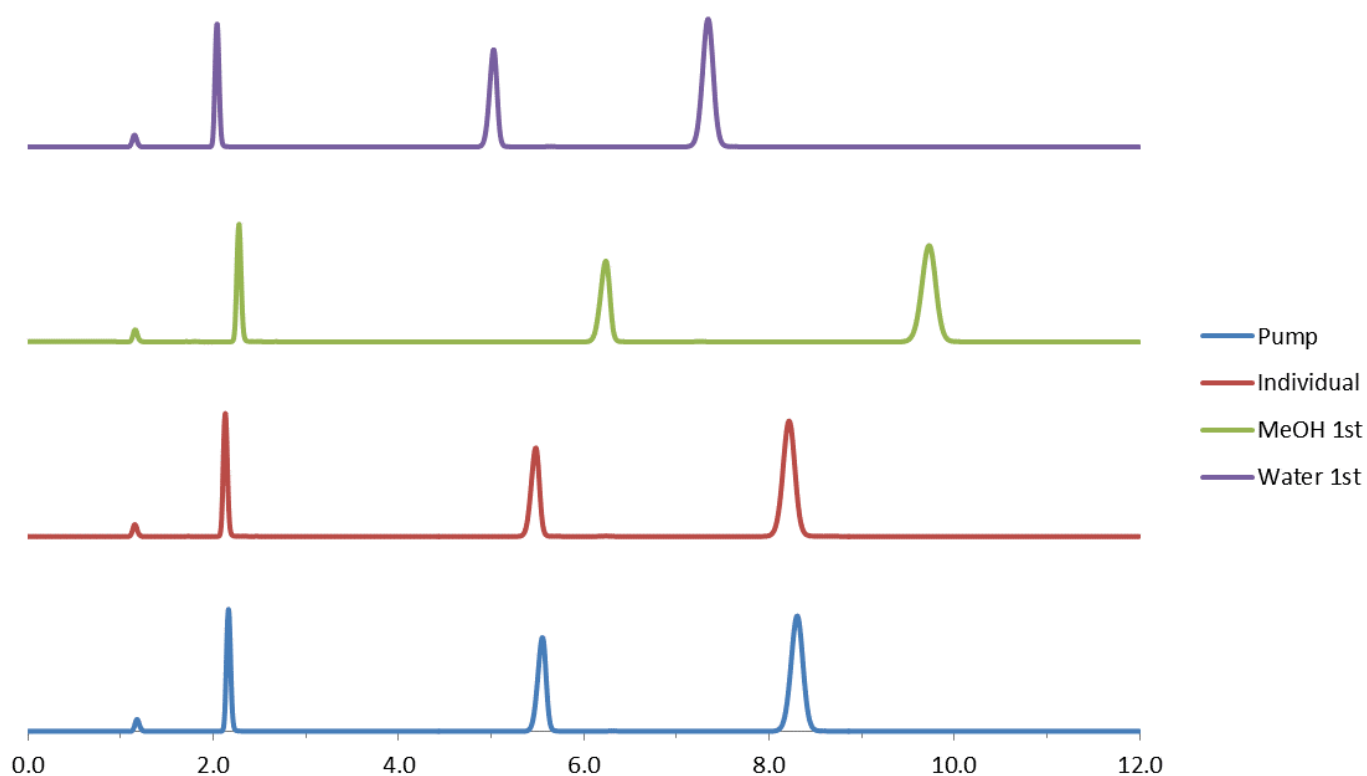
Při přípravě izokratických mobilních fází je několik dalších hledisek k zajištění dostatečné robustnosti metody.

- Pokud je to možné, předem promíchejte svou mobilní fázi, čímž se eliminuje chyba pumpy.
- Pro přípravu používejte vždy stejnou metodu; například pokud nejprve přidáte vodu, měli byste ji vždy přidat jako první. Pokud jednotlivé komponenty změříte a poté promícháte, měli byste to dělat vždy tímto způsobem. Tento proces neměňte, protože výsledky se mohou významně lišit, pokud jde o retenční čas analytu.

Níže je experiment, který ukazuje tuto variabilitu, když byly mobilní fáze smíchány následujícími způsoby.

1. Nejprve voda: 400 ml vody v odměrném válci, přidejte do 1 litrové odměrné baňky, zřeďte po značku MeOH
2. Nejprve MeOH: 600 ml MeOH v odměrném válci, přidejte do odměrné baňky o objemu 1 litr, zřeďte po značku vodou
3. MeOH a voda měřeny jednotlivě: 600 ml MeOH v odměrném válci, přenos do zásobníku mobilní fáze; 400 ml vody ve stejném odměrném válci a převedeno do zásobníku mobilní fáze
4. Nechte čerpadlo smíchat A = vodu s B = MeOH

Fig. 3



*Kinetex™ 5μm XB-C18 150 x 4.6mm; 60:40 MeOH: H2O
Průtok 1.25mL/min
Objem nástřiku 2μL*

Koncentrace pufru jsou také důležité, obecně se má za to, že koncentrace pod 10 mM nenabízejí pufrovací kapacitu potřebnou k ovlivnění aktivity silanolu, nebo ionizačního stavu sloučeniny. Koncentrace 10 mM je považována za minimální efektivní koncentraci pro reverzní fázi a HILIC. U jiných technik, jako je size exlucion, jsou vyžadovány výrazně vyšší koncentrace a u těchto metod nejsou neobvyklé koncentrace vyšší než 100 mM. Koncentrace pufru je něco, co musí být pečlivě vyváženo, aby byla zajištěna rozpustnost za všech podmínek. Pokud pracujete s reverzní fází, možná budete muset omezit koncentraci pufru, se kterým pracujete, pokud metoda obsahuje vysoké hladiny organických látek (například přes gradient), aby se předešlo vysrážení pufru.

Mobilní fáze přispívá k selektivitě stejně jako Vaše stacionární fáze. Její správný výběr a příprava je stejně důležitá jako testování šarží stacionárních fází při vývoji robustních HPLC metod.