

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 210**

51 Int. Cl.:
G01N 30/34 (2006.01)
B01D 15/12 (2006.01)
B01J 39/00 (2006.01)
B01J 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09734212 .5**
96 Fecha de presentación: **20.04.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2269055**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

54 Título: **PREPARACIÓN DE MEZCLAS LÍQUIDAS.**

30 Prioridad:
21.04.2008 SE 0800915

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
GE Healthcare Bio-Sciences AB
Björkgatan 30
751 84 Uppsala

72 Inventor/es:
BJÖRKESTEN, Lennart;
CARRDANO, Enrique;
MALMQUIST, Gunnar;
RODRIGO, Gustav y
STAFSTRÖM, Nils

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 210 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

Preparación de mezclas líquidas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para generar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica controlados, así como a un dispositivo aplicable a dicho método. La invención es de interés general en cualquier situación en la que se necesite una preparación exacta de un amortiguador de pH.

Antecedentes

10 La obtención de líquidos de composición conocida de forma precisa es importante en muchos casos, como cuando se usan disoluciones tampón que tienen un pH, y opcionalmente también una fuerza iónica, especificados. Además, en muchos casos, la composición del líquido no debería solo ser conocida y controlada de forma precisa en cada momento, sino que también debería variar con el tiempo de forma precisa y controlada.

15 Una aplicación en la que la composición de los líquidos es de suma importancia es en cromatografía líquida y más específicamente cuando la elución, es decir la liberación de moléculas diana aisladas de la matriz cromatográfica, se realiza por elución en gradiente. Por ejemplo, en cromatografía de intercambio iónico, que es un método usado frecuentemente para la separación y purificación de biomoléculas, se usa a veces elución en gradiente, por ejemplo para encontrar las condiciones de elución óptimas que permiten el diseño de un procedimiento industrial usando elución escalonada. Como es bien conocido, el eluyente contiene entonces una sal inerte y el gradiente se realiza variando la concentración de esta sal. Es bien conocido que un cambio en la concentración de la sal, es decir en la fuerza iónica, afecta también al pH, y ha sido bien documentado que el pH y la fuerza iónica del eluyente son los dos parámetros más importantes que controlan la selectividad de las separaciones de proteínas en resinas de intercambio iónico.

20 La patente estadounidense N° 5.112.949 (Vukovich) se refiere a un sistema automático para realizar una separación usando un gradiente. Un problema con dichos sistemas manuales y automáticos con gradientes que cambian gradualmente es que si el gradiente es suave toma mucho tiempo realizar la elución y si el gradiente se hace brusco entonces en lugar de que las biomoléculas de interés sean eluidas una por una, se producirán solapamientos en la elución de las biomoléculas. Esto lleva a que varias especies de biomoléculas sean recogidas en cada fracción en lugar de que cada especie de molécula se recoja en su propia fracción separada.

25 La patente estadounidense N° 7.138.051 (De Lamotte) se refiere a un sistema, método y software cromatográfico para la separación de biomoléculas. Más específicamente, esta patente se refiere a la optimización de la separación de biomoléculas eluidas de una columna cromatográfica en la que la concentración de un componente añadido a una disolución tampón de elución se varía con el fin de formar una disolución tampón de elución en la que la concentración de dicho componente añadido varíe gradualmente.

30 Okamoto (Hirokazu Okamoto *et al.*, *Pharmaceutical Research*, Vol. 14, N° 3, 1997: *Theory and Computer Programs for Calculating Solution pH, Buffer formula and Buffer Capacity for Multicomponent System at a Given Ionic Strength and Temperature*) describe programas de ordenador para calcular el pH de la disolución, la fórmula del amortiguador de pH y la capacidad del amortiguador de pH para una fuerza iónica y temperatura dadas. Sin embargo, los amortiguadores de pH preparados por Okamoto *et al.* muestran una variación del pH que aumenta al aumentar la concentración de la sal, incluso para concentraciones tan bajas como 0,3M. Por lo tanto, los métodos de Okamoto no son suficientes para proporcionar disoluciones tampón de pH constante que también contengan una sal.

35 La forma tradicional de formación de gradiente ha implicado la preparación cuidadosa de eluyentes que comprenden sales inertes así como disoluciones tampón de pH determinado previamente para producir un gradiente de fuerza iónica a pH constante. La optimización de la separación de las proteínas se ha realizado cambiando la pendiente del gradiente de la sal inerte y/o cambiando el sistema amortiguador de pH por uno con pH diferente.

40 En la técnica anterior inicial, la optimización incluía la preparación de numerosas disoluciones tampón con pH y concentraciones salinas predeterminados que debían ser valoradas meticulosamente para que las separaciones fueran reproducibles. Obviamente, dichos métodos eran poco prácticos y requerían mucho tiempo.

45 Los métodos para el cálculo del pH de la disolución tampón para fuerzas iónicas moderadas (hasta 100mM) están documentados en la bibliografía y se basan en la solución algebraica o por ordenador de las ecuaciones de equilibrio entre las diferentes especies cargadas y no cargadas presentes en el amortiguador de pH.

50 Para una especie básica particular (que puede ser una base B o una base conjugada A⁻) en equilibrio con las especies ácidas correspondientes (que pueden ser un ácido conjugado BH⁺ o un ácido HA, respectivamente), el equilibrio se puede escribir:



La constante de equilibrio, Ka, correspondiente se define como:

$$K_a = (H^+) \text{ (especie básica) / (especie ácida)} \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde los paréntesis indican las actividades de cada especie. Tomando logaritmos en ambos miembros de la ecuación 1.2 y despejando el pH definido como $-\log (H^+)$ se obtiene:

$$pH = pK_a + \log \{(\text{especie básica}) / (\text{especie ácida})\} \quad \text{Ec 1.3}$$

5 que a veces se denomina ecuación de Henderson-Hasselbach. La razón por la que se usan las actividades en la ecuación 1.2 en lugar de las correspondientes concentraciones es que, debido a las interacciones electrostáticas, los iones implicados tienden a apantallarse en el medio. Sin embargo, mientras que las medidas de pH son observaciones directas de la actividad de los protones, generalmente son las concentraciones y no las actividades correspondientes las que se observan, por ejemplo por pesada, pipeteo o bombeo de sus cantidades y volúmenes. 10 La actividad de cada ión se relaciona con la concentración correspondiente mediante el coeficiente de actividad :

$$(\text{especie}) = [\text{especie}] \quad \text{Ec. 1.4}$$

En el estado ideal de dilución infinita, se hace 1 y la actividad de cada ión se hace igual a la concentración correspondiente. Sin embargo, en los casos reales, la fuerza iónica es diferente de 0 y los coeficientes de actividad de las diferentes especies se hace menor que 1.

15 Para estas desviaciones se ha desarrollado un modelo bien establecido en la denominada teoría de Debye Hückel, conocido como:

$$-\log = (A Z^2 I^{0.5}) / (1 + 0,33 \cdot 10^8 a I^{0.5}) \quad \text{Ec. 1.5}$$

20 donde A es una constante, o más bien un parámetro dependiente de la temperatura $\sim 0,51$. Usando datos bien conocidos, el valor de A se puede calcular exactamente como $A = 0,4918 + 0,0007 \cdot T + 0,000004 \cdot T^2$ donde T es la temperatura en grados Celsius. Z es la carga del ión y la cantidad a, el radio de los iones hidratados (en Å), se describe como la "distancia media de aproximación de los iones, positivos o negativos" en el trabajo original de Debye y Hückel.

25 En una tabla presentada en el artículo de Kielland mencionado anteriormente se ha mostrado que este parámetro, también conocido como el parámetro del tamaño iónico, es diferente para especies iónicas diferentes. I es la fuerza iónica:

$$I = \frac{1}{2} (C_i Z_i^2) \text{ (incluidos todos los iones)} \quad \text{Ec. 1.6}$$

C_i es la concentración y Z_i es la carga del ión presente en la disolución (en unidades de carga eléctrica).

Introduciendo la ecuación 1.4 en la ecuación 1.3 se obtiene el pH en función de la concentración en lugar de las actividades:

$$\begin{aligned} pH &= pK_a + \log \{ \frac{b[\text{especie básica}]}{a[\text{especie ácida}]} \} = \\ &= pK_a + \log b - \log a + \log \{ [\text{especie básica}] / [\text{especie ácida}] \} = \\ &= pK_a' + \log \{ [\text{especie básica}] / ([\text{especie ácida}]) \} \quad \text{Ec. 1.7} \end{aligned}$$

donde:

$$pK_a' = pK_a + \log b - \log a \quad \text{Ec. 1.8}$$

35 es un valor de pKa aparente que permite utilizar los valores medibles de las concentraciones de las diferentes especies del amortiguador de pH. El valor de pKa' puede calcularse introduciendo la ecuación 1.5 en la ecuación 1.8, dando:

$$pK_a' = pK_a + (A Z_a^2 I^{0.5}) / (1 + 0,33 \cdot 10^8 a_a I^{0.5}) - (A Z_b^2 I^{0.5}) / (1 + 0,33 \cdot 10^8 a_b I^{0.5}) \quad \text{Ec. 1.9}$$

40 donde la introducción de los subíndices a y b fue necesaria para especificar los parámetros correspondientes al ácido y la base. Por lo tanto:

Z_a = carga de la especie ácida

Z_b = carga de la especie básica

a_a = parámetro del tamaño iónico de la especie ácida

a_b = parámetro del tamaño iónico de la especie básica

Aplicada a los cálculos del pH, la teoría de Debye-Hückel produce la modificación de los valores de pKa de los amortiguadores de pH (denominados valores termodinámicos de pKa) en los valores de pKa' correspondientes dados por la ecuación 1.9. La mayoría de los parámetros en la ecuación 1.9 se pueden estimar de forma sencilla. El parámetro que supone un mayor reto es a .

- 5 Guggenheim y Schindler (véase Guggenheim, E. A. y Schindler, T. D. (1934) *J. Phys. Chem.* 33, 533), han sugerido una aproximación del parámetro a a 3 Å para todas las moléculas del amortiguador de pH lo que lleva a la fórmula algo simplificada:

$$\text{pK}_a' = \text{pK}_a + (\text{A Z}_a^2 \text{I}^{0.5}) / (1 + \text{I}^{0.5}) - (\text{A Z}_b^2 \text{I}^{0.5}) / (1 + \text{I}^{0.5}) \quad \text{Ec. 1.10}$$

- 10 La ecuación 1.10 anterior es la fórmula de la corrección de la fuerza iónica que se encuentra generalmente en la bibliografía. A veces los términos de la corrección se añaden en el lado derecho de esta ecuación para compensar la pérdida de exactitud a valores mayores de la fuerza iónica para varios amortiguadores de pH. Sin embargo, la exactitud obtenida haciendo esto es pequeña cuando la fuerza iónica es tan alta como 1M, que está en los intervalos usados generalmente en la elución en gradiente, por ejemplo en la cromatografía de intercambio iónico y HIC.

- 15 Kielland (Jacob Kielland en *Activity Coefficients of Ions in Aqueous Solutions*, Septiembre 1937) ha estudiado los coeficientes de actividad de iones en líquidos y proporciona una extensa tabla de coeficientes de actividad iónica, considerando el diámetro de los iones hidratados. Los datos presentados por Kielland para el parámetro del tamaño del ión hidratado a_i se obtuvieron usando cuatro modelos diferentes: el modelo de Bonino que tiene en cuenta el radio del cristal y su deformabilidad; la ecuación bien conocida $108a_i = 182z_i / \text{I}_\infty$, que tiene en consideración las
- 20 movilidades iónicas; la modificación empírica de la teoría de Brull y, finalmente, el método de la deficiencia de entropía de Ulrich. Los valores medios redondeados de dichos cuatro modelos se usaron para obtener los datos recogidos en dicho estudio. Los valores de a_i presentados por Kielland presentan una variación considerable, de 2,5 hasta tanto como 11, y se han sugerido modelos no generales para el coeficiente de actividad basados en esta variación dependiente de la naturaleza de los iones, es decir una ecuación para los iones inorgánicos y una ecuación diferente para los iones orgánicos.

- 25 La patente estadounidense US 6.221.250 (Stafström) se refiere a un método de preparación de mezclas líquidas que usa ventajosamente la aproximación del parámetro a indicada anteriormente. Más específicamente, el método de preparación de una mezcla descrito comprende los siguientes componentes: (i) uno o más especies amortiguadoras del pH; (ii) un ácido o alternativamente una base; (iii) opcionalmente una sal; y (iv) un disolvente. Las proporciones de los componentes (i) a (iv) se varían de forma concomitante de forma que se tiene en cuenta las interrelaciones del pH y la fuerza iónica de la mezcla líquida para obtener en cada momento un pH preseleccionado de la mezcla, y el método se basa en el uso de una ecuación modificada y repetitiva de Guggenheim-Schindler (Ec. 1.10, anterior) en la que los factores de corrección específicos para el amortiguador de pH se usan para obtener un pH constante con el gradiente. Por lo tanto, en algunas ocasiones, una desventaja de este método puede ser que si se necesita introducir un nuevo amortiguador de pH los cálculos deben realizarse de nuevo.

- 35 Otra aplicación en la que es esencial preparar mezclas líquidas de pH y fuerza iónica controlada es en el método de selección de alto rendimiento (HTS por sus iniciales en inglés: *high throughput screening*), que es un método de experimentación científica usado frecuentemente en el descubrimiento de fármacos pero también adecuado en los campos de la biología y la química. Mediante una combinación de moderm robótico, programas de procesamiento de datos y control, dispositivos de manipulación de líquidos y detectores sensibles, el HTS permite a los investigadores realizar eficazmente millones de ensayos bioquímicos, genéticos o farmacológicos en un corto periodo de tiempo. A través de este procedimiento se pueden identificar rápidamente compuestos activos, anticuerpos o genes que modulan una vía biomolecular determinada. Los resultados de estos experimentos pueden proporcionar, por ejemplo, puntos iniciales para el diseño de fármacos y para comprender la interacción o el papel de un procedimiento bioquímico particular en biología. La automatización es un elemento importante en la utilidad del HTS.
- 40 Un robot especializado es responsable a menudo de la mayor parte del procedimiento durante el tiempo de duración de una sola placa de ensayo, desde la creación hasta el análisis final. Un robot de HTS puede preparar y analizar generalmente muchas placas simultáneamente, acelerando adicionalmente el procedimiento de recogida de datos. Sin embargo, para que estos robots funcionen de forma exacta, es esencial de nuevo la preparación de mezclas líquidas tales como amortiguadores de pH que tengan controlado de forma precisa el pH así como la fuerza iónica.

- 50 Una aplicación en el área del HTS que está teniendo un valor en aumento es el desarrollo de procedimientos de alto rendimiento (HTPD, por sus iniciales en inglés: *high throughput process development*), en el que los papeles del pH y de la fuerza iónica son muy importantes ya que controlan el comportamiento del enlace de la(s) diana(s) y el(los) contaminante(s). Mediante el diseño con éxito de dichos procedimientos de alto rendimiento, las condiciones para tasas de transferencia de masa elevadas y, por lo tanto, para la economía del procedimiento, y también para la elución óptima, y en consecuencia elevada recuperación, pueden predecirse de forma exacta. Sin embargo, dicho diseño exitoso requeriría, o al menos mejoría mucho, con la preparación automática de los amortiguadores de pH, permitiendo la preparación de numerosas condiciones tales como pH e I en cortos intervalos de tiempo.

Otra necesidad para la preparación de amortiguadores de pH de forma precisa y bien controlada aparece en las microplacas y otros formatos de laboratorio. Muchas etapas en los ensayos basados en microplacas y en placas

5 filtrantes se pueden realizar fácilmente en paralelo usando, por ejemplo, multipipetas y bloques de vacío para el procesamiento y lectores de placas para la detección de los resultados. A menudo es necesario un alto nivel de automatización, por ejemplo en el transporte automático de placas. Esto es válido incluso para muchas "aplicaciones de alto rendimiento" ya que se gana un factor de 96 ó 384 en el número de experimentos mediante la integración de la placa en el primer lugar. Sin embargo, hay casos que implican la preparación tediosa de pocillos individuales en la placa. Aunque se da por descontado el uso de lectores de placa compactos dedicados para la detección y análisis de pozos individuales, no existen soluciones similares dedicadas, de precio razonable y compactas para la preparación de amortiguadores de pH en pocillos en una microplaca. TECAN es una compañía que ha abordado el problema de escribir un software para proporcionar la preparación de un amortiguador de pH en microplacas usando su plataforma de automatización para laboratorios. Esto se podría percibir a simple vista como una solución elegante, pero ocasiona la ocupación de una infraestructura de automatización cara durante horas para una tarea relativamente sencilla en un laboratorio de automatización bien equipado. Además, es necesaria una inversión grande para que un laboratorio pequeño aproveche la solución TECAN.

10 Por lo tanto, también se necesita un dispositivo dispensador automático, tal como una unidad independiente, que pueda usarse como una estación de trabajo junto con soluciones automáticas, por ejemplo, reducir la carga de trabajo en una infraestructura de automatización primaria.

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un método de control preciso y exacto del pH y la fuerza iónica en una mezcla líquida. Brevemente, esto puede obtenerse proporcionando un método de preparación de una mezcla líquida, tal como un amortiguador de pH, cuyo método tiene en cuenta tanto el tamaño como la carga de los iones orgánicos como de los inorgánicos. Esto se puede obtener como se define en una o más de las reivindicaciones adjuntas.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método mejorado de preparación de un amortiguador de pH en el que primero se calcula la composición exacta y subsiguientemente se prepara el amortiguador de pH en una única etapa.

Un aspecto específico de la invención es proporcionar las herramientas para la preparación de un amortiguador de pH en la que se garantiza el intervalo de pH para cada amortiguador de pH respectivo calculando la capacidad del amortiguador de pH.

30 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para definir la composición de una mezcla líquida en función de las especies del amortiguador de pH, la concentración del amortiguador de pH y/o la concentración de la sal, basado en un pH y/o fuerza iónica deseados, y la capacidad del amortiguador de pH. Así, comenzando por el pH deseado de una mezcla líquida, y opcionalmente también la fuerza iónica deseada y la capacidad del amortiguador de pH, la presente invención definirá las especies apropiadas del amortiguador de pH así como los valores apropiados del amortiguador de pH así como la concentración de la sal para obtener dichos pH y fuerza iónica y dicha capacidad del amortiguador de pH.

Finalmente, otro aspecto de la invención es usar el presente método de definición del amortiguador de pH en un dispositivo auto-dispensador para la preparación inteligente de un amortiguador de pH en microplacas y otro material de laboratorio. Esto se puede obtener introduciendo un software basado en el modelo presentado anteriormente. En un aspecto específico, el dispositivo comprende una interfase para la automatización.

40 Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención aparecerán a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones siguientes.

Definiciones

Un "amortiguador de pH" significa en la presente memoria un componente o compuesto que en disolución líquida mantiene un valor de pH prácticamente constante a pesar de la adición de cantidades considerables de ácido y/o base. El término "programa de ordenador" se usa en la presente memoria de forma intercambiable con el término "software".

Breve descripción de los dibujos

La figura 4 describe una tabla 1 que muestra la raíz cuadrática media del error entre los valores de pH experimentales y entre los valores de pH calculados y experimentales por tres métodos diferentes.

50 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar las proporciones relativas de los componentes de al menos uno entre cada:

- un amortiguador de pH.

- un ácido o una base,
- un disolvente,

y opcionalmente

- una sal,

5 para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos,

en el que las proporciones relativas de los componentes se determinan usando la ecuación de Debye-Hückel, en el que el parámetro del tamaño iónico en la ecuación de Debye-Hückel se determina como la media ponderada del tamaño iónico de todas las especies que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, y en el que la fuerza iónica de cada especie se usa como parámetro de ponderación.

10 Por lo tanto, se proporciona un método general aplicable a mezclas líquidas que comprende especies amortiguadoras del pH orgánicas así como inorgánicas. Como se ha indicado anteriormente, dichas mezclas líquidas amortiguadas se usan ampliamente en muchos campos de la química y la biología. El presente método permite la predicción (determinación) mejorada de las proporciones relativas de los componentes con el fin de obtener una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidas, especialmente para concentraciones elevadas del amortiguador de pH y/o de la sal, lo que se confirma por los resultados experimentales siguientes. También se debería tener en cuenta que el presente método se puede usar, por el contrario, para determinar el pH y la fuerza iónica resultantes de una mezcla líquida de una constitución específica.

20 Como se ha indicado anteriormente, las diferentes aproximaciones de la ecuación de Debye-Hückel se usan ampliamente con el fin de determinar las proporciones relativas de los componentes de las disoluciones amortiguadoras de pH, etc. pero hasta ahora todas ellas proporcionan baja exactitud y concentraciones más altas de amortiguador de pH y/o de sal. El método proporcionado supera estos problemas mediante la determinación del parámetro del tamaño iónico a como el tamaño iónico medio ponderado de todas las especies que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, y en el que la fuerza iónica de cada especie se usa como parámetro ponderado.

Según un modo de realización, el parámetro de tamaño iónico a para la mezcla líquida se calcula como:

$$25 \quad a = \frac{\sum I_i a_i}{I} \quad \text{Ec. 1.11}$$

donde I_i es la fuerza iónica y a_i el parámetro de tamaño iónico de la especie i , e I la fuerza iónica total definida por la ecuación 1.6 anterior. A partir de dicha ecuación, por lo tanto,

$$I_i = \frac{1}{2} z_i^2 c_i \quad \text{Ec. 1.12}$$

30 El parámetro de tamaño iónico a_i de la especie i es un valor establecido experimentalmente o de forma aproximada, y ejemplos de los valores de a_i para algunos amortiguadores de pH y sales se recogen en la tabla 2 del ejemplo 2.

35 A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "especie" incluye cualquiera y todos los iones o moléculas que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, y más específicamente un componente, por ejemplo un sistema amortiguador de pH tal como un ácido débil puede corresponder a dos o más especies de carga diferente, cada una de ellas con un valor de a_i asociado. Debido al hecho de que a_i está relacionado con el "tamaño iónico" en un medio específico, se ha encontrado que el valor a_i de una especie específica puede ser diferente para diferentes combinaciones de componentes, por ejemplo amortiguador de pH, sal, etc. Por ejemplo, se ha encontrado que los valores de a_i para el NaCl son diferentes cuando se mezcla con un amortiguador de pH de fosfato en comparación con un amortiguador de pH de acetato, como se muestra en la tabla 2 siguiente. Sin embargo, se ha encontrado que los valores de a_i son válidos para las combinaciones de componentes ensayadas en un amplio intervalo de pH y de fuerza iónica usando el presente método, lo que resulta en una previsibilidad aumentada esencialmente en todos los intervalos. La figura 5 del ejemplo 2 muestra una gráfica del pH calculado frente al pH medido para un número elevado de muestras de amortiguadores de pH preparadas basándose en el método anterior. A partir de esta gráfica es evidente que el método descrito es capaz de definir las proporciones de los componentes relativos pertinentes en un intervalo de pH muy amplio.

45 Según un modo de realización, se ha encontrado adicionalmente que el parámetro de tamaño iónico a en la ecuación de Debye-Hückel se puede aproximar como:

$$a = 0,5 * (\text{masa})^{1/3} + \text{capa} \quad \text{Ec. 1.13}$$

donde la determinación de a requiere menor capacidad de procesamiento. En esta ecuación el término "capa" se debe a una capa adicional que puede ser considerada como una "capa de hidratación" del ión. Con respecto a este

modo de realización, se encontró que si la “capa” se fijaba a un valor específico fijo, entonces el término denominado “constante” en la ecuación de Debye-Hückel era igual a 0,5, como aparece por ejemplo en la tabla 1 presentada en la figura 4.

5 Por lo tanto, en un modo de realización, la “capa” se fija a un valor específico para una especie iónica cargada positivamente y la “capa” se fija a otro valor diferente para una especie iónica cargada negativamente. En un modo de realización, la “capa” está en el intervalo de 3,8-4,2, tal como 3,9-4,1 o 4, para una especie iónica cargada positivamente ($capa_pos = 4$). En otro modo de realización específico, la “capa” está en el intervalo de 0-0,2, tal como 0-0,1 o 0, para una especie iónica cargada negativamente ($capa_neg = 0$).

10 Una ventaja de la presente invención, en comparación con los métodos de la técnica anterior, tal como el de Okamoto presentado anteriormente, es que la presente invención permite la preparación de mezclas líquidas tales como amortiguadores de pH no solo para concentraciones bajas de sal, sino también para concentraciones mayores de sal, como por encima de 1M, por encima de 2M o incluso por encima de 5M.

15 Por lo tanto, en un modo de realización específico, la presente invención es un método para proporcionar una mezcla líquida tal como un amortiguador de pH en la que la concentración de sal es hasta 1M, específicamente en el intervalo de 1-2M o más específicamente por encima de 2M.

Según un modo de realización, las proporciones relativas de los componentes se determinan usando un procedimiento iterativo.

Según un modo de realización específico mostrado esquemáticamente en la figura 1, el procedimiento iterativo comprende:

- 20 (a) determinar, 10, las proporciones relativas de los componentes en la que la fuerza iónica predefinida de la mezcla líquida se refiere 20 a las especies según una distribución predefinida entre las especies;
- (b) en función de las proporciones relativas de los componentes determinadas en la etapa precedente calcular, 30, la fuerza iónica de cada especie en la mezcla;
- 25 (c) determinar, 40, una nueva serie de proporciones relativas de los componentes; teniendo en cuenta la fuerza iónica calculada en (b), y
- (d) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se obtiene un criterio de convergencia, 50, predeterminado.

30 El abordaje de la fuerza iónica predefinida de la mezcla líquida entre las especies, en la etapa (a), se predefine como la obtención de un punto inicial adecuado para el procedimiento iterativo con el fin de obtener una convergencia rápida y de evitar una convergencia falsa. Según un modo de realización, la fuerza iónica predeterminada de la mezcla líquida se refiere a las especies salinas, ya que normalmente son contribuyentes dominantes a la fuerza iónica total de un amortiguador de pH que comprende un componente salino. Para mezclas líquidas, sin ningún componente salino, se refiere a la fuerza iónica predefinida de la mezcla líquida.

35 En la etapa (b), las proporciones relativas de los componentes determinadas en la etapa precedente, es decir en la etapa (a) en la primera iteración y en la etapa (c) en las iteraciones subsiguientes, se usan para calcular la fuerza iónica de cada especie en la mezcla. Por lo tanto, la concentración de cada especie definida por las proporciones relativas de los componentes se usa para calcular una distribución de fuerza iónica más correcta, que subsiguientemente se usa para determinar proporciones relativas de los componentes más correctas (etapa (c)) y así sucesivamente, hasta la convergencia.

40 Los criterios de convergencia predeterminados se pueden elegir para que sea cualquier criterio adecuado que asegure que las proporciones relativas de los componentes se definen con suficiente exactitud, con un esfuerzo computacional razonable. Según un modo de realización, los criterios de convergencia se deben elegir para ser la etapa de iteración cuando la desviación entre la última serie de proporciones relativas de los componentes y la serie encontrada en la etapa inmediatamente precedente no excede un nivel máximo predefinido, reteniendo esta última serie de proporciones relativas de los componentes como la que permite obtener la mezcla con el pH predefinido para una concentración dada de la sal. En un modo de realización alternativo, los criterios de convergencia se pueden elegir, por ejemplo, como un número fijo de iteraciones y otras relaciones adecuadas. En un modo de realización específico, el procedimiento anterior se itera menos de 10 veces, preferiblemente menos de 8 veces y más preferiblemente 4-6 veces, tal como 5 veces.

50 Según un modo de realización, esquemáticamente mostrado en la figura 2, el método para determinar las proporciones relativas de los componentes de una mezcla líquida se puede usar en un método para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos 70, que comprende:

- proporcionar, 80, disoluciones madre de los componentes de al menos uno entre cada:
 - un amortiguador de pH,

- o un ácido o una base,
- o un disolvente,

y opcionalmente

- o una sal

- 5
- determinar, 90, la proporción relativa de cada disolución madre del componente que se debe mezclar usando el método anterior,
 - mezclar, 100, las disoluciones madre.

10 En modos de realización alternativos, una o más disoluciones madre de los componentes pueden ser sustituidas por una fuente en fase sólida de dicho componente, con lo que la proporción relativa de la fase sólida se disuelve durante la mezcla de los componentes.

Mediante este método, se puede preparar una gran cantidad de disoluciones amortiguadoras de pH u otras mezclas líquidas con gran exactitud, en respuesta a un pH y una fuerza iónica predefinidos.

15 Según un modo de realización, el método se puede usar para preparar mezclas líquidas en las que la fuerza iónica cambia gradualmente con el tiempo (por ejemplo, con el volumen) combinando concomitantemente proporciones variantes de las disoluciones madre de los componentes y en las que el valor del pH o del flujo líquido se puede mantener esencialmente constante. Si se desea, se pueden preparar mezclas líquidas con un gradiente de pH o incluso combinaciones de gradientes de pH y de fuerza iónica.

20 La presente invención es útil para determinar las proporciones relativas de los componentes para mezclas líquidas tales como amortiguadores de pH que comprenden dos o más especies amortiguadoras de pH, a menudo reconocidas como especies líquidas amortiguadoras de pH múltiples. Por lo tanto, en un modo de realización, la presente invención es un método como se ha descrito anteriormente, en el que se preparan dos o más disoluciones madre, cuyas disoluciones madre comprenden diferentes especies amortiguadoras de pH. En un modo de realización alternativo, se proporciona una disolución madre que comprende al menos dos, tales como tres, cuatro o más, especies amortiguadoras de pH.

25 En un modo de realización, el presente método para determinar las proporciones relativas de los componentes se puede denominar como un método para la definición del amortiguador de pH que define uno o más de los parámetros elegidos entre el grupo que consiste en especies amortiguadoras de pH, concentración del amortiguador de pH, y concentración de sal necesarias para obtener un amortiguador de pH que tenga un valor de pH deseado y/o una fuerza iónica deseada y capacidad de amortiguación del pH. En un modo de realización, la definición del amortiguador de pH se obtiene en un momento temporal específico. En un modo de realización alternativo, la presente definición del amortiguador de pH se obtiene en un procedimiento continuo en línea. El método de definición del amortiguador de pH puede incluir uno o más de los elementos indicados anteriormente en el contexto de la preparación de una mezcla líquida.

35 Como se ha indicado anteriormente, la mezcla líquida preparada usando el presente método puede ser un amortiguador de pH que es útil en varias aplicaciones tales como aplicaciones de selección con alto rendimiento y en cromatografía. En cromatografía, el líquido preparado según el presente método es ventajosamente el eluyente que consecuentemente comprenderá una fuerza iónica que cambia gradualmente, también denominado gradiente salino. Dicho gradiente puede ser creciente o decreciente.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un programa de ordenador capaz de realizar los cálculos descritos anteriormente.

Según un modo de realización específico, se proporciona un programa de ordenador para determinar las proporciones relativas de los componentes de al menos uno entre cada:

- un amortiguador de pH.
- un ácido o una base,
- un disolvente,

45

y opcionalmente

- una sal,

para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos según el método anterior para determinar las proporciones relativas de los componentes, en el que las proporciones de mezcla de los componentes

determinadas pueden ser visualizadas por un usuario para su evaluación y/o usadas para controlar un dispositivo de mezcla de líquidos.

5 El programa de ordenador según la invención que puede ser presentado en un dispositivo de memoria tal como un disco o un lápiz de memoria; o como parte de un dispositivo de control, es útil para la preparación automatizada de mezclas líquidas, preferiblemente flujos líquidos, que tienen un pH y una fuerza iónica controlados.

10 En un modo de realización de una implementación del método para determinar las proporciones relativas de los componentes para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predeterminados según se ha indicado anteriormente, el parámetro del tamaño iónico a_i para cada especie se almacena en una base de datos, tabla o similar accesible, para que pueda ser usada en los cálculos. Un ejemplo de dicha tabla se muestra en la tabla 2 con referencia al ejemplo 2.

15 En un modo de realización específico, el programa de ordenador puede funcionar en un modo de diseño que significa que el programa calculará la receta (es decir, las cantidades de agente valorante, agua y sal) para obtener una disolución de un pH y fuerza iónica dados (alternativamente, concentración de la sal en lugar de fuerza iónica). En un modo de realización alternativo, el programa de ordenador puede funcionar en un modo de cálculo de pH, que significa que el programa calculará el pH y la fuerza iónica obtenidos cuando se mezclan determinadas cantidades de componentes del amortiguador de pH.

En un tercer aspecto, mostrado esquemáticamente en la figura 3, se proporciona un dispositivo 190 para la preparación de amortiguadores de pH que comprende:

20 • un dispositivo 200 de mezcla de líquidos que comprende un puerto de salida 210 del líquido mezclado y varios puertos de entrada 220 conectados con las fuentes 230 de los componentes de al menos uno entre cada:

- un amortiguador de pH,
- un ácido o una base,
- un disolvente,

y opcionalmente

25 ○ una sal

30 • una unidad 240 de control de la mezcla dispuesta para controlar las proporciones relativas de los componentes suministrados a través de los puertos de entrada del dispositivo de mezcla que proporciona una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos al puerto de salida, estando la unidad de control de la mezcla dispuesta para determinar las proporciones relativas de los componentes usando la ecuación de Debye-Hückel, en la que el parámetro del tamaño iónico a en la ecuación de Debye-Hückel se determina como la media ponderada del tamaño iónico de todas las especies que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, donde la fuerza iónica de cada especie se usa como parámetro de ponderación.

35 Según un modo de realización, el dispositivo de preparación del amortiguador de pH comprende una o más válvulas 250, bombas 260 o dispositivos similares que pueden controlarse para suministrar al dispositivo de mezcla las proporciones relativas de los componentes asociados. En el modo de realización descrito se muestran esquemáticamente una válvula 250 y una bomba 260 como integradas en el dispositivo de mezcla de líquidos, pero alternativamente se pueden proporcionar como componentes separados.

40 Según un modo de realización, la preparación del amortiguador de pH se integra como una parte de un sistema de cromatografía líquida. Por lo tanto, el dispositivo de preparación del amortiguador de pH se usa ventajosamente en cromatografía como se ha indicado detalladamente en el documento US 6.221.250 señalado anteriormente.

45 En un modo de realización específico, el dispositivo de preparación del amortiguador de pH comprende una válvula de entrada multipuerto, tal como una válvula de 4 entradas de conmutación rápida; medios para la valoración del amortiguador de pH; una pantalla de visualización de la relación de mezcla real del amortiguador de pH; medios para mantener el pH independiente de la fuerza iónica y la temperatura; medios para el control automático de la capacidad del amortiguador de pH. La válvula cuaternaria abrirá un puerto durante un tiempo corto y a continuación abre el siguiente puerto y así sucesivamente. Los segmentos de volumen de las diferentes disoluciones madre se mezclarán completamente en el mezclador para formar el amortiguador de pH elegido. El tiempo de apertura se controla mediante un algoritmo para obtener el pH correcto.

50 La valoración del amortiguador de pH se puede hacer bien con el correspondiente ácido/base o bien con un ácido/base fuerte. Las relaciones de mezcla reales del amortiguador de pH pueden visualizarse y/o controlarse mediante un software, tal como la versión modificada de UNICORN (GE Healthcare). Se obtiene un pH estable de las disoluciones preparadas independientemente de la fuerza iónica y la temperatura. Puede haber un control

automático de la capacidad del amortiguador de pH. En el método es posible ajustar el pH y la concentración del amortiguador de pH.

En todavía otro aspecto, se proporciona un manipulador de líquidos robótico que proporciona un flujo de líquido en el que el pH se mantiene esencialmente constante aunque la fuerza iónica cambie. Un manipulador de líquidos robótico según este modo de realización se puede usar, por ejemplo, en el control de la composición del amortiguador de pH en procedimientos de selección de alto rendimiento; en control de calidad; en cuantificación y normalización de ADN; en PCR; etc. En un modo de realización ventajoso, el presente manipulador robótico constituye una parte de un sistema que permite la preparación totalmente automatizada en un formato de 96 pocillos para el desarrollo de un procedimiento de alto rendimiento. En dicho sistema, el programa de ordenador según la invención proporciona un diseño de salida en un formato que se importa fácilmente en el dispositivo robótico.

Finalmente, la invención también se refiere al uso del método para determinar las proporciones relativas de los componentes señalado anteriormente en un dispositivo de autodispensación para la preparación inteligente del amortiguador de pH, tal como en microplacas u otros formatos, y posiblemente otro material de laboratorio. Una ventaja del método según la invención es la precisión de las predicciones del pH para valores de la fuerza iónica tan altos como 1M y mayores. En un modo de realización, el método es especial para sistemas amortiguadores de pH con iones amortiguadores de pH cargados positivamente. Un dispositivo independiente de preparación de amortiguadores de pH según la invención se puede usar en cualquier laboratorio implicado en investigaciones y desarrollo en química, biología, bioquímica, medicina para aplicaciones tales como el desarrollo de procedimientos de alto rendimiento, selección de condiciones de cristalización, selección de condiciones de enlace, etc. y, en general, cualquier aplicación que necesite la preparación de amortiguadores de pH en paralelo a una escala de L - mL. Dependiendo del software incluido, el dispositivo se puede adaptar fácilmente también para otras aplicaciones que necesiten las mismas operaciones unitarias.

Descripción detallada de los dibujos

La figura 4 es una tabla que muestra el error cuadrático medio de las diferencias (RMSD por sus iniciales en inglés: *root mean squared differences*) entre los valores de pH calculados y los experimentales para tres métodos diferentes. Los métodos se diferencian en el tipo de corrección del valor de pKa para la fuerza iónica: la corrección según la ecuación 1.10 de Guggenheim y Schilndler y la corrección según las ecuaciones 1.9 y 1.11 de este método. Los números entre paréntesis dan el número de diferencias mayores de 0,1 unidades de pH. Los valores de RMSD también se dan en unidades de pH. N_{OK} es el número de experimentos en los que la capacidad del amortiguador de pH es igual o mayor a 0,01 moles de ácido/base fuerte por unidad de pH ($\log > -2$). Los valores de la capa en gris no tienen efecto.

La figura 2 describe un modo de realización específico de la preparación del amortiguador de pH según la invención realizado mediante una válvula de cuatro entradas de conmutación rápida. La valoración del amortiguador de pH se puede realizar bien con el ácido/base correspondiente o con un ácido/base fuerte. Las relaciones de mezcla reales del amortiguador son mostrados por el software, en este caso una versión específicamente modificada del UNICORN (GE Healthcare). Se obtiene un pH estable de las disoluciones preparadas, independiente de la fuerza iónica y de la temperatura. La válvula cuaternaria abrirá un puerto durante un tiempo corto y a continuación abre el siguiente puerto y así sucesivamente. Los segmentos de volumen de las diferentes disoluciones madre se mezclarán completamente en el mezclador para formar el amortiguador de pH elegido. El tiempo de apertura se controla mediante un algoritmo para obtener el pH correcto. Las proporciones reales usadas durante un experimento se representan como porcentaje en las curvas de concentración Q1 a Q4 en el *Control del Sistema*, así como en

Evaluación en UNICORN

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se dan únicamente con propósito de ilustración y no deberían ser considerados como limitantes de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1.- Desarrollo del software

Materiales/Unidades investigadas

Toda la programación se realizó en ordenadores personales con un procesador Pentium 4 y sistema operativo Windows XP.

Métodos

En la primera parte del trabajo de desarrollo se usó la versión 5 del C++ Builder de Borland y la última versión 4.2 del compilador Visual C++.

Criterios de aceptación

Al inicio del experimento se decidió que el método debería dar el pH correcto con una exactitud de 0,2 unidades de pH. Como las especificaciones de la bomba y del sistema de válvulas es 0,5% y la concentración de una disolución madre normal sería 0,2M, dado un mínimo de capacidad del amortiguador de pH¹ de 0,01 (véase más adelante), aproximadamente 0,1 correspondería a la exactitud de la dosificación y 0,1 a la exactitud del algoritmo. La capacidad del amortiguador de pH mínima se tomó como la capacidad de amortiguador de pH definida como $[dn/dpH]$, donde dn es el cambio (pequeño) en la cantidad (en moles) de ácido/base fuerte que produce un cambio (pequeño) dpH en el pH. La exactitud del algoritmo se estimó por comparación de las medidas experimentales del pH de las disoluciones tampón. Los errores de pipeteo se estimaron al principio de la fase experimental y se consideraron muy pequeños en comparación con otros errores relacionados con la determinación experimental del pH (datos no mostrados). Por lo tanto, el error experimental se estimó midiendo el pH de cada muestra de disolución tampón usando dos pH-metros diferentes con diferentes tipos de electrodos, produciendo dos valores de pH diferentes, denominados aquí pHExp y pHExp1. Para cada serie de experimentos (serie de datos) se calculó el error cuadrático medio (r.m.s.e.) según la siguiente fórmula:

$$\text{r.m.s.e.} = \text{Raíz cuadrada} ((pHExp - pHExp1)^2 / N_{ok}) \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde la suma se toma para aquellos valores de pH con una capacidad correspondiente de amortiguador de pH mayor que 0,01 y donde N_{ok} es el número de dichos casos (solo se toman en consideración los resultados en los que el logaritmo (en base 10) de la capacidad () del amortiguador de pH es mayor que -2). Cuando se encontró que el r.m.s.e. era mayor que 0,05 unidades de pH, entonces al menos una mitad de la serie de datos (los correspondientes a un pH-metro) se rechazó, en cuyo caso la serie de datos que era más consistente con los valores establecidos para las constantes del amortiguador de pH (pK_a y dependencia de pK_a con la temperatura) encontrados en la bibliografía, se mantuvo y se usó para la optimización de los parámetros de compensación de la fuerza iónica. Incluso la mitad consistente de la serie de datos podría rechazarse en caso de que hubiera otra serie de datos consistente con los valores establecidos de las constantes del amortiguador de pH en la bibliografía. El valor de 0,01 ($\log -2,0$) como límite inferior para la capacidad del amortiguador de pH se obtuvo experimentalmente al observarse que por debajo de este límite, el r.m.s.e. aumentaba por encima de 0,05 para la mayoría de los sistemas amortiguadores de pH (datos no mostrados). A modo de comparación, el valor correspondiente usado en el documento US 6.221.250 (Stafström) indicado anteriormente fue de 0,0063 ($\log -2,2$). En la bibliografía no se encontró ninguna referencia a un "valor normalmente aceptado".

Resultados

El programa "Buffalo" se escribió en Visual C++ y se puede ejecutar en Windows para el cálculo exacto del pH del amortiguador de pH para fuerzas iónicas tan elevadas como 1M.

Estructura del programa

El programa "Buffalo" se puede ejecutar en dos modos: modo *Diseño* y modo *Calc_pH*. El modo *Diseño* se usa para diseñar experimentos y para el cálculo de las curvas teóricas de valoración que se pueden usar antes del diseño de los experimentos para determinar el intervalo de pH apropiado. El modo *Calc_pH* se usa para la optimización de parámetros dada una serie de medidas de pH emparejadas. Las entradas del programa en ambos modos son el volumen de amortiguador de pH (vol_amort), la temperatura (TT), la concentración del amortiguador de pH ($conc_amort$), la concentración de sal ($conc_sal$), la sustancia amortiguadora de pH ($amort_selec$) y el agente valorante ($valorante_selec$). Además de esto, en el modo *Diseño*, es necesario incluir el pH deseado (pH) como entrada, mientras que en el modo *Calc_pH* son necesarios el pH experimental ($pHExp$), el correspondiente replicado ($pHExp1$) y el número de moles de agente valorante ($moles_valorante_exp$) usados en los experimentos. Además, en ambos modos es posible considerar un mezcla de un número ($n_amort = 1, 2 \text{ ó } 3$) de amortiguadores de pH, $amort_selec (1)$, $amort_selec (2)$ y $amort_selec (3)$, en lugar de un amortiguador de pH que consiste en una única sustancia amortiguadora de pH (el programa ha sido implementado para un número máximo de tres sustancias amortiguadoras de pH para se podría modificar fácilmente para incluir más). Siendo este el caso, se deben proporcionar las correspondientes concentraciones de amortiguador de pH, $conc_amort (1)$, $conc_amort (2)$ y $conc_amort (3)$.

Amortiguadores de pH monopróticos vs. polipróticos

El pH de un amortiguador de pH monoprótico puede predecirse con la ecuación de Henderson-Hasselbach (Ec. 1.3 o Ec. 1.7).

La concentración de la especie básica o ácida se determina mediante la concentración del amortiguador de pH y la concentración del agente valorante. Dadas estas concentraciones y la pK_a del amortiguador de pH monoprótico se puede obtener el pH (corresponde al modo *Calc_pH*), alternativamente dado el pH deseado y la concentración del amortiguador de pH se puede obtener la cantidad de moles de agente valorante (corresponde al modo *Diseño*). Una complicación surge cuando se usan varios amortiguadores de pH polipróticos, es decir sus moléculas amortiguadoras de pH pueden aceptar y dar más de un protón, correspondiendo a más de un valor de pK_a . El número de especies en dicho sistema amortiguador de pH es siempre más que el número de valores de pK_a

(n_de_pKa). Para simplificar la implementación del programa, se implementó un modelo general para un amortiguador de pH triprotico (una extensión a incluso más valores de pKa debería ser directa aunque no trivial y debe ser implementada). Si se definen cuatro estados o especies de protonación (s_1 , s_2 , s_3 y s_4), sin embargo, el parámetro n_de_pKa (que puede ser 1, 2 ó 3) limita los cálculos de forma que para un amortiguador de pH monoprótico, por ejemplo, s_1 corresponde a la especie ácida, s_2 a la especie básica y la concentración de s_3 y s_4 se ajustan a 0.

Diferencias y similitudes entre los dos modelos

Los dos modelos funcionan usando esencialmente el mismo método principalmente para resolver la cantidad de moles de agente valorante necesaria para obtener un pH dado para una concentración de amortiguador de pH dada. Antes de hacer esto es necesario resolver la cantidad de moles de amortiguador de pH en cada uno de los posibles números o estados (o especies) de protonación. La diferencia entre los modos es que en el modo *Diseño*, el procedimiento se hace solo dos veces ($kmax = 2$): una vez para el pH deseado y la otra para el pH + $etapa_pH$ (véase más adelante) con el fin de estimar numéricamente la capacidad del amortiguador de pH. La cantidad de moles de agente valorante obtenida para el pH deseado es entonces la salida del modo *Diseño*. Por otra parte, en el modo *Calc_pH*, el procedimiento se repite a lo largo de la escala de pH completa (1-13, $kmax = 2600$), el valor de pH que permite obtener la cantidad de moles de agente valorante que concuerda mejor con la cantidad de moles de agente valorante usada en el experimento es el valor del pH calculado. El parámetro $etapa_pH$ (0,005) limita la exactitud de los cálculos del pH y de la capacidad del amortiguador de pH. Se encontró ventajoso usar el mismo algoritmo en ambos modos ya que de esta forma se minimizaban los errores y discrepancias innecesarias.

Las ecuaciones de equilibrio

El cálculo de la cantidad de moles en cada una de las especies de protonación es equivalente a resolver las ecuaciones de equilibrio de cada una de las especies con las especies contiguas con un protón más y/o menos y con la concentración de átomos de hidrógeno (el pH). En otras palabras, las tres ecuaciones (correspondientes a tres valores de pKa) se obtienen directamente a partir de la ecuación 1.7.

$$xx[1] = 10^{(pH - pKaprime[i])} \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde cada i corresponde a cada valor de pKa(i) ($i = 1, 2, 3$) y $xx[i]$ son las relaciones entre la concentración de la base correspondiente y el ácido correspondiente, es decir $xx[1] = [s_2]/[s_1]$, $xx[2] = [s_3]/[s_2]$, $xx[3] = [s_4]/[s_3]$.

Además de estas tres ecuaciones, otra ecuación surge debido a la conservación de la masa:

$$[s_1] + [s_2] + [s_3] + [s_4] = conc_amort \quad \text{Ec. 3.2}$$

y la conservación de la carga:

$$[H^+] - [OH^-] + carga_espec(s_i) - carga_valorante*[valorante] - carga_espec(espec_inic)*[espec_inic] = 0 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Por especie inicial se entiende la especie de la sustancia amortiguadora de pH antes de la mezcla, es decir el estado de protonación del amortiguador de pH en el recipiente o en la disolución madre. Este estado de protonación se determina por la cantidad de contraiones por molécula del amortiguador de pH porque el objeto macroscópico, recipiente o disolución madre, debe ser eléctricamente neutro. El signo menos delante de $[OH^-]$ es debido al signo menos de la carga de los iones OH, mientras que el signo menos delante de los dos últimos términos es debido a la carga de los contraiones del agente valorante y de las especies iniciales respectivamente.

Finalmente, el equilibrio de disociación del agua:

$$[H^+][OH^-] = 10^{-14} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Las ecuaciones 3.1-3.4 implican que hay seis ecuaciones con seis incógnitas (las cuatro $[s_i]$, $[OH^-]$ y $[H^+]$) para el caso de 3 valores de pKa. De la forma en que se ha implementado la solución, se supone que el pH es conocido y, por lo tanto, $[H^+]$ y mediante la ecuación 3.4 incluso $[OH^-]$ y en cambio es la concentración de agente valorante la que debe ser resuelta. Las cinco ecuaciones restantes corresponden a las cinco incógnitas (las cuatro $[s_i]$ y $[agente\ valorante]$).

Cálculo de la cantidad de moles de agente valorante

Una vez que las concentraciones de cada especie $[s_i]$ en el equilibrio son conocidas, se puede calcular la concentración de agente valorante usando la ecuación 3.3. Hay dos casos que hay que considerar dependiendo del tipo de agente valorante, ácido/base fuerte y ácido/base correspondiente. Sin embargo, independientemente del caso de que se trate, el cálculo de la concentración de agente valorante en la ecuación 3.3 da:

$$[agente\ valorante] = (-[H^+] + [OH^-] - carga_espec(s_i)*[s_i] +$$

$$\text{carga_espec} (\text{espec_inic}) * [\text{espec_inic}] / \text{etapa_protón} \quad \text{Ec. 3.10}$$

donde:

$$\text{etapa_protón} = - \text{carga_valorante} (\text{ácido/base fuerte}) \quad \text{Ec. 3.11a}$$

o

$$\begin{aligned} 5 \quad \text{etapa_protón} &= \text{carga_espec} (\text{espec_inic}) \\ &- \text{carga_valorante} (\text{ácido/base correspondiente}) \quad \text{Ec. 3.11b} \end{aligned}$$

En otras palabras, el parámetro *etapa_protón* es -1 para el HCl y +1 para el NaOH, en el caso de un agente valorante ácido o base débil, el valor de *etapa_protón* para el agente valorante depende de la especie inicial del amortiguador de pH según la ecuación 3.11b o la siguiente ecuación equivalente:

$$10 \quad \text{etapa_protón} = \text{espec_valorante} - \text{espec_inic} \quad \text{Ec. 3.12}$$

Este procedimiento se repite tantas veces como sean los componentes del amortiguador de pH y el valor de *mol_valorante* final es la suma de la cantidad de moles de agente valorante para cada componente (véase a continuación).

15 En la mayoría de los casos (pH entre aproximadamente 3,5 y 10,5), la contribución de $[H^+]$ (para valores de pH bajos) o de $[OH^-]$ (para valores de pH altos) al balance de carga es despreciable y se puede considerar cero en la ecuación 3.10.

Elección del agente valorante

20 El agente valorante puede ser fuerte (HCl o NaOH). La única diferencia entre estos dos en el signo del número de protones con los que contribuyen. Además, el agente valorante puede ser débil en cuyo caso se debe proporcionar el estado de protonación del agente valorante (en el recipiente o en la disolución madre). Alternativamente, se puede dar el número de protones ácidos. La relación entre los dos es:

$$\text{espec_valorante} = n_de_pKa + 1 - n_de_protones_ácidos \quad \text{Ec. 3.13}$$

Bucle de iteración de la fuerza iónica

25 Como la fuerza iónica se calcula a partir de las concentraciones de todos los iones, es necesario conocer estas concentraciones antes de que se calcule la fuerza iónica de forma exacta. Sin embargo, estas concentraciones son ellas mismas una variable de salida de la solución de las ecuaciones de equilibrio que requieren $pK_{aprima}[i]$, que a su vez se calculan a partir de pKa (denominados valores termodinámicos de pKa a 25°C y fuerza iónica 0), la temperatura y la fuerza iónica. Por lo tanto, fue necesario implementar un procedimiento iterativo. En la primera etapa de dicho procedimiento, la fuerza iónica se ajusta simplemente igual a la concentración de la sal. En una segunda etapa de iteración, se usa la fuerza iónica obtenida en el primer ciclo, etc. Se encontró que este procedimiento converge rápidamente. Por ejemplo, se encontró que cinco interacciones fueron más que suficientes para obtener la exactitud deseada (datos no mostrados). El número de iteraciones se ajustó por lo tanto a 5 en todos los casos.

Cargas separadas en el cálculo de la fuerza iónica

35 Se encontró que el cálculo de la fuerza iónica para iones con más de una carga y en los que las cargas estaban bien separadas (como en el caso de los iones citrato con 4 y 5 átomos de carbono entre las cargas) se obtuvo una exactitud significativamente mejor si se consideraban las cargas como separadas en lugar de una carga puntual única. Esto llevó a la introducción de una variable de señalización *cargas_separadas* a la que se le dio el valor verdadero para el citrato y falso para todos los otros amortiguadores de pH

40 Bucle sobre el número de componentes del amortiguador de pH, parámetros del amortiguador de pH

Para cada especie del amortiguador de pH se necesitan los siguientes parámetros. La masa de la sustancia amortiguadora de pH (*M_amort*), el número de valores de pKa (*n_de_pKa*), los valores de pKa ($pKa[i]$), los valores de la dependencia con la temperatura de cada valor de pKa ($dpKadT[i]$), la carga de la forma más básica (*cb*) y el estado de protonación del amortiguador de pH (*espec_inic*) en el recipiente o en la disolución madre.

45 Alternativamente, se puede dar el número de protones ácidos. La relación entre los dos es:

$$\text{espec_inic} = n_de_pKa + 1 - n_de_protones_ácidos \quad \text{Ec. 3.14}$$

Además de esto, se necesitan los parámetros de corrección de la fuerza iónica (*const*, *cargapos* y *carganeg*).

5 El número total de moles de agente valorante (*mol_valorante*) es igual a la suma del número de moles de agente valorante necesario para cada componente del amortiguador de pH con el fin de establecer el equilibrio al pH deseado y este bucle se usa para calcular esta suma. Otras sumas que se calculan mediante el bucle son el número de contraiones de cada uno de los componentes del amortiguador de pH y también la contribución de cada componente a la fuerza iónica en el equilibrio.

Bucle sobre los diferentes estados de protonación, corrección del pKa con la temperatura

Para cada estado de protonación se calculan cada uno de los siguientes parámetros: la carga (*carga_espec[j]*), el cuadrado de la carga (*qsq[j]*), la capa (*capa[j]*), la constante (*const[j]*) y el valor de pKa corregido con la temperatura (*pKaT[j]*). Este último se calcula siguiendo la fórmula:

$$10 \quad \text{pKaT} = \text{pKa}[i] + (TT - 25) * \text{dpKadT}[i] \quad \text{Ec. 3.15}$$

donde *TT* la temperatura en grados Celsius. También se calcula la parte *aaa[i]* del parámetro del tamaño iónico *a* que depende solo de la masa (se le puede denominar radio no hidratado *aaa[j]*):

$$\text{aaa}[i] = \text{const}[i] * (\text{Mamort})^{1/3} \quad \text{Ec. 3.16}$$

Bucle sobre los valores de pKa, cálculo de pKa'

15 Los coeficientes de actividad (o más bien sus logaritmos) de las especies ácidas o básicas que corresponden a cada valor de pKa se calculan según la siguiente fórmula:

$$\text{logfiBase} = -A * (\text{qsq}[i+1]) * \text{raíz} / (1 + 0,33 * (\text{aaa}[i+1] + \text{capa}[i+1]) * \text{raíz}) \quad \text{Ec. 3.17a}$$

$$\text{logfiÁcido} = -A * (\text{qsq}[i]) * \text{raíz} / (1 + 0,33 * (\text{aaa}[i] + \text{capa}[i]) * \text{raíz}) \quad \text{Ec. 3.17b}$$

20 Donde *raíz* es la raíz cuadrada de la fuerza iónica. El parámetro *a* de la ecuación I corresponde a la cantidad *aaa[j]* + *capa[j]*.

A partir de estos coeficientes de actividad los valores de *pKaprima* se calculan como:

$$\text{pKaprima}[i] = \text{pKaT} + \text{logfiBase} - \text{logfiÁcido} \quad \text{ec. 3.18}$$

Influencia de [H⁺] y [OH⁻] en el equilibrio de cargas

25 A valores muy bajos y muy altos de pH, la contribución de [H⁺] (para los valores bajos) y [OH⁻] (para los valores altos de pH) en el equilibrio de cargas deja de ser despreciable. Por lo tanto, en la versión 5.07 y posteriores se introdujo la posibilidad de incluir una corrección en el número de moles del agente valorante (*mol_valorante*) debida a [H⁺] y [OH⁻], especialmente cuando se observaron consistentemente discrepancias para la disolución tampón de fosfato en el intervalo de pH bajo (por debajo de 2,5). Esto se implementó de forma que la cantidad de moles del agente valorante se corrigió al final del bucle sobre el número de componentes del amortiguador de pH añadiendo dos términos:

$$-10^{-\{\text{pH}\}} / (\text{etapa_protón} * \text{vol_amort})$$

para neutralizar eléctricamente [H⁺] y

$$+10^{-\{\text{pH}-14\}} / (\text{etapa_protón} * \text{vol_amort})$$

para neutralizar eléctricamente [OH⁻].

35 Comparación de los valores calculados con los valores experimentales

En la presente memoria se presentan un total de 31 sistemas amortiguadores de pH (combinaciones de valorante y valorado). Se han realizado aproximadamente 2100 experimentos de los que se han rechazado 817 debido a los criterios de rechazo (sección 2.3). Se ha realizado la valoración con ácido/base fuerte así como con el ácido/base correspondiente, así como dos mezclas de amortiguadores de pH. La lista de sistemas de amortiguadores de pH que no son mezclas se recogen en la figura 4, tabla 1. Las estadísticas de los errores de los resultados de la aplicación de este método (programa Buffalo versión 6.00) en comparación con la interpretación de la fórmula de Debye-Hückel según Guggenheim y Schindler (ec 1.10) y en comparación también con las diferencias experimentales se presentan igualmente en la tabla. En todos los casos mostrados en la tabla se ha incluido la corrección debida a la contribución de [H⁺] y [OH⁻] (sección 3.13). Solo en los casos en los que se considera un pH bajo, esta corrección produce una mejora significativa de la exactitud. En los restantes casos, la diferencia es despreciable.

Solo se presentan los resultados para los que el logaritmo (base 10) de la capacidad () del amortiguador de pH es mayor que -2 a partir de los datos rechazados. Como estimación del error experimental también se incluye el error cuadrático medio (r.m.s.e.) (ec. 2.1) a partir de dos medidas de la misma mezcla amortiguadora de pH según dos diferentes pH-metros.

5 Mezclas amortiguadoras de pH

Se consideraron dos mezclas. Una mezcla para la cromatografía de intercambio catiónico (pH 2,5-7,2 CIEX) y una mezcla para la cromatografía de intercambio aniónico (pH 5,3-9,5 ALEX).

La mezcla ALEX se hizo mezclando Tris 0,1M y Bis-Tris 0,1M. El intervalo de pH ensayado fue de 5,3-9,5. La primera serie de datos consistió en medidas sencillas de pH. El r.m.s.e. para una segunda serie de datos de ALEX fue de 0,80 por lo que una de sus series fue rechazada.

El resultado para la primera serie de datos y la serie no rechazable de la segunda fue de 1 de 27 posibles valores fuera de los límites de 0,1 (r.m.s.d 0,06) para este método en comparación con 10 de 27 violaciones posibles para la corrección de la fuerza iónica según Guggenheim y Schindler (r.m.s.d. 0,10).

La mezcla CIEX se hizo mezclando Na_2HPO_4 0,037M, Na-formato 0,0125M y Na-acetato 0,025M. El intervalo de pH analizado fue de 2,5-7,2. El valor experimental de r.m.s.e. fue de 0,02 con 0 de 104 posibles (N_{rOK}) diferencias mayor que 0,1. El resultado de los cálculos de pH fue de 4 de los 104 valores posibles fuera de los límites de 0,1 para este método (r.m.s.d. 0,05) en comparación con 36 de 102 violaciones posibles para la corrección de la fuerza iónica según Guggenheim y Schindler (0,1).

Ejemplo 2

20 Materiales/Unidades investigadas

Como en el ejemplo 1.

Métodos

Se usó la versión 4.2 del compilador de Visual C++.

Resultados

25 El programa "Buffalo Plus" se escribió en Visual C++ y se puede ejecutar en Windows para el cálculo exacto del pH de la disolución tampón para fuerzas iónicas y concentraciones de amortiguador de pH tan elevadas como 1M para los siguientes sistemas tampón: fosfato, citrato, acetato y Tris.

Estructura del programa

30 Como en el ejemplo 1 con una adición: el programa también se puede ejecutar en un tercer modo "Optimización de parámetros" que se usa para optimizar simultáneamente los parámetros (radios de las diferentes especies cargadas de cada sistema amortiguador de pH) usando el método de Newton Raphson.

Amortiguadores de pH monopróticos vs. polipróticos

Como en el ejemplo 1.

Diferencias y similitudes entre los modos

35 Como en el ejemplo 1, pero en los modos *Calc_pH* y *Optimización de parámetros*, $k_{\text{max}} = 3$.

Elección del agente valorante

Como en el ejemplo 1.

Bucle de iteración de la fuerza iónica

Como en el ejemplo 1.

40 Bucle sobre el número de componentes del amortiguador de pH, parámetros del amortiguador de pH

Como en el ejemplo 1.

Bucle sobre los valores de pKa, corrección del pKa con la temperatura y cálculo del pKa'

Los coeficientes de actividad (o más bien sus logaritmos) de las especies ácidas y básicas que corresponden a cada valor de pKa se calculan según las fórmulas siguientes:

$$\log fi_{Base} = -A * (qsq [i+1]) * raíz I / (1 + 0,33 * rad_ion * raíz I)$$

$$\log fi_{Ácido} = -A * (qsq [i]) * raíz I / (1 + 0,33 * rad_ion * raíz I)$$

donde $raíz I$ es la raíz cuadrada de la fuerza iónica, $qsq[i]$ y $qsq[i+1]$ son el cuadrado de la carga del ácido y de la base, respectivamente, correspondientes a cada valor de pKa.

$$pKa_T = pKa[i] + (TT - 25) * dpKadT[i]$$

donde TT es la temperatura en grados Celsius y $dpKadT[i]$ es el coeficiente de temperatura para el valor de pKa considerando $pKa[i]$.

$$pKaprime[i] = pKa_T + \log fi_{Base} - \log fi_{Ácido}$$

Ecuaciones de equilibrio

10 Como en el ejemplo 1.

Cálculo del parámetro de tamaño iónico

Este se calcula como se ha descrito, como la media ponderada de la fuerza iónica de los radios de cada especie. La tabla 2 muestra los parámetros del tamaño iónico a_i establecidos para las especies en los sistemas amortiguadores de pH de fosfato, citrato y acetato y los parámetros del tamaño iónico a_i asociados para el NaCl. En la tabla 2, solo se recogen los parámetros de tamaño iónico para las especies cargadas y el "tamaño iónico 2" se refiere a las especies iónicas con la menor carga. Consecuentemente, el "tamaño iónico 1" se referiría a las especies no iónicas, pero como la carga de dichas especies es cero no contribuyen al parámetro de tamaño iónico total a como se ha indicado anteriormente. Como el acetato es un ácido monoprótico solo se lista un único valor de a_i . Como se ha mencionado anteriormente, se ha encontrado que el parámetro de tamaño iónico a_i para al menos algunas sales, por ejemplo NaCl, depende del sistema amortiguador de pH que se ha mostrado en la tabla 2.

Tabla 2

	Tamaño iónico 2	Tamaño iónico 3	Tamaño iónico 4	Tamaño iónico Na	Tamaño iónico Cl
Acetato	18,989	-----	-----	2,42126	0,241586
Citrato	3,13131	7,62849	6,37154	1,00106	3,13131
Fosfato	1,64864	6,25134	7,91443	1,64026	1,09941

Cálculo de la cantidad de moles de agente valorante

Como en el ejemplo 1.

25 **Influencia de $[H^+]$ y $[OH^-]$ sobre el equilibrio de carga**

Como en el ejemplo 1.

Comparación de los valores calculados con los valores experimentales

La figura 5 muestra una gráfica de 155 medidas de pH frente a los valores predichos correspondientes calculados usando Buffalo Plus. Los sistemas amortiguadores de pH investigados incluyen fosfato, citrato y acetato.

30

REIVINDICACIONES

1.- Un método para determinar las proporciones relativas de los componentes de al menos uno entre cada:

- un amortiguador de pH.
- un ácido o una base,

5 - un disolvente,

y opcionalmente

- una sal,

para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos,

10 en el que las proporciones relativas de los componentes se determinan usando la ecuación de Debye-Hückel, en el que el parámetro del tamaño iónico a en la ecuación de Debye-Hückel se determina como la media ponderada del tamaño iónico de todas las especies que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, y en el que la fuerza iónica de cada especie se usa como parámetro de ponderación.

2.- Un método según la reivindicación 1, en el que las proporciones relativas de los componentes se determinan usando un procedimiento iterativo.

15 3.- Un método según la reivindicación 2, en el que el procedimiento iterativo comprende:

- (a) determinar las proporciones relativas de los componentes en la que la fuerza iónica predefinida de la mezcla líquida se refiere a las especies según una distribución predefinida entre las especies;
- (b) basándose en las proporciones relativas de los componentes determinadas en la etapa precedente, calcular la fuerza iónica de cada especie en la mezcla;
- 20 (c) determinar una nueva serie de proporciones relativas de los componentes, teniendo en cuenta la fuerza iónica calculada en (b), y
- (d) repetir las etapas (b) a (c) hasta que se obtiene el criterio de convergencia predeterminado.

4.- Un método según la reivindicación 3, en el que, en la etapa (a), la fuerza iónica predefinida de la mezcla líquida se refiere a las especies salinas.

25 5.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el parámetro de tamaño iónico a de la ecuación de Debye-Hückel se determina como:

$$a = \frac{\sum I_i a_i}{I}$$

en la que I_i es la fuerza iónica y a_i es el parámetro de tamaño iónico de la especie i , e I es la fuerza iónica total.

30 6.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el parámetro de tamaño iónico a en la ecuación de Debye-Hückel se aproxima como:

$$a = 0,5 * (\text{masa})^{1/3} + \text{capa}$$

en la que "capa" se fija opcionalmente a un valor para una especie cargada positivamente y se fija a un valor diferente para una especie cargada negativamente, y opcionalmente se fija a un valor en el intervalo de 3,8-4,2, tal como 4,0, para las especies iónicas cargadas positivamente; y "capa" se fija a un valor en el intervalo de 0-0,2, tal como 0, para las especies iónicas cargadas negativamente.

35

7.- Un método para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos, que comprende:

- proporcionar disoluciones madre de los componentes de al menos uno entre cada:
 - un amortiguador de pH,
 - un ácido o una base,
 - 40 ○ un disolvente,

y opcionalmente

- o una sal
 - determinar la proporción relativa de cada disolución madre del componente que se debe mezclar usando el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
 - mezclar las disoluciones madre.
- 5 8.- Un método según la reivindicación 7, en el que la fuerza iónica se cambia gradualmente combinando concomitantemente proporciones variables de las disoluciones madre del componente, y en el que el valor del pH del flujo líquido se mantiene esencialmente constante.
- 9.-Un método según las reivindicaciones 7 u 8, en el que se preparan dos o más disoluciones madre de los componentes, cuyas disoluciones madre de los componentes comprenden diferentes especies amortiguadoras de
- 10 pH.
- 10.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que se proporciona una disolución madre del componente que comprende al menos dos especies amortiguadoras de pH.
- 11.- Un procedimiento de selección de alto rendimiento o un procedimiento de cromatografía líquida, en el que el amortiguador de pH se prepara como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 15 12.- Un programa de ordenador para determinar las proporciones relativas de los componentes de al menos uno entre cada:
- un amortiguador de pH,
 - un ácido o una base,
 - un disolvente,
- 20 y opcionalmente
- una sal,
- para proporcionar una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las proporciones de mezcla de un componente determinados se visualizan por un usuario para su evaluación y/o se usan para controlar un dispositivo de mezcla de líquidos.
- 25 13.- Un dispositivo de preparación de un amortiguador de pH, que comprende:
- un dispositivo de mezcla de líquidos que comprende un puerto de salida del líquido mezclado y varios puertos de entrada conectados con las fuentes de los componentes de al menos uno de:
 - o un amortiguador de pH,
 - o un ácido o una base,
 - o un disolvente,
- 30 y opcionalmente
- o una sal
- 35 - una unidad de control de la mezcla dispuesta para controlar las proporciones relativas de los componentes suministrados a través de los puertos de entrada del dispositivo de mezcla que proporciona una mezcla líquida de pH y fuerza iónica predefinidos al puerto de salida, estando la unidad de control de la mezcla dispuesta para determinar las proporciones relativas de los componentes usando la ecuación de Debye-Hückel, en la que el parámetro del tamaño iónico a en la ecuación de Debye-Hückel se determina como la media ponderada del tamaño iónico de todas las especies que contribuyen a la fuerza iónica de la mezcla líquida, donde la fuerza iónica de cada especie se usa como parámetro de ponderación.
- 40 14.- Un dispositivo de preparación de un amortiguador de pH según la reivindicación 13, que comprende al menos una válvula controlable o una bomba controlable para suministrar las proporciones relativas de al menos uno de los componentes.
- 15.- Un sistema de cromatografía líquida que comprende un dispositivo de preparación de un amortiguador de pH según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14.

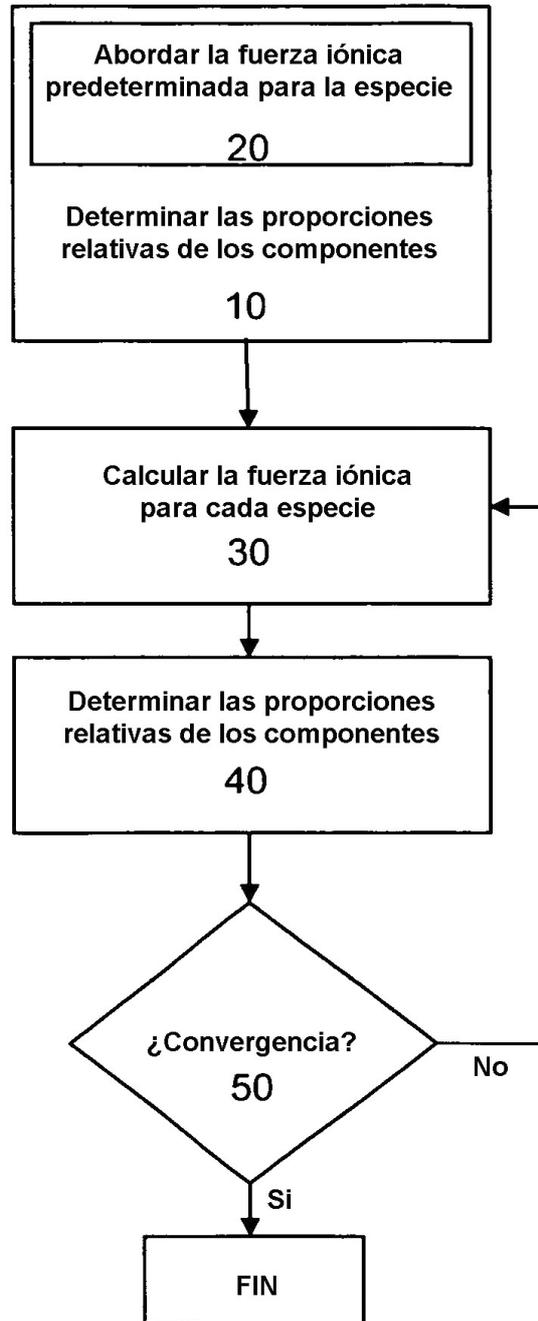


Fig 1

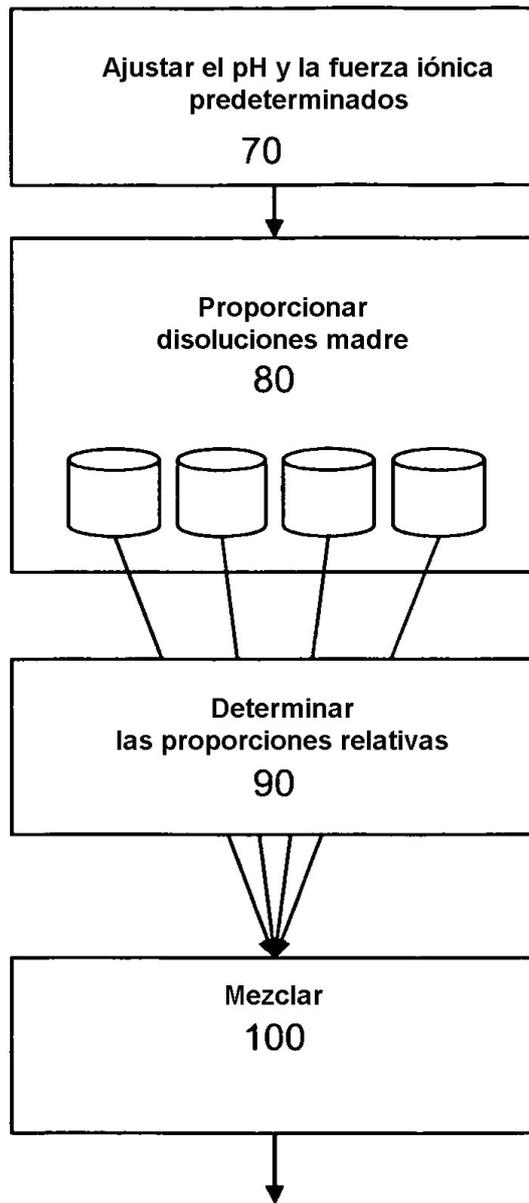


Fig 2

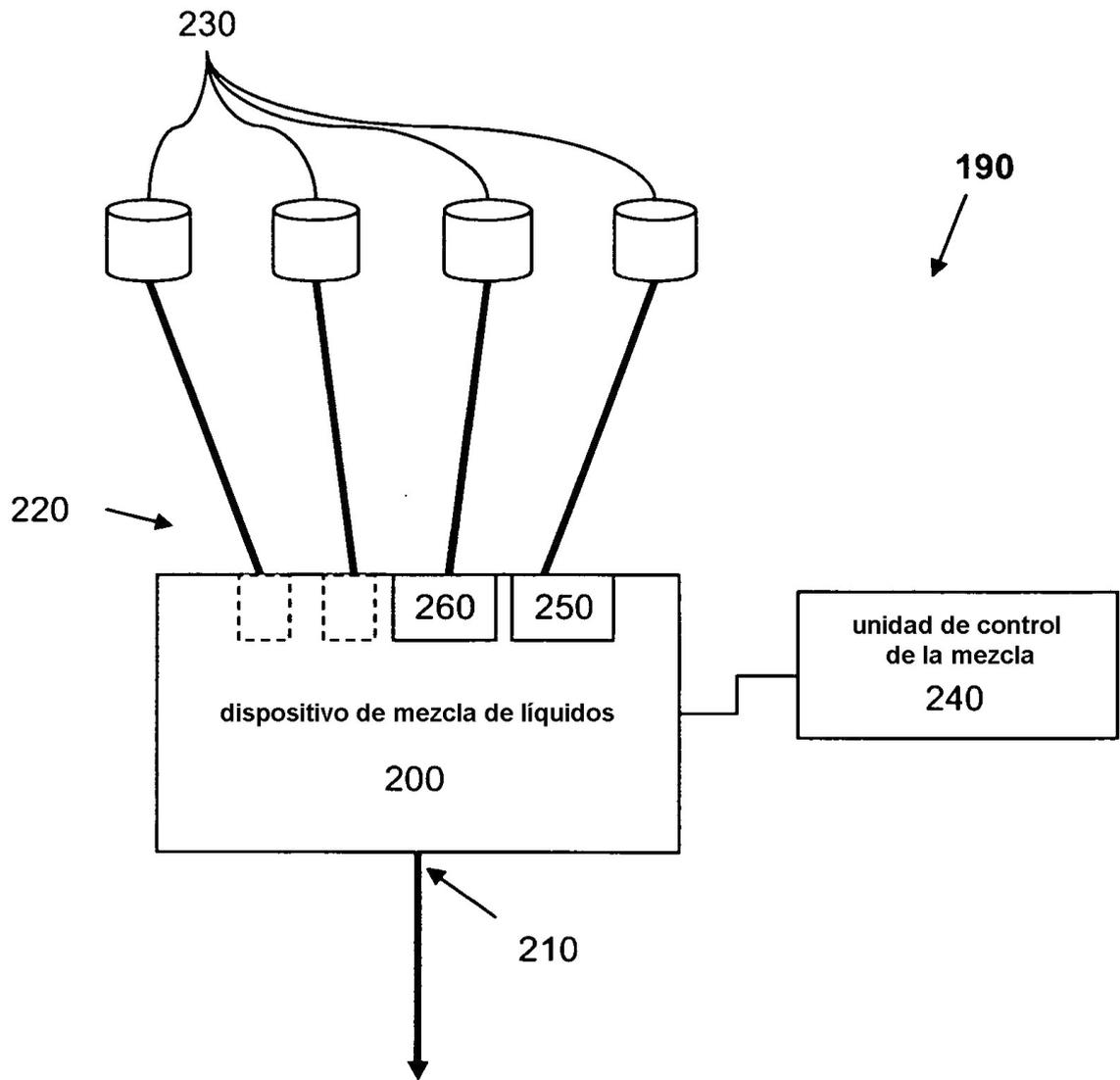


Fig 3

N-Val	Amortiguador de pH	Valorante	pKa	dpKa/dT	const	Capa_pos	Capa_neg	Nok	r.m.s (Exp1-Exp2)	r.m.s Calc-Exp1 (Guggenheim y Schindler)	r.m.s. Calc-Exp1 ("Buffalo")
1-1	1-Metil piperazina	HCl	4,43, 9,01	-0,015, -0,024	0,5	1,1	0,0	38	0,03 (0)	0,06 (4)	0,05 (1)
2-1	Bis Tris	HCl	6,46	-0,017	0,5	4,0	0,0	8	0,04 (0)	0,07 (3)	0,03 (0)
3-1	Piperazina	HCl	5,5, 9,81	-0,015, -0,026	0,5	4,0	0,0	4	0,04 (0)	0,08 (2)	0,03 (0)
4-1	Tris	HCl	8,07	-0,028	0,5	4,0	0,0	8	0,04 (0)	0,13 (6)	0,05 (0)
6-1	Bisfrisoopropano	HCl	6,65, 9,0	-0,026 -0,030	0,5	4,0	0,0	46	No Exp2	0,17 (20)	0,04 (0)
7-1	Na-Acetato	HCl	4,76	-0,0002	0,5	4,0	0,0	6	0,05 (2)	0,08 (0)	0,05 (1)
7-3	Na-Acetato	Acido acético	4,76	-0,0002	0,5	4,0	0,0	10	0,02 (0)	0,07 (0)	0,04 (0)
8-2	Bicino	NaOH	1,84, 8,33	0 -0,017	0,5	4,0	0,0	20	0,05 (0)	0,06 (3)	0,06 (0)
9-1	Citrato (Na3-Citrato)	HCl	3,13, 4,76, 6,4	-0,0024 -0,0016 -0,0005	0,5	4,0	0,0	114	0,03 (0)	0,05 (10)	0,05 (2)
9-5	Citrato (Na3-Citrato)	Acido cítrico	3,13, 4,76, 6,4	-0,0024 -0,0016 0,0005	0,5	4,0	0,0	10	No Exp2	0,03 (0)	0,03 (9)
10-1	Na-Formato	HCl	3,75	0,0002	0,5	4,0	0,0	48	0,04	0,07 (5)	0,04 (0)
10-4	Na-Formato	Acido fórmico	3,75	0,0002	0,5	4,0	0,0	24	No Exp2	0,05 (1)	0,02 (0)
11-1	NaH ₂ PO ₄	HCl	2,15, 7,21, 12,33	0,00044, -0,0028, -0,026	0,46	4,0	0,0	18	0,01 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)

Figura 4

N-Val	Amortiguador de pH	Valorante	pKa	dpKa/dT	const	Capa_pos	Capa_neg	Nok	r.m.s (Exp1-Exp2)	r.m.s Calc-Exp1 (Guggenheim y Schindler)	r.m.s. Calc-Exp1 ("Buffalo")
11-2	NaH ₂ PO ₄	NaOH		0,00044, -0,0028, -0,026	0,46	4,0	0,0	48	0,02 (0)	0,16 (12)	0,10 (8)
11-13	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	2,15, 7,21, 12,33	0,0044 -0,0028 -0,026	0,46	4,0	0,0	48	0,02 (0)	0,09 (11)	0,05 (1)
11-11	NaH ₂ PO ₄	H ₃ PO ₄	2,15, 7,21, 12,33	0,0044 -0,0028 -0,026	0,46	4,0	0,0	9	No Exp2	0,06 (0)	0,14 (4)
12-1	Na ₂ HPO ₄	HCl	2,15, 7,21, 12,33	0,0044 -0,0028 -0,026	0,46	4,0	0,0	48	0,02 (0)	0,010 (13)	0,05 (1)
12-12	Na ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄	2,15, 7,21, 12,33	0,0044 -0,0028 -0,026	0,46	4,0	0,0	7	0,03 (6)	0,07 (1)	0,03 (3)
14-2	Hepes	NaOH	3,0, 7,56	0 -0,014	0,5	4,0	20,0	22	0,03 (2)	0,04 (0)	0,04 (0)
15-2	Mes	NaOH	6,21	-0,008	0,5	4,0	13,0	70	No Exp2	0,15 (38)	0,06 (6)
16-1	Na ₂ CO ₃	HCl	6,35, 10,49	-0,0055, -0,009	0,5	4,0	0,0	50	0,05 (0)	0,10 (17)	0,06 (4)
20-1	Glicina	HCl	2,35, 9,78	-0,002, -0,025	0,5	500	4,2	25	No Exp2	0,16 (17)	0,04 (0)
20-2	Glicina	NaOH	9,5	-0,002, -0,025	0,5	500	4,2	25	No Exp2	0,06 (3)	0,03 (0)
21-1	Etanolamina	HCl	9,01	-0,032	0,5	0,0	0,0	24	0,04 (2)	0,07 (5)	0,06 (3)
22-1	Dietanolamina	HCl	7,77	-0,025	0,5	0,8	0,0	51	0,04 (3)	0,06 (3)	0,06 (2)
23-1	Trietanolamina	HCl	5,5, 9,81	-0,02	0,5	0,0	0,0	58	0,04 (0)	0,07 (7)	0,06 (5)
27-2	Piperazina-2HCl	NaOH	4,20 5,75	-0,015, -0,26	0,5	4,0	0,0	4	0,05 (0)	0,17 (2)	0,03 (0)
32-2	Acido succínico	NaOH	7,19	-0,0018, 0	0,5	4,0	0,8	72	0,04 (0)	0,07 (10)	0,06 (9)
38-2	MOPS	NaOH		-0,011	0,5	4,0	13,0	72	0,06 (2)	0,15 (39)	0,07 (9)

Figura 4 (cont)

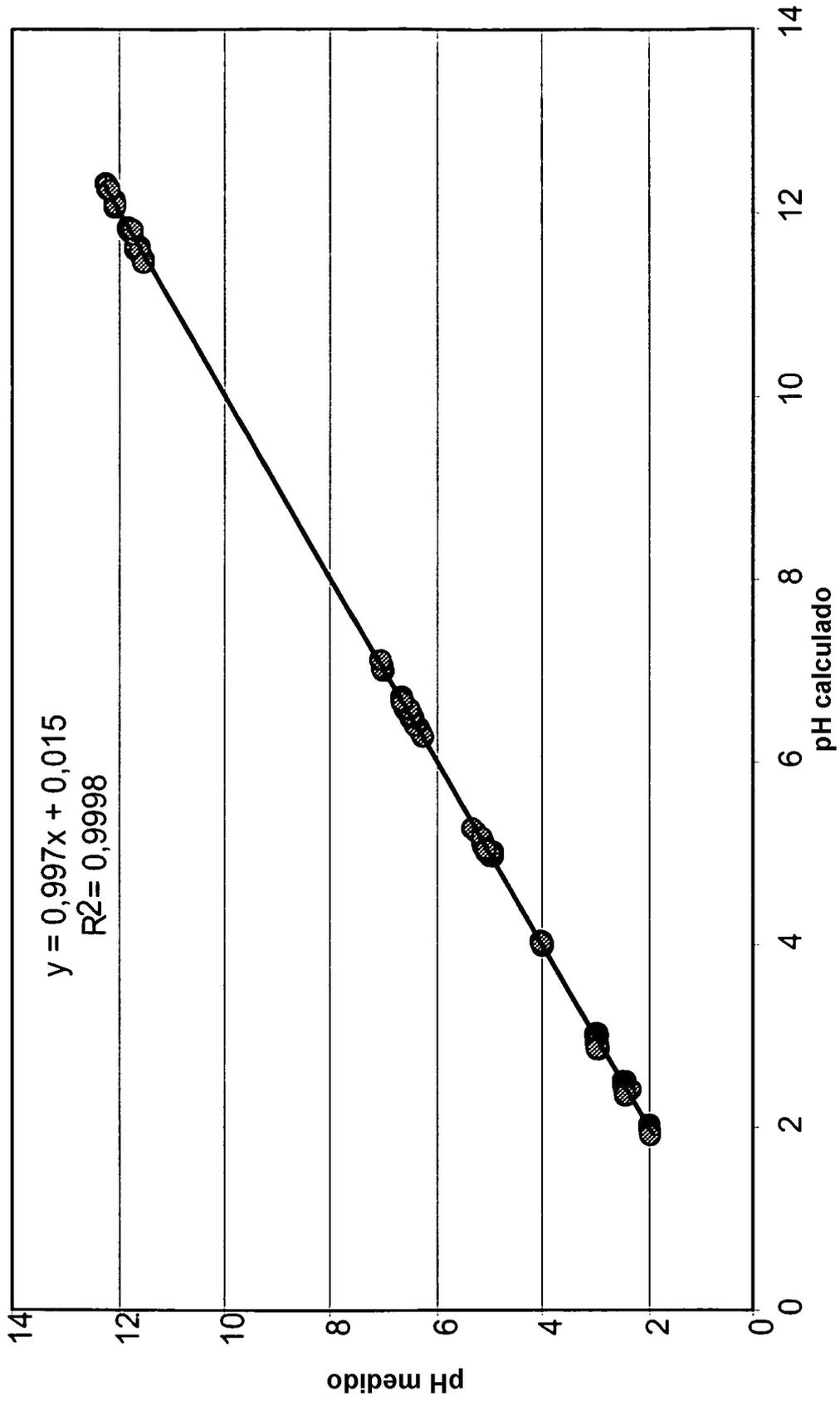


Fig 5