



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΔΕΙΦΟΡΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

---

**2<sup>η</sup> Εργαστηριακή Άσκηση: Ρυθμιστικά Διαλύματα**

Γαλάνη Αγγελική, Χημικός PhD, Ε.ΔΙ.Π. - Διονυσοπούλου Εύα Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

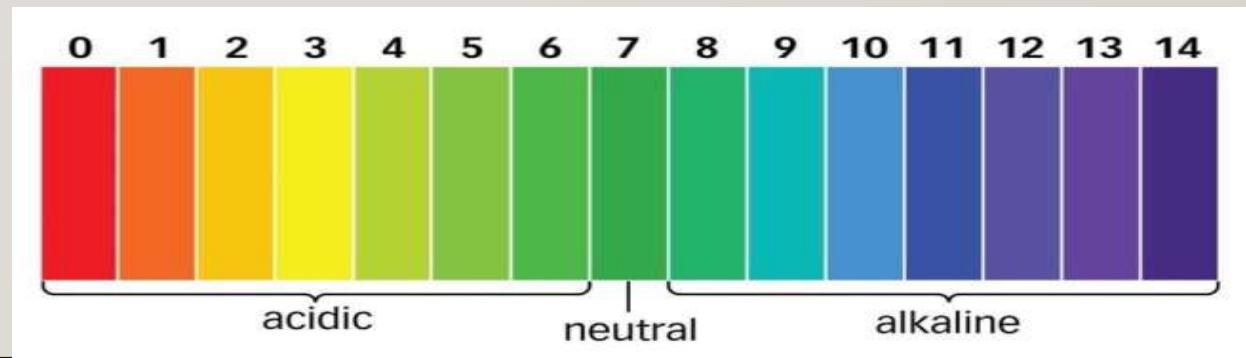
---



# pH

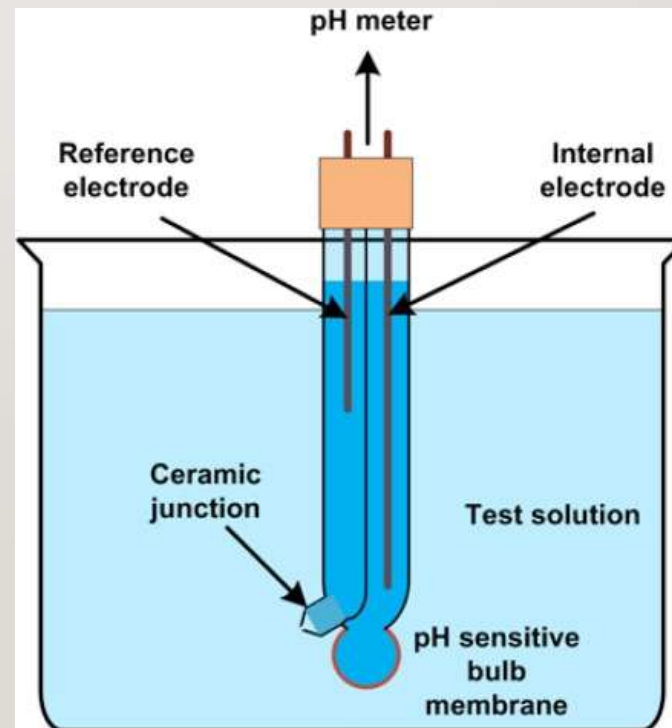
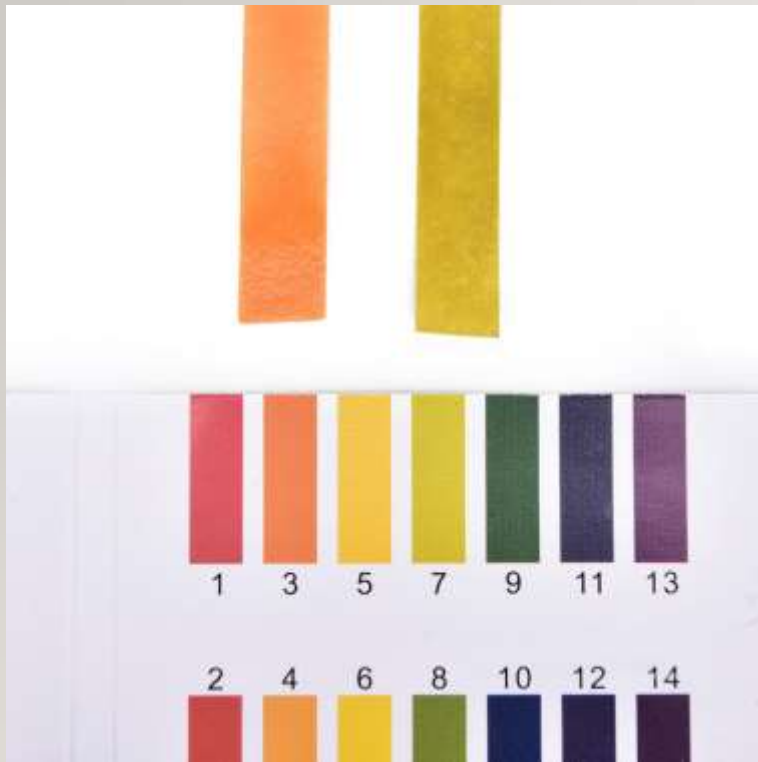
- Ο όρος pH χρησιμοποιείται για να περιγράψει την οξύτητα των διαλυμάτων και ορίζεται ως ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων  $H^+$   
$$pH = -\log[H^+]$$
- Όταν το pH αυξάνει, μειώνεται η συγκέντρωση των ιόντων  $H^+$ .
- Η κλίμακα pH κυμαίνεται από 0 ως 14.

**pH < 7** όξινο διάλυμα  
**pH > 7** βασικό διάλυμα  
**pH = 7** ουδέτερο διάλυμα



# Μέτρηση pH

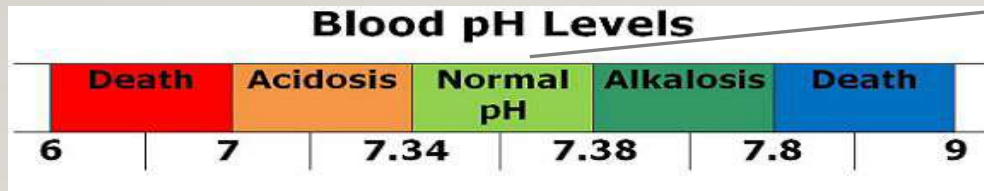
---



# pH και βιολογικά συστήματα

---

- Όλες οι βιοχημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες σε ότι αφορά τη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου.
- Οι ζωντανοί οργανισμοί δεν μπορούν να ανεχθούν μεγάλες αλλαγές στην τιμή συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου, δηλαδή στο pH.



Στο πλάσμα των υγιών ατόμων το pH είναι μεταξύ 7.35 και 7.45

- Άρα είναι απαραίτητο να υπάρχουν χημικές ουσίες που να κρατούν το pH σταθερό και να ρυθμίζουν ένα σύστημα.

# Ρυθμιστικά διαλύματα, buffers

---

Διαλύματα τα οποία διατηρούν πρακτικά σταθερό το pH τους όταν σε αυτά προστίθενται μικρές αλλά υπολογίσιμες ποσότητες ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσεως αλλά και όταν αραιώνονται.

➤ Αποτελούνται από:

✓ ασθενές οξύ και άλας αυτού (συζυγής του βάση) – Όξινα ρυθμιστικά

ή

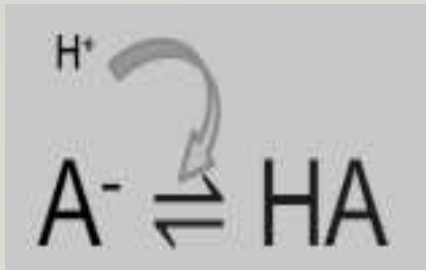
✓ ασθενή βάση και άλας αυτής (συζυγής της οξύ) – Βασικά ρυθμιστικά

## Πως δρουν τα ρυθμιστικά διαλύματα

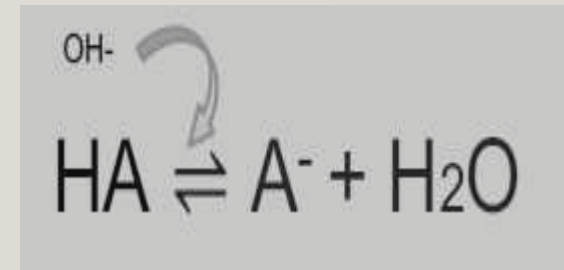
Έστω HA ένα ασθενές οξύ και A<sup>-</sup> η συζυγής του βάση (άλας αυτού)



Προσθήκη οξέος έχει μικρή επίδραση διότι τα H<sup>+</sup> απορροφούνται από τη συζυγή βάση και δίνουν πάλι το ασθενές οξύ.



Προσθήκη βάσεως έχει μικρή επίδραση διότι τα OH<sup>-</sup> απορροφούνται από το ασθενές οξύ και δίνουν τη συζυγή βάση και νερό.



Άρα τα ρυθμιστικά  
διαλύματα έχουν την  
ικανότητα να δεσμεύουν ή  
να απελευθερώνουν  $H^+$ ,  
διατηρώντας έτσι το pH του  
διαλύματος σε σχετικά  
σταθερά επίπεδα όταν  
προστίθενται σημαντικές  
ποσότητες οξέος ή βάσεως





Το pH ενός ρυθμιστικού διαλύματος δίνεται από την εξίσωση Handerson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Όπου:

$$\text{pK}_a = -\log K_a$$

$K_a$  η σταθερά ισορροπίας του ασθενούς οξέος

$[\text{A}^-]$  η συγκέντρωση της συζυγούς βάσης (ή αλλιώς του δέκτη  $\text{H}^+$ )

$[\text{HA}]$  η συγκέντρωση του οξέος (ή αλλιώς του δότη  $\text{H}^+$ )

## Ρυθμιστική Χωρητικότητα-Buffer capacity

---

Ρυθμιστική χωρητικότητα κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος, καλείται η συγκέντρωση ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσης που προστίθεται σε αυτό το διάλυμα, ώστε να επέλθει μεταβολή του pH κατά μια μονάδα.

Είναι μέτρο της αποτελεσματικότητας του ρυθμιστικού διαλύματος και εξαρτάται από τις ποσότητες του ζεύγους συζυγούς οξέος-βάσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτού.

Έστω

- $dC_B$  τα γραμμομόρια ισχυρής βάσης που προστίθενται σε 1 L ρυθμιστικού διαλύματος.
- $dC_A$  τα γραμμομόρια ισχυρού οξέος που προστίθενται σε 1 L ρυθμιστικού διαλύματος.
- $dpH$  η μεταβολή του pH.

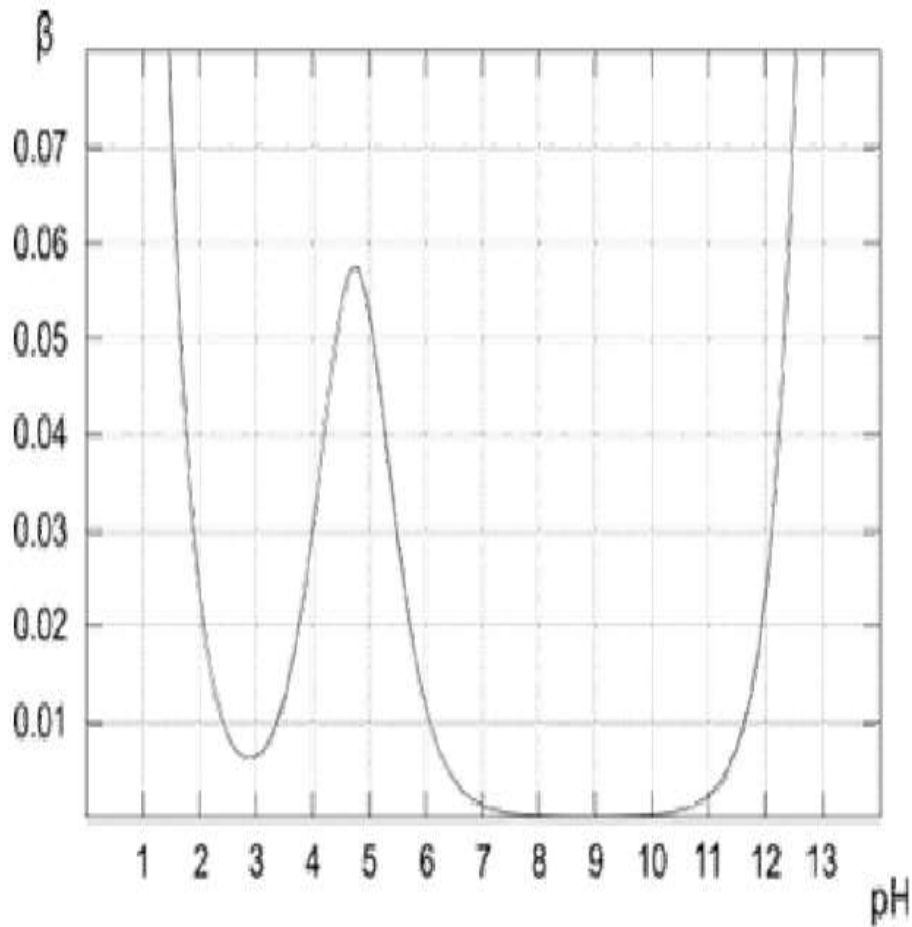
Η ρυθμιστική χωρητικότητα ή δείκτης ρυθμιστικής ικανότητας  $\beta$  δίνεται από τη σχέση:

$$\beta = dC_B/dpH = -dC_A/dpH$$

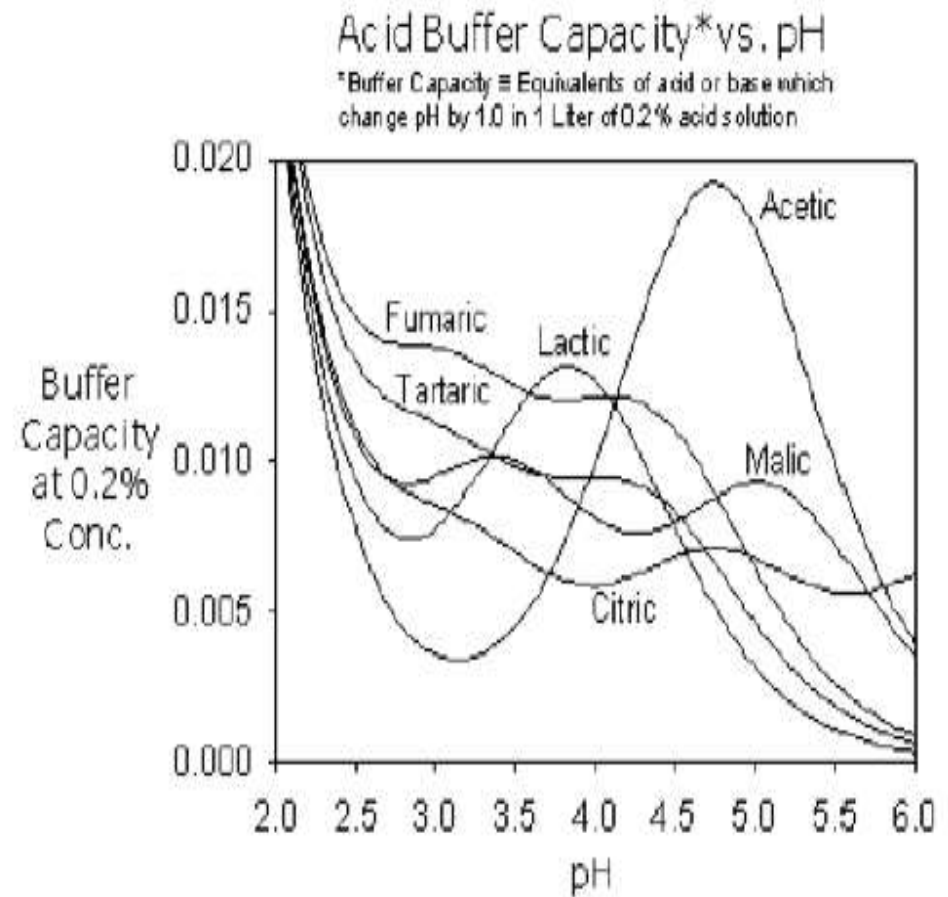
Γενικά ο συντελεστής  $\beta$  είναι θετικός αριθμός και δίνεται από τη σχέση:

$$\beta = 2,303 (C_{HA} \cdot C_A) / (C_{HA} + C_A)$$

Ρυθμιστική ικανότητα  
 $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$



Ρυθμιστική ικανότητα  
διάφορων Buffers  
συναρτήσσει του pH



## Παράδειγμα

Υπολογίστε το pH και τη ρυθμιστική χωρητικότητα διαλύματος που προκύπτει με την ανάμειξη 112 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1325 M και 136 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1450 M

### Απάντηση

---

Η αντίδραση εξουδετέρωσης η οποία πραγματοποιείται είναι η εξής:



Μετά την ανάμειξη:

$$C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = \frac{\{(136 \text{ mL}) (0,1450 \text{ mmol/mL}) - (112 \text{ mL})(0,1325 \text{ mmol/mL})\}}{(136 + 112)\text{mL}} = 0,01968 \text{ M} \approx [\text{HPO}_4^{2-}]$$

$$C_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = \frac{\{(112 \text{ mL}) (0,1325 \text{ mmol/mL}) \times 2\}}{248\text{mL}} = 0,1197 \text{ M} \approx [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$$

$$\text{pH} = \text{pK}_{a_2} + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 7,21 + \log (0,01968/0,1197) = 6,43$$

$$\text{Ρυθμιστική χωρητικότητα } \beta = 2,303 \frac{(0,1197 \times 0,01968)}{(0,1197 + 0,01968)} = 0,0389$$

# Επιλογή κατάλληλων ρυθμιστικών Διαλυμάτων

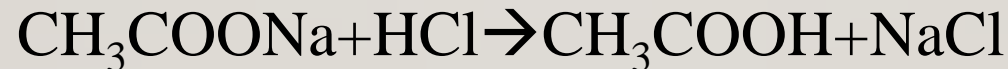
- Επιλογή ένωσης με  $pK_a$  κοντά στο επιθυμητό  $pH$  και συγκεκριμένα σε εύρος  $\pm 1$  μονάδα από την τιμή  $pK_a$ . Ένα ρυθμιστικό λειτουργεί σε τιμές  $pH$  ίσες με  $pK_a \pm 1$ 
  - ✓  $pH = pK_a + 1$  όταν  $[\text{βάσης}]/[\text{οξέος}] = 10$
  - ✓  $pH = pK_a - 1$  όταν  $[\text{βάσης}]/[\text{οξέος}] = 1/10$
- Η ρυθμιστική ικανότητα είναι μέγιστη για  $pK_a = pH$  (δηλ όταν ασθενές οξύ ή βάση και το αντίστοιχο άλας έχουν ίσες συγκεντρώσεις)
- Η μοριακή συγκέντρωση ( $M$ ), ρυθμιστικού διαλύματος ορίζεται ως άθροισμα των συγκεντρώσεων του οξέος και της συζυγούς του βάσης.

# Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων (Buffers) - Τρεις μέθοδοι

## 1<sup>η</sup> ΜΕΘΟΔΟΣ: Τιτλοδότηση ενός από τα δύο συστατικά του buffer με χρήση οξέος ή βάσεως ανάλογα ποιο συστατικό του buffer είναι διαθέσιμο

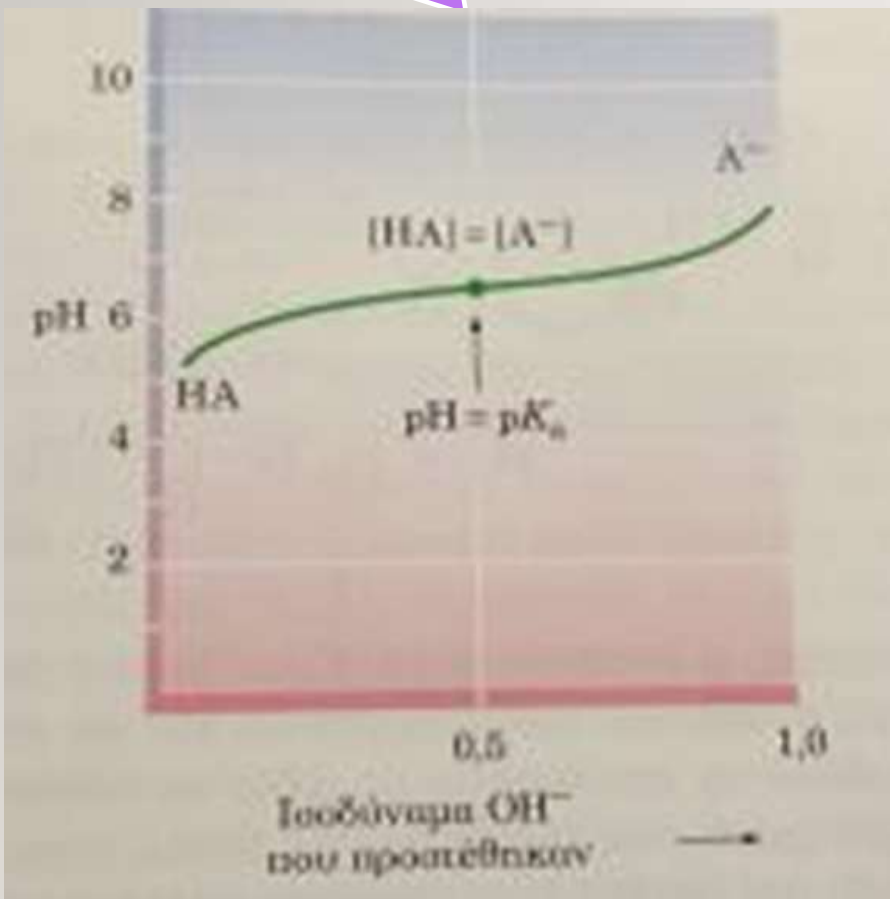
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από ένα οξύ και το άλας του, παρασκευάζεται προσθέτοντας μια ισχυρή βάση (π.χ. NaOH) σε διάλυμα ασθενούς οξέος (π.χ. οξικό οξύ) κατάλληλης συγκέντρωσης μέχρι να επιτευχθεί το απαιτούμενο pH του ρυθμιστικού.

- Εάν διαθέσιμο είναι το άλλο συστατικό του ρυθμιστικού διαλύματος, (στην περίπτωση αυτή το CH<sub>3</sub>COONa), προστίθεται ισχυρό οξύ (πχ HCl), σε διάλυμα του άλατος κατάλληλης συγκέντρωσης έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό pH

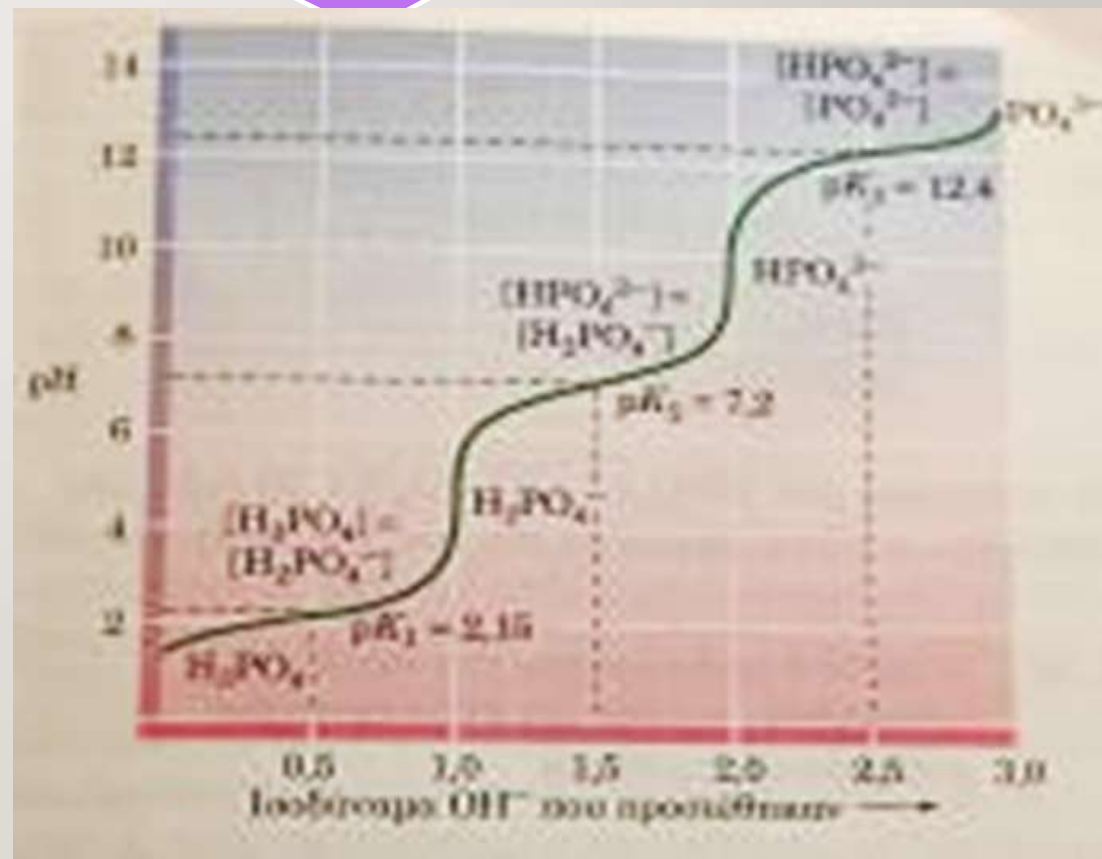


- Έτσι Buffer οξικού σχηματίζεται από (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa)

Μέσο σημείο τιτλοδότησης



Καμπύλη τιτλοδότησης του φωσφορικού οξέος





**2<sup>η</sup> ΜΕΘΟΔΟΣ** (χρήση εξίσωσης Handerson-Hasselbalch) : Χρήση του  $pK_a$  του δότη πρωτονίων που υπάρχει στο buffer, υπολογισμός του λόγου συγκεντρώσεων (δέκτη πρωτονίων)/(δότη πρωτονίων) που υπάρχουν σε buffer συγκεκριμένου pH

Εάν και οι δύο μορφές (δηλαδή και το ασθενές οξύ και το αντίστοιχο άλας ή και η ασθενής βάση και το αντίστοιχο άλας) είναι διαθέσιμες, μετατρέπεται η απαιτούμενη ποσότητα από mole σε γραμμάρια με χρήση του μοριακού βάρους αυτού του συστατικού και στη συνέχεια ζυγίζονται οι σωστές ποσότητες και των δύο μορφών ή μετατρέπονται τα moles σε όγκο εάν οι ουσίες είναι διαθέσιμες σε υγρή μορφή.

**3<sup>η</sup> ΜΕΘΟΔΟΣ:** Χρήση δεδομένων πίνακα

Από πίνακες βιβλιογραφίας αντλούνται όλα τα δεδομένα σε σχέση με τις απαιτούμενες ποσότητες των συστατικών του buffer κλπ.

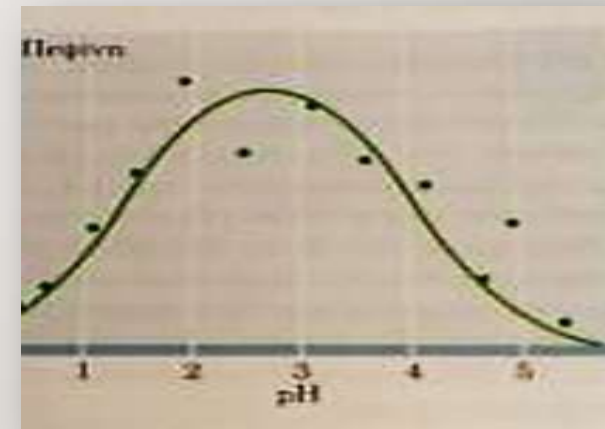
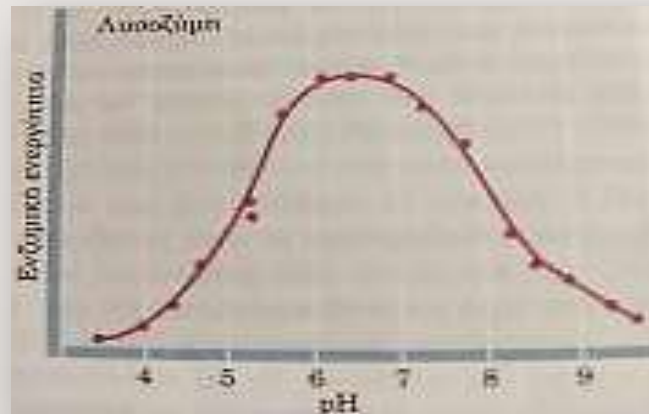
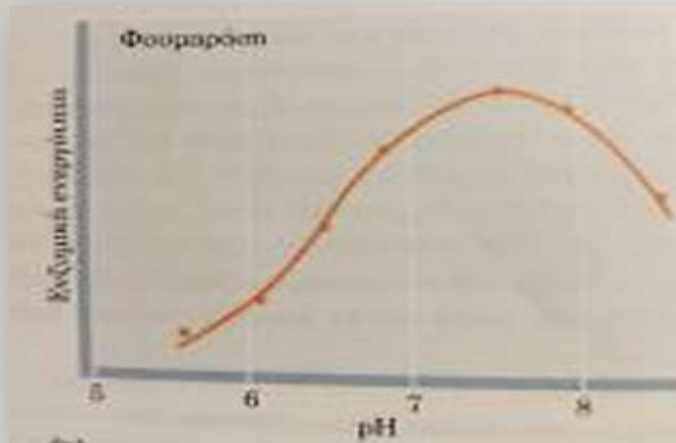


## ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ pH ΖΩΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

---

- Η δομή, άρα και η λειτουργία των πρωτεϊνών, των νουκλεϊνικών οξέων και άλλων πολλών κυτταρικών μορίων εξαρτάται από δυνάμεις όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις που μπορούν να επηρεαστούν από το pH. Σε κάθε σωματικό ή κυτταρικό διαμέρισμα το pH διατηρείται ώστε να επιτρέπεται η μέγιστη ενζυμική/πρωτεϊνική αποδοτικότητα.
- Διεργασίες όπως ο μεταβολισμός εξαρτώνται από τις ενεργότητες των ενζύμων οι οποίες επηρεάζονται από το pH.

# pH συναρτήσει της ενζυμικής δραστηριότητας



- ✓ Φουμαράση: Μεταβολικό ένζυμο των μιτοχονδρίων
- ✓ Λισοζύμη: Βρίσκεται στα κύτταρα και στα σωματικά υγρά και διασπά τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων
- ✓ Πεψίνη: ένζυμο πέψης πρωτεϊνών ενεργό στο γαστρικό υγρό

- Οι οργανισμοί προστατεύονται ενάντια στις επιβλαβείς αλλαγές pH στα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια υγρά τους κυρίως με τα ρυθμιστικά συστήματα.
- Τα ρυθμιστικά συστήματα που επιλέγονται ικανοποιούν την ανάγκη για τιμή  $pK_a$  κοντά σε pH 7 και την ανάγκη για συμβατότητα των συστατικών των ρυθμιστικών διαλυμάτων με τους μεταβολικούς μηχανισμούς των κυττάρων.

Δύο ρυθμιστικά συστήματα διατηρούν την τιμή του ενδοκυττάρριου pH ουσιαστικά σταθερή

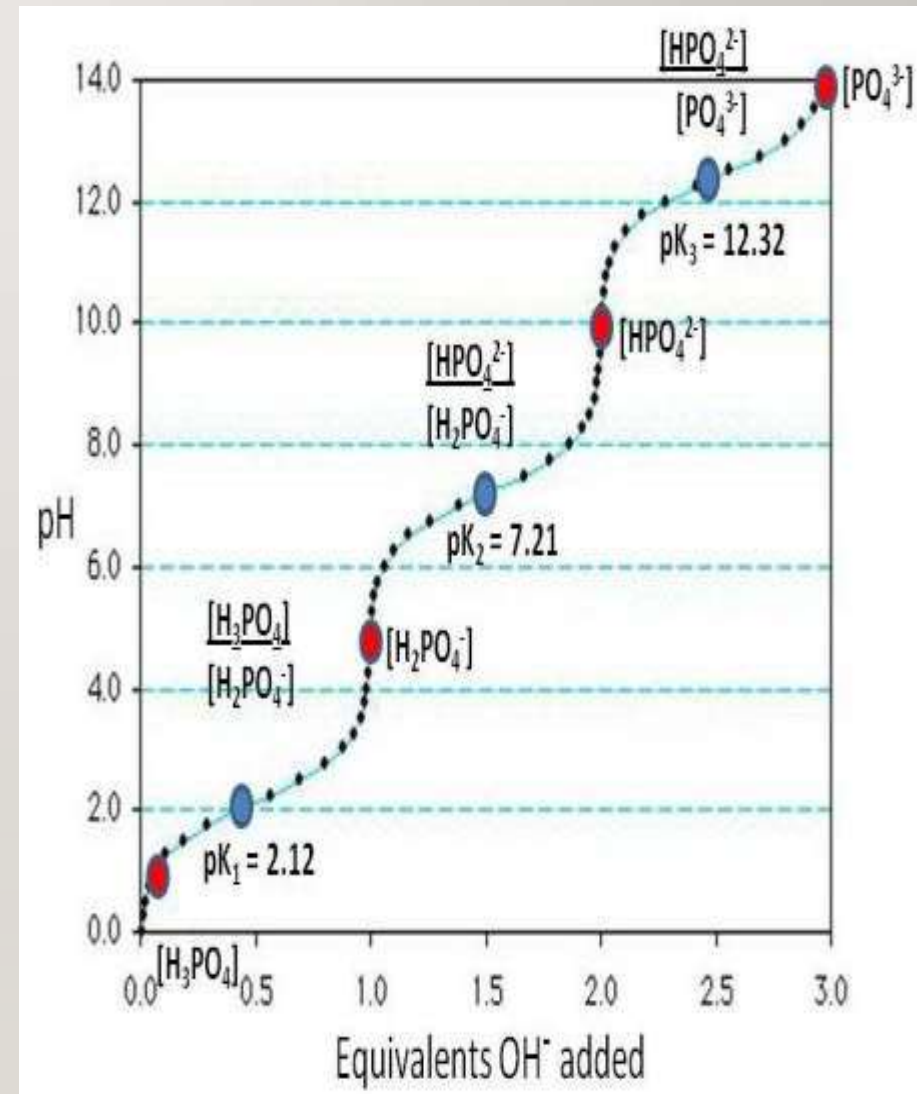
Σύστημα φωσφορικών  
 $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$

Σύστημα ιστιδίνης

# ΣΥΣΤΗΜΑ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ

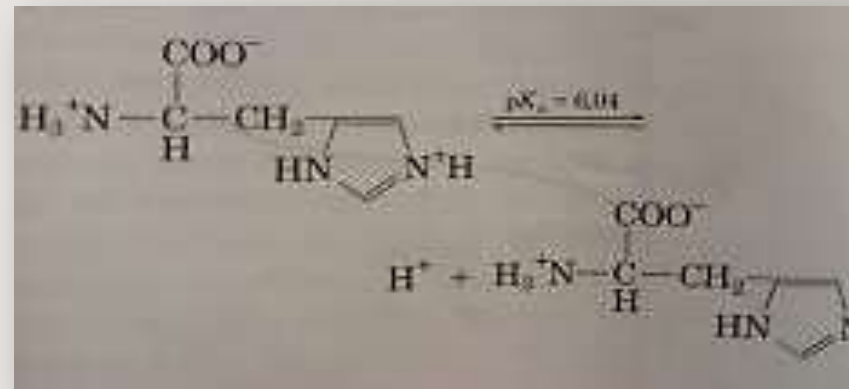
## $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$

- Ενδοκυττάριο pH περισσότερων κυττάρων = 6,9 – 7,4
- Σημαντικό ενδοκυττάριο ρυθμιστικό σύστημα. Τα φωσφορικά ιόντα είναι άφθονα ανιόντα μέσα στα κύτταρα και σε μορφή ανόργανη και ως σημαντική λειτουργική ομάδα οργανικών μορίων που είναι πρόδρομες ή και μεταβολίτες μακρομορίων.
- Και σε οργανική και σε ανόργανη μορφή η χαρακτηριστική  $\text{pK}_2$  του φωσφορικού οξέος, δηλώνει πως τα ιοντικά είδη που υπάρχουν σε φυσιολογικό pH είναι αρκετά για να δώσουν/δεχθούν  $\text{H}^+$  και να ρυθμίσουν την όποια αλλαγή pH.



## ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ

Η ομάδα ιμιδαζολίου (πενταμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με δύο άτομα αζώτου), της ιστιδίνης χρησιμεύει ως ενδοκυττάριο ρυθμιστικό σύστημα



- Η ιστιδίνη είναι ένα από τα 20 πρωτεϊνικά αμινοξέα.
- Η τιμή  $\text{pK}_a$  της διάστασης του υδρογόνου του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης είναι ίση με 6,04.
- Η ιστιδίνη εμφανίζεται στα κύτταρα ως ελεύθερο αμινοξύ, ως συστατικό πρωτεϊνών και ως συστατικό διπεπτιδίων σε συνδυασμό με άλλα αμινοξέα.
- Η συγκέντρωση ελεύθερης ιστιδίνης είναι πολύ μικρή και η  $\text{pK}_a$  του ιμιδαζολίου διαφέρει περισσότερο της μιας μονάδας  $\text{pH}$  από την επικρατούσα του ενδοκυττάριου υγρού, ο ρόλος της ως ενδοκυττάριο ρυθμιστικού συστήματος δεν είναι σημαντικός.
- Δεσμευμένη σε πρωτεΐνη και σε διπεπτίδια η ιστιδίνη μπορεί να αποτελέσει το κυρίαρχο ρυθμιστικό σύστημα.

Το **pH του εξωκυττάριου υγρού** στο οποίο βρίσκονται εμβαπτισμένα τα κύτταρα και οι ζωικοί ιστοί **διατηρείται από το σύστημα διττανθρακικών / ανθρακικού οξέος (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**



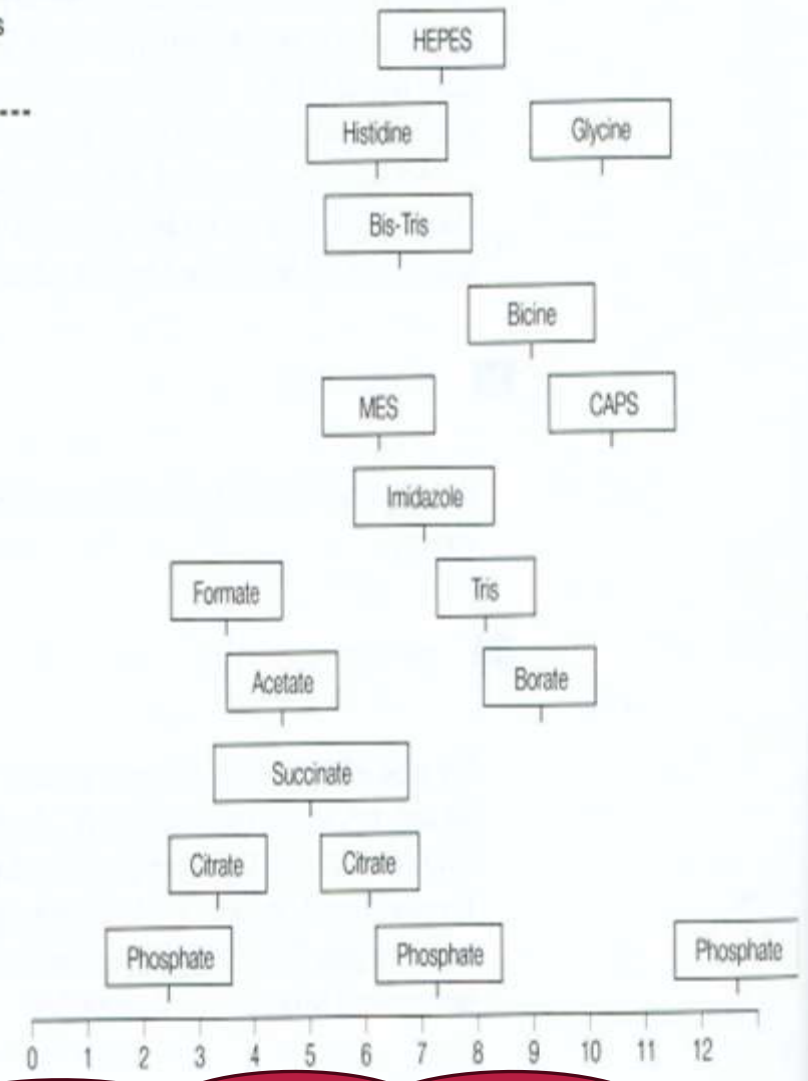
**Τα ρυθμιστικά  
διαλύματα στη  
βιοχημεία θα  
πρέπει να είναι  
χρήσιμα μέσα σε  
φυσιολογικά όρια  
pH**

Δεν υπάρχουν πολλές κοινές ουσίες που να έχουν τιμές pKa μεταξύ 6 με 8. Άρα για τα in vitro πειράματα που χρησιμοποιούν οι βιοχημικοί σε pH κοντά στο φυσιολογικό, είναι περιορισμένη η επιλογή ρυθμιστικών. Κάποια από αυτά είναι:

- Tris (τρεις –υδροξυλ-αμινομεθάνιο)
  - TEA (τριαιθανολαμίνη)
  - HEPES (4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ)
- .....και άλλα

Compound	MW	pK <sub>a</sub> at 20°C	ΔpK <sub>a</sub> /°C
ACES	182.2	6.90	
ADA, free acid	190.2	6.60	-0.011
ADA, sodium salt	212.2	6.60	-0.011
BES	213.2	7.17	-0.027
Bicine	163.2	8.35	-0.018
Boric acid	61.8	9.24	-0.018
CAPS	221.3	10.4	-0.009
CHES	207.3	9.5	-0.009
Citric acid	192.1	3.14	-0.009
	192.1	4.76	-0.009
	192.1	6.39	-0.009
Glycylglycine	132.1	8.4	-0.028
HEPES, free acid	238.3	7.55	-0.014
HEPES, sodium salt	260.3	7.55	-0.014
Imidazole	68.1	7.00	-0.014
MES, free acid	195.2	6.15	-0.011
MOPS, free acid	209.3	7.20	-0.006
PIPES, free acid	302.4	6.80	-0.009
Phosphoric acid (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	174.2	2.12	-0.009
	174.2	7.21	-0.009
	174.2	12.32	-0.009
TES, free acid	229.3	7.50	-0.020
Tricine	179.2	8.15	-0.021
Triethanolamine	185.7	7.66	-0.021
TRIS, (Trizma base)	121.1	8.30	-0.031
TRIS-HCl	157.6	8.30	-0.031

Effective buffering ranges of several common buffers.



Τα περισσότερα βιολογικά συστήματα απαιτούν pH μεταξύ 6 και 8. Ωστόσο κάποιες φορές παρουσιάζεται ανάγκη για μεγαλύτερο εύρος pH

## Ρυθμιστικά διαλύματα Good

Στη δεκαετία του 60 ο Good και οι συνεργάτες του με βάση την ανάγκη για ύπαρξη ρυθμιστικών ειδικά σχεδιασμένων για βιολογικά συστήματα, μελέτησαν αρκετά και κατέληξαν σε κάποια που πληρούσαν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά  
 Κάποια παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα

Buffer Name	Abbreviation	Structure (All structures shown in salt form)	pK <sub>a</sub> (20°C)	Useful pH Range	ΔpK <sub>a</sub> /C°	of a Saturated Solution (M, 0°C)
<i>N</i> -2-Acetamido-2-aminoethanesulfonic acid	ACES	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.9	6.4–7.4	–0.020	0.22
<i>N</i> -2-Acetamidiminodiacetic acid	ADA	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{N}^+\begin{matrix} \text{CH}_2\text{COO}^- \\ \text{H} \\ \text{CH}_2\text{COO}^- \end{matrix}$	6.6	6.2–7.2	–0.011	–
<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	BES	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.15	6.6–7.6	–0.016	3.2
<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)glycine	Bicine	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$	8.35	7.5–9.0	–0.018	1.1
3-(Cyclohexylamino)propanesulfonic acid	CAPS		10.4	10.0–11.0	–0.009	0.85
Cyclohexylaminoethanesulfonic acid	CHES		9.5	9.0–10.0	–0.009	0.85
Glycylglycine	Gly-Gly	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	8.4	7.5–9.5	–0.028	1.1
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid	HEPES	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N} \begin{matrix} \text{---} \\ \text{---} \end{matrix} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.55	7.0–8.0	–0.014	2.25
2-( <i>N</i> -Morpholino)ethanesulfonic acid	MES		6.15	5.8–6.5	–0.011	0.65
3-( <i>N</i> -Morpholino)propanesulfonic acid	MOPS		7.20	6.5–7.9	–	–
Piperazine- <i>N,N'</i> -bis-2-ethanesulfonic acid	PIPES	$^- \text{O}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{---} \\ \text{---} \end{matrix} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.8	6.4–7.2	–0.0085	–
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid	TES	$(\text{HOCH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.5	7.0–8.0	–0.020	2.6
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methylglycine	Tricine	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	8.15	7.5–8.5	–0.021	0.8
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	8.3	7.5–9.0	–0.031	2.4

Το TRIS είναι ένα παράδειγμα ευρύτατα χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού από όσα παρουσιάζονται στην προηγούμενη διαφάνεια και είναι αποτελεσματικό στην περιοχή pH 7,5 έως 8,5.

Έστω θέλουμε να παρασκευάσουμε ένα διάλυμα Tris 0,1 M. Ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

Ζυγίζουμε 12,11 g Tris base (0,1 mol) και τα διαλύουμε σε 950 ως 975 mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται ως εξής:

- με προσθήκη οξέος (π. HCl) εάν θέλουμε Tris-HCl, υπό ανάδευση έως ότου φτάσουμε την τιμή που θέλουμε και στη συνέχεια συμπλήρωση με νερό μέχρι το 1 L και επανέλεγχο του pH.

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

Να παρασκευάσετε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με  $C = 0,25 \text{ M}$   
και  $\text{pH} = 7,4$  Δίνεται  $\text{pK}_a = 7,2$   
Χρησιμοποιήστε  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  και  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

---

### ΔΕΔΟΜΕΝΑ

- $\text{pK}_a = 7,2$
- $\text{pH} = 7,4$
- Όγκος buffer = 50 mL
- Συγκέντρωση Ρυθμιστικού = 0,25 M ( $[\text{HA}]$  και  $[\text{A}^-]$ )

### ΖΗΤΟΥΜΕΝΑ

- Μάζα (g) του  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $[\text{HA}]$
- Μάζα (g) του  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $[\text{A}^-]$

### ΕΙΣΩΣΗ HENDERSON

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

# ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

---

- Πρώτα υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του ασθενούς οξέος και της συζυγούς βάσης του buffer 0,25 M
- Υποθέτουμε πως  $[A^-] = y$  και άρα  $[HA] = 0,25 - y$
- Άρα  $pH = pK_a + \log [A^-]/[HA] \rightarrow 7,4 = 7,2 + \log [y/(0,25 - y)] \rightarrow 0,2 = \log [y/(0,25 - y)]$   
Άρα αντιλογαριθμίζοντας  $y/(0,25 - y) = 10^{0,2} = 1,6 \rightarrow y = 1,6(0,25 - y) \rightarrow y + 1,6y = 0,4$   
 $\rightarrow 2,6y = 0,4 \rightarrow y = \mathbf{0,15\ M}$  Αυτή είναι η συγκέντρωση του  $[A^-]$  στο Buffer
- Άρα η συγκέντρωση του  $[HA]$  στο buffer εξ ορισμού θα είναι  $0,25 - 0,15 = 0,1\ M$

Μοριακό Βάρος  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 120 \text{ g/mol}$  και Μοριακό Βάρος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 142 \text{ g/mol}$

- Υπολογισμός moles  $\text{A}^-$  στο buffer:  $0,15 \text{ mol/L} \times 0,05 \text{ L} = 0,0075 \text{ mol}$

{Molarity[ $\text{A}^-$ ] στο  
buffer} x { V buffer  
σε L }

**Υπολογισμός μάζας (g) του  $\text{A}^-$   $0,0075 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} = 1,065 \text{ g}$**

- Υπολογισμός moles HA στο buffer:  $0,1 \text{ mol /L} \times 0,05 \text{ L} = 0,005 \text{ mol}$

{Molarity[HA] στο  
buffer} x { V buffer  
σε L }

**Υπολογισμός μάζας (g) του HA  $0,005 \text{ mol} \times 120 \text{ g/mol} = 0,6 \text{ g}$**

Άρα σε 50 mL απιονισμένου νερού προσθέτουμε τις ποσότητες των συστατικών που υπολογίσαμε.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---





## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΣΚΕΥΗ-ΟΡΓΑΝΑ

- Διάλυμα 0,5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , στερεό  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , Διάλυμα  $\text{NaOH}$  1 M
- Ογκομετρική φιάλη 100 mL, κωνική φιάλη 250 mL, μαγνήτης ανάδευσης, προχοΐδα
- Πεχάμετρο, ηλεκτρονικός ζυγός, μαγνητικός αναδευτήρας

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

### 1. Παρασκευή Ρυθμιστικού διαλύματος

Παρασκευάστε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού 0,2 M με pH=5,2

Να χρησιμοποιήσετε για την παρασκευή διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 0,5 M που θα σας δοθεί και στερεό CH<sub>3</sub>COONa. Δίνεται ότι pK<sub>a</sub> CH<sub>3</sub>COOH =4,76 και Mr CH<sub>3</sub>COONa = 82,034 g/mol

Χρησιμοποιήστε για τους υπολογισμούς την εξίσωση Henderson- Hasselbach:  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left\{ \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right\}$

Αφού κάνετε τους υπολογισμούς και τους δείξετε στους υπεύθυνους της άσκησης, προχωρήστε στην παρασκευή του ρυθμιστικού και στη μέτρηση του pH αυτού με πεχάμετρο.

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τη στοιχειομετρική συγκέντρωση και όχι την ενεργότητα που το πεχάμετρο μετρά. Άρα πιθανά το pH να είναι κατά ελάχιστα μικρότερο από αυτό που υπολογίσαμε και θα πρέπει λίγο πριν την συμπλήρωση του τελικού όγκου να ελεγχθεί η τιμή του με πεχάμετρο ακριβείας και αν χρειάζεται να διορθωθεί στην επιθυμητή τιμή, με προσεκτική προσθήκη σιγ-σιγ ισχυρής βάσης (NaOH 5N) και μετά να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος στα 100 mL.

Ενεργότητα  $a$ , καλείται η δρώσα συγκέντρωση. Είναι κατά τι μικρότερη της στοιχειομετρικής λόγω παρουσίας και άλλων ιόντων στο διάλυμα που δρουν παρεμποδιστικά

$$a = \gamma C$$

όπου  $\gamma$  ο συντελεστής ενεργότητας

## ΣΗΜΕΙΩΣΗ

- Θα μπορούσαμε να κάνουμε το ρυθμιστικό οξικών 0,2 M 100 mL pH 5,2 και ως εξής:
- Να παρασκευάσουμε 50 mL διαλύματος οξικού οξέος 0,4 M, να ρυθμίσουμε με NaOH το pH στο 5,2 και στη συνέχεια να συμπληρώσουμε τον όγκο ως τα 100 mL με απιονισμένο νερό.

## 2. Εύρεση της ρυθμιστικής χωρητικότητας του διαλύματος που παρασκευάστηκε

---

Μεταφέρατε σε κωνική φιάλη 250 mL τα 100 mL του ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάσατε και προσθέστε σε αυτή μαγνήτη ανάδευσης.

- ✓ Τοποθετήστε την κωνική φιάλη πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και ανοίξτε την ανάδευση. Αναδεύστε και κλείστε την ανάδευση.
- ✓ Βυθίστε το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου στο διάλυμα ( 2,5 -3,0 cm μέσα στο διάλυμα), με προσοχή ώστε να απέχει από το μαγνήτη ανάδευσης κάποια χιλιοστά και σημειώστε την τιμή pH που θα καταγράψει.

- ✓ Προσθέστε σε μια προχοίδα διάλυμα NaOH 1N και καταγράψτε τα αρχικά mL αυτής.
- ✓ Ξεκινήστε να προσθέτετε μέσα στην κωνική φιάλη υπό συνεχή ανάδευση σιγ-σιγ NaOH από την προχοίδα.
- ✓ Κλείστε την ανάδευση, αφήστε για λίγο σε ηρεμία το διάλυμα και μετρήστε το pH.
- ✓ Επαναλάβετε τη διαδικασία έως ότου η τιμή pH του ρυθμιστικού ανεβεί 1 μονάδα σε σχέση με την αρχική που έχετε καταγράψει.
- ✓ Καταγράψτε τον όγκο NaOH που προσθέσατε και υπολογίστε τη ρυθμιστική χωρητικότητα σε (meq βάσεως) / (L ρυθμιστικού διαλύματος)

meq βάσεως = mmol βάσεως  
διότι το NaOH είναι  
μονοπρωτική βάση

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Βιοχημεία 6<sup>η</sup> ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1<sup>η</sup> ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham, Εκδόσεις Utopia, 2019
- Διαμαντής Σιδεράς, Αναπλ. Καθηγητής «Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας», Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα 2023
- Έρη Μπιζάνη, Ε.ΔΙ.Π. «Ρυθμιστικά Διαλύματα», Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ  
<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM164/%CE%94%CE%99%CE%91%CE%9B%CE%95%CE%9E%CE%95%CE%99%CE%A3%20%CE%91%CE%9D%CE%91%CE%9B%CE%A5%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%97%CE%A3%20%CE%A7%CE%97%CE%9C%CE%95%CE%99%CE%91%CE%A3%20%28213%CE%98%29%5.%CE%A1%CE%A5%CE%98%CE%9C%CE%99%CE%A3%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%91%20%CE%94%CE%99%CE%91%CE%9B%CE%A5%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%91.pdf>
- Πόπη Καβελάκη, Μαρία Φουσκάκη, «Ενότητα: Παρασκευή Ρυθμιστικών Διαλυμάτων», από Eclass Εργαστηρίου Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης <https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/courses/CHEM-UNDER128/>
- [https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/1\\_preparation\\_of\\_buffer\\_solutions\\_0.pdf](https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/1_preparation_of_buffer_solutions_0.pdf)